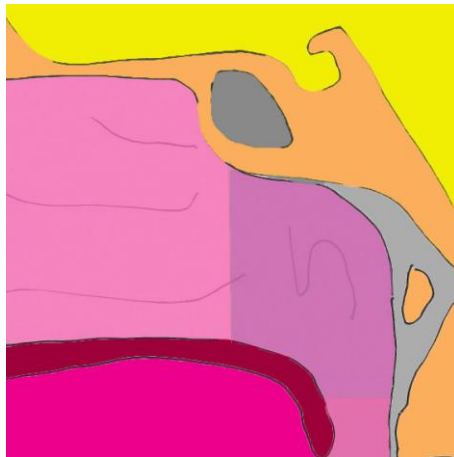




**EDUARDO LUÍS  
FERNANDES RIBEIRO  
BREDAS**

**CARCINOMA DA NASOFARINGE - ASPECTOS  
EPIDEMIOLÓGICOS CLÍNICOS E MOLECULARES**





Universidade de Aveiro Secção Autónoma de Ciências da Saúde  
2011

**EDUARDO LUÍS  
FERNANDES RIBEIRO  
BREDA**

**CARCINOMA DA NASOFARINGE - ASPECTOS  
EPIDEMIOLÓGICOS CLÍNICOS E MOLECULARES**

Dissertação apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Doutor em Ciências Biomédicas, realizada sob a orientação científica do Doutor Rui Medeiros Silva, Professor Associado com Agregação do Instituto de Ciências Biomédicas de Abel Salazar e da Doutora Maria de Lourdes Pereira, Professora Associada com Agregação do Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro

O projecto de investigação subjacente a este estudo foi financiado pelo Ministério da Saúde de Portugal (CFICS: 261/1999). Os projectos de investigação envolvendo doentes e/ou seus produtos biológicos, foram efectuados com a aprovação da Comissão de Ética do IPO - Porto, conforme parecer emanado em Abril de 2005.

## Nota prévia

Aos 55 anos de idade, apresentar uma Dissertação de Doutoramento é, afinal, um acto simultaneamente de humildade e rebeldia perante a vida. Inevitavelmente, de uma forma singela, este é o momento de lembrar e agradecer a todos os familiares, que sinto estarem presentes neste momento.

Recordo os meus avós, que sempre me olharam com indisfarçável carinho e incompreensível orgulho, meu pai, exemplo sempre vivo de excelência pessoal, familiar e profissional, e minha mãe, modelo de coragem, perseverança e amor. Apresento-vos este tributo como homenagem, esperando não desmerecer daquilo que de mim esperaram.

Aos meus irmãos, cúmplices de meninice, e de quem sempre obtive, naturalmente, o juízo sincero e desinteressado sobre as dúvidas que me acompanharam nas idiosincrasias da vida.

A Manuela, minha mulher, eterno amor, companheira e âncora da minha vida, sem qual tudo deixa de ter sentido. Dedico-te simbolicamente esta Dissertação com um beijo muito especial.

Aos filhos, Inês, Eduardo, Filipa, para que saibam ler nesta Dissertação, não o alcançar de um objectivo, mas o exercício pleno da eterna luta da tentativa de “ser e valorizar”.

Aos “netos-do-coração”, um, mistério de responsabilidade precoce, a outra, uma explosão de vida.

A todos, o meu Reconhecimento.

## **O Júri**

Presidente:

**Professor Doutor Aníbal Manuel Oliveira Duarte**  
Professor Catedrático do Departamento de Electrónica e Telecomunicações da Universidade de Aveiro

Vogais:

**Professor Doutor Carlos Alberto da Silva Lopes**  
Professor Catedrático do Instituto Ciências Biomédicas Abel Salazar da Universidade do Porto

**Professor Doutor Amadeu Mortágua Velho da Maia Soares**  
Professor Catedrático do Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro

**Professor Doutor Rui Medeiros Melo Silva**  
Professor Associado com Agregação do Instituto Ciências Biomédicas Abel Salazar da Universidade do Porto (Orientador)

**Professora Doutora Maria Lourdes Gomes Pereira**  
Professor Associado com Agregação do Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro (Orientadora)

**Professor Doutor Francisco Luís Maia Mamede Pimentel**  
Professor Associado Convidado com Agregação da Universidade de Aveiro

**Professor Doutor João Olias**  
Doutorado pela Faculdade de Ciências Médicas da Universidade de Lisboa, Médico Otorrinolaringologista no Hospital de Cascais Dr. José de Almeida

## Agradecimentos

A apresentação de uma Dissertação pressupõe um trabalho prévio de investigação que é necessariamente plural, com o contributo de pessoas e instituições, as quais, funcionando de forma articulada, se organizam na concretização de um projecto.

É portanto com satisfação que gostaria de mostrar o meu profundo reconhecimento:

- Ao Sr. Professor Doutor Rui Medeiros Silva, Orientador da Dissertação, agradeço o apoio, o entusiasmo, a partilha do saber e as valiosas contribuições para o trabalho.

- À Sr.<sup>a</sup> Professora Doutora Maria de Lourdes Pereira, Co-orientadora da Dissertação, pelo “acreditar” desde o início, e também pela atenção e empenho científico com que a acompanhou.

- À Dr.<sup>a</sup> Raquel Catarino, exemplo de diálogo interdisciplinar e inter-geracional frutuoso e descomplexado, sem cuja colaboração e amizade não seria também possível concretizar este projecto.

Faz também todo o sentido manifestar o agradecimento ao Instituto Português de Oncologia do Porto, onde se encontrou o alicerce clínico deste trabalho, bem como à Universidade de Aveiro, nomeadamente ao Departamento de Biologia, que desde o primeiro instante o aceitou patrocinar academicamente.

Desde a sua fundação, o Instituto Português de Oncologia, muitos anos sob a direcção do Exmo. Sr. Dr. Guimarães dos Santos, privilegiou a ligação da prática clínica à investigação, e sem essa vocação institucional teria sido praticamente impossível recolher os dados que viabilizaram o componente clínico e laboratorial desta Dissertação. A experiência adquirida no Serviço de Otorrinolaringologia do IPO, sucessivamente sob direcção dos Exmos. Sr. Dr. José Luís Machado Aires, Sr. Dr. Carlos Barreira da Costa, Sr. Prof. Dr. Eurico Monteiro, foi também fundamental.

Sem o empenho científico e técnico de todo o Grupo de Oncologia Molecular (onde é justo salientar o trabalho desenvolvido com o Sr. Dr. Hugo Sousa), dirigido pelo Sr. Professor Dr. Rui Medeiros Silva, seria também impossível a concretização deste projecto.

Do mesmo modo, a colaboração do Serviço de Anatomia Patológica, inicialmente sob direcção do Exmo. Sr. Professor Doutor Carlos Lopes e posteriormente do Exmo. Sr. Professor Dr. Rui Henrique, foi de extraordinária relevância.

Uma palavra final de reconhecimento aos Exmo. Sr. Dr. Nelson Gama e Castro, e também ao Sr. Professor Doutor Wolfgang Steiner, os quais, em áreas científicas distintas, me souberam dar exemplo vivo de rigor e dedicação profissional sempre numa perspectiva humanista, beneficiando-me simultaneamente com a sua amizade.

Também às pessoas anónimas, que privadas de saúde, me procuraram de forma individual ou institucional, na busca da excelência em cuidados médicos, e às quais não raramente, nem consegui dar sequer o meu melhor. Espero que esta Dissertação, com o peso que tiver, possa contribuir para uma melhor compreensão para uma patologia que tão gravemente afecta a vida de muitos de vós, tanto na quantidade como na qualidade.

Sendo baseada num trabalho de Equipa, a apresentação de uma Dissertação não deixa de ser também um acto isolado, produto de uma reflexão sobre um tema e a sua apresentação perante um Júri, que o candidato deseja também cumprimentar com deferência e consideração.

**palavras-chave**

Carcinoma, nasofaringe, vírus Epstein-Barr, epidemiologia, apresentação clínica, classificação TNM, classificação OMS, sobrevivência, polimorfismo genético.

**resumo**

Após uma revisão de aspectos filogénicos, ontogénicos e embriológicos contribuindo para a estruturação anatómica e fisiológica da nasofaringe, é efectuada uma análise das características clínicas do carcinoma da nasofaringe numa população portuguesa, comparando-as com a literatura. É efectuada análise de taxa de incidência da doença, razão de géneros, frequência relativa dos diversos subtipos de acordo com a classificação OMS, acuidade relativa dos estadiamentos TMN e sobrevivência em função do tratamento.

A relação entre carcinoma da nasofaringe e infecção pelo vírus de Epstein – Barr em Portugal é estudada através da análise de detecção de DNA de EBV em tecido tumoral da nasofaringe e sangue periférico de doentes com NPC e em indivíduos saudáveis. São também efectuados estudos caso-controlo no sentido de perspectivar a relevância de dois polimorfismos genéticos na susceptibilidade genética para a doença.

Esta Dissertação pretende ainda contribuir para a compreensão dos mecanismos biológicos de CN e a sua relação com o EBV numa região não endémica de baixo risco, como é Portugal, realçando a relevância da definição de um perfil biológico preditivo para o desenvolvimento de CN na população portuguesa.

**keywords**

Epstein-Barr virus, neoplasia, nasopharynx, epidemiology, clinical presentation, TNM classification, WHO classification, survival , genetic polymorphism.

**abstract**

A revision is made, concerning several filogenic, ontogenic and embryogenic factors contributing to the anatomic and physiologic structure of the nasopharynx . Then, the nasopharyngeal carcinoma patterns in a portuguese population are comparatively analyzed with a review of the related literature, concerning the overall incidence, male/female ratio, age of incidence, WHO type frequency, stage.

The relationship between nasopharyngeal carcinoma and previous Epstein – Barr virus infection in Portugal, is evaluated in a hospital-based study that analyzes the presence of EBV in nasopharyngeal tumor tissues and in peripheral blood of nasopharyngeal cancer patients and healthy individuals. Other case-control studies analyze the relevance two genetic polymorphisms on the genetic susceptibility to this disease.

With this Dissertation, we pretend to contribute for the understanding of the biological mechanisms of NC and its correlation with EBV infection in a low risk, no endemic region like Portugal, stressing the relevance of these results in the definition of a biologic predictive profile for the development of NC within our population.

Ao abrigo do Artigo 8º do Decreto-Lei nº 388/70 os seguintes artigos já publicados e que se encontram agrupados no capítulo 8 (Artigos Publicados ou em Publicação), fazem parte integrante desta dissertação:

**1 Nasopharyngeal carcinoma study: introduction and multidisciplinary perspective.**

Breda E, Catarino R, Coelho A, Sousa H, Medeiros R. Acta Med Port. 2008 May-Jun;21(3):273-84.

**2 Characterization of the clinical evolution of nasopharyngeal carcinoma in Portuguese population.**

Breda E, Catarino R, Azevedo I, Fernandes T, Barreira da Costa C, Medeiros R. Acta Otorrinolaringol Esp. 2007 May; 58(5):191-7.

**3 Nasopharyngeal carcinoma in a south european population: epidemiological and clinical aspects in Portugal.**

Breda E, Catarino R, Medeiros R. Eur Arch Otorhinolaryngol. 2010 Oct;267(10):1607-12. Epub 2010 May 8

**4 Detecção de Epstein-Barr virus no carcinoma da nasofaringe – implicações numa área de baixo risco.**

Breda E, Catarino R, Azevedo I, Lobão M, Monteiro, Coelho A, Matos A, Lopes C, Medeiros R. Braz J Otorhinolaryngol 2010 Jun;76 (3):310-5.

**5 Oncogenic virus-associated neoplasia: a role for cyclin D1 genotypes influencing the age of onset of disease?**

Catarino R, Pereira D, Breda E, Coelho A, Matos A, Lopes C, Medeiros R. Biochem Biophys Res Commun. 2008 May 23;370(1):118-22.

**6 Linkage of TP53 codon 72 pro/pro genotype as predictive factor for nasopharyngeal carcinoma development.**

Sousa H, Santos AM, Catarino R, Pinto D, Vasconcelos A, Lopes C, Breda E, Medeiros R. Eur J Cancer Prev. 2006 Aug;15(4):362-6.

**7 Association of the A870G cyclin D1 gene polymorphism with genetic susceptibility to nasopharyngeal carcinoma.**

Catarino RJ, Breda E, Coelho V, Pinto D, Sousa H, Lopes C, Medeiros R. Head Neck. 2006 Jul;28(7):603-8.



São também alvo de referência nesta Dissertação os seguintes artigos, que foram submetidos para publicação e se encontram também agrupados no capítulo 8 (Artigos Publicados ou em Publicação):

**1 Role of IL-1RN VNTR polymorphism in genetic susceptibility to viral associated neoplasias.**

Sousa H, Breda E, Santos AM, Catarino R, Pinto D, Moutinho J, Machado JC, Lopes C, Medeiros R. Submetido em Maio de 2010 na revista Molecular Carcinogenesis. Código de fluxo MC-10-0120.

**2 Role of MDM2 SNP 309 polymorphism in the initiation and early age of onset of nasopharyngeal carcinoma.**

Sousa H, Pando M, Breda E, Catarino R, Medeiros R.

Mol Carcinog. 2010 Dec 10. [Epub ahead of print] PMID: 21154755

**3 Tumour Necrosis Factor Alpha -308 G>A polymorphism: a genetic risk marker for Nasopharyngeal Carcinoma in Portugal.**

Sousa H, Breda E, Santos AM, Catarino R, Pinto D, Lopes C, Medeiros R.

DNA Cell Biol. 2010 Sep 28. [Epub ahead of print] PMID: 20874489

# Índice Temático

<b>1 Introdução</b>	1
1.1 A Nasofaringe: aspectos filogenéticos, embriológicos e anatómicos	3
<b>1.2 O Carcinoma da Nasofaringe</b>	7
1.2.1 Classificação da Organização Mundial de Saúde (OMS)	8
1.2.2 Apresentação Clínica	10
1.2.3 Caracterização Epidemiológica do CN	13
<b>1.3 O Vírus Epstein-Barr: mecanismos de infecção e formas de expressão molecular</b>	17
<b>1.4 Processo de carcinogénese e alterações cromossómicas associadas a CN</b>	21
<b>2 Objectivos</b>	23
2.1 Gerais	25
2.2 Específicos	25
<b>3 Material e Métodos</b>	27
3.1 Amostragem Clínica	29
3.2 Selecção de amostras para estudo de DNA vírico	31
3.3 Selecção de amostras para estudo de polimorfismos genéticos	35
3.3.1 Identificação do risco de CN associado ao polimorfismo do TP53	35
3.3.2 Identificação do risco de CN associado ao polimorfismo da Ciclina D1	37
3.3.3 Avaliação da influência do polimorfismo da Ciclina D1 na idade de aparecimento de duas neoplasias relacionadas com vírus	38
<b>4 Resultados</b>	39
4.1 Caracterização do CN em doentes do Norte de Portugal	41
4.1.1 Caracterização histológica do CN	41
4.1.2 Apresentação Clínica	41
4.1.3 Análise de sobrevivência	42
4.2 Estudo da relação do EBV com CN em Portugal	47
4.3 Estudo de polimorfismos genéticos associados a CN	49
<b>5 Discussão</b>	53
5.1 Perspectiva comparativa das características epidemiológicas e clínicas do CN em Portugal	55
5.2 Relação CN – EBV em Portugal	65
5.3 Estudo de polimorfismos genéticos associados a CN em Portugal	67
<b>6 Conclusões e Perspectivas Futuras</b>	69
<b>7 Referências Bibliográficas</b>	73
<b>8 Artigos Publicados ou em Publicação</b>	89

## Índice de Figuras

<b>FIGURA</b>	<b>LEGENDA</b>	<b>PÁG</b>
Figura 1	Crânio (corte sagital) mostrando a nasofaringe (adaptado de [12])	5
Figura 2 (A e B)	Aspectos endoscópicos de carcinoma da nasofaringe, por rinoscopia posterior (A) e transoral (B)	7
Figura 3 (A e B)	Carcinoma escamoso queratinizante. Coloração HE, 100X (A), 400X (B)	8
Figura 4 (A, B e C)	Carcinoma não queratinizante, indiferenciado. Coloração HE 100X (A), 400X (B), citoqueratina 100X (C)	9
Figura 5 (A e B)	Metástases cervicais de CN	10
Figura 6 A	Incidência mundial de cancro da nasofaringe nos homens em 2002 (adaptado de [38]).	13
Figura 6 B	Incidência mundial de cancro da nasofaringe nas mulheres em 2002 (adaptado de [38]).	13
Figura 7	Estrutura do Epstein-Barr vírus (adaptado de [68]).	17
Figura 8	Estrutura génica do epissoma vírico (adaptado de [80]).	17
Figura 9	Distribuição etária dos doentes com CN do IPO-Porto.	41
Figura 10	Distribuição do género dos doentes com CN do IPO-Porto	41
Figura 11	Distribuição do primeiro sintoma ou sinal de doença dos doentes com CN do IPO-Porto.	42
Figura 12	Sobrevivência global dos doentes com CN	43
Figura 13	Sobrevivência aos 10 anos dos doentes com CN do IPO-Porto, de acordo com o estadiotumoral	43
Figura 14 A	Sobrevivência aos 10 anos dos doentes com CN do IPO-Porto, de acordo com o estadiotumoral com estadiamento UICC de 1978.	44
Figura 14 B	Sobrevivência aos 10 anos dos doentes com CN do IPO-Porto, de acordo com o estadiotumoral com estadiamento AJCC de 1987	44
Figura 15	Sobrevivência aos 10 anos dos doentes com CN do IPO-Porto, de acordo com o tipo de tratamento	45
Figura 16	Sobrevivência aos 10 anos dos doentes com CN do IPO-Porto, de acordo com o tipo de tratamento de quimioterapia.	45
Figura 17	Análise do tempo para aparecimento de neoplasias associadas a infecção viral (cancro do colo do útero e da nasofaringe), de acordo com o polimorfismo <i>CCND1</i> A879G.	50

## Índice de Quadros

QUADRO	LEGENDA	PÁG
Quadro I	Classificação TNM AJCC 2002	11
Quadro II	Agrupamento por Estádios de acordo com a classificação AJCC 2002	12
Quadro III	Resultado da detecção de EBV no grupo controlo e nos grupos de doentes com carcinoma da nasofaringe de acordo com o tipo de amostra	47
Quadro IV	Associação dos génotipos do codão 72 do <i>TP53</i> com CN	49
Quadro V	Prevalência e "odds ratio" dos génotipos <i>CCND1</i> em doentes com CN e Grupo de controlo	50

## Principais Abreviaturas

CCND1	Proteína ciclina D1
CDK4	Cinase ciclina dependente
CN	Carcinoma da nasofaringe
C3d	Receptor 3 <sup>d</sup> complemento
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EBV	Vírus de Epstein-Barr
EBER	RNA do EBV
EBNA	Antigénio nuclear associado ao EBV
Ig	Imunoglobulina
LCL	Células linfoblastoides imortalizadas
LMP	Proteína latente de membrana
ICAM	Molécula de adesão intercelular
INE	Instituto Nacional de Estatística
OMS	Organização Mundial de Saúde
PCR	Reacção de polimerase em cadeia
pb	pares de base
<i>pRB</i>	Proteína do retinoblastoma
<i>RASSF1A</i>	Proteína da família RAS
RNA	Ácido ribonucleico
TNF	Factor de necrose tumoral
TRAF	Factor associado ao TNF

## **1. Introdução**



# 1. Introdução

## 1.1 A Nasofaringe: aspectos filogenéticos, embriológicos e anatómicos

Nasofaringe, rinofaringe ou espaço pós-nasal são termos que retratam a ubiquidade de uma estrutura anatómica que ainda hoje se discute dever ser descrita ou não juntamente com a cavidade nasal ou com a faringe propriamente dita.

Um sem número de aspectos filogénicos, ontogénicos e embriológicos contribuem para a estruturação anatómica e fisiológica desta entidade, de que resultam implicações patológicas de toda a ordem, quer directamente, como é o caso da patologia embriológica, quer de forma indirecta e interactiva com o meio, de que são exemplos as patologias inflamatória e neoplásica, cuja expressão mais relevante é o carcinoma de tipo nasofaríngeo.

Numa rápida retrospectiva filogenética desta região, será relevante lembrar que tanto nos cordados como mesmo nos primeiros vertebrados, a comunicação com o exterior era comum, partilhada pelo tracto digestivo e respiratório. Na era aquática da sua evolução, as duas funções estavam intimamente associadas, sendo o oxigénio dissolvido e as partículas em suspensão absorvidas ou filtradas a partir da corrente de água entrando pela mesma abertura, a boca, e saindo via aparelho branquial, numa reminiscência do que é ainda utilizado por vertebrados actuais como as baleias e lampreias. A formação e sustentação da mandíbula e a separação da cavidade oronasal com formação da coana primitiva, são passos evolutivos fundamentais na diferenciação dos aparelhos digestivo e respiratório [1].

As posições anatómicas relativas entre o aparelho digestivo e o respiratório humano, lembram esta dualidade, já que a cavidade nasal se coloca dorsalmente em relação à cavidade oral "digestiva", mas a laringe diverge ventralmente da faringe.

É ainda interessante do ponto de vista filogenético a relação com aspectos da evolução do córtex cerebral ao longo das espécies primatas, traduzida no desenvolvimento do córtex cerebral, separado das restantes estruturas do sistema nervoso central pela tenda do cerebelo.

O desenvolvimento do lobo occipital, associado ao bipedalismo [2], não deixaria indiferentes as estruturas infratentoriais sujeitas a uma sobrecarga gravitacional,

com consequente rotação inferior e posterior em direcção ao foramen magnum. Estas evoluções filogenéticas têm enorme impacto na configuração do conjunto craniofacial e, consequentemente, da nasofaringe.

Embriologicamente, o revestimento da totalidade da faringe e grande parte das fossas nasais tem origem comum, derivando na extremidade cefálica do intestino primitivo, de um fundo de saco forrado por tecido endodérmico, separado pela membrana bucofaríngea do stomatodaeum, de origem ectodérmica [3]. Entre o stomatodaeum e a membrana bucofaríngea, desenvolve-se cefalicamente um recesso (bolsa de Rathke) que dará origem à adeno-hipófise, através da proliferação do mesênquima periplacodal. Entretanto, o intestino primitivo invagina-se progressivamente em direcção ao cérebro [4], formando a bolsa de Seessel. Seguidamente dá-se a ruptura da membrana bucofaríngea, o que permite a comunicação do intestino faríngeo com a cavidade celómica extra-embriónica, o que acontece pela 4ª semana de gestação.

No seguimento da embriogénese da nasofaringe podemos considerar que o seu suporte músculo-esquelético se encontra dependente da evolução embriológica do viscerocrânio por um lado e do neurocrânio por outro [5]. Do viscerocrânio depende o desenvolvimento dos arcos faríngeos ou branquiais, bolsas de mesoderme revestidas de um lado por ectoderme e de outro por endoderme. Do neurocrânio desenvolvem-se as estruturas cranianas. São derivadas da crista neural, de origem ectodérmica (crânio pré-cordal) e também da mesoderme para-axial e lateral (crânio cordal), através de transformação mesenquimatosas, com posterior ossificação membranosa ou endocondral [6]. A base do crânio tem uma osteogénese predominantemente do tipo endocondral.

A morfologia da cavidade nasofaríngea fica assim na dependência do harmonioso desenvolvimento craniofacial, efectuado a partir do neurocrânio, que representará a sua parede fixa superior e posterior, e do viscerocrânio, dependente dos arcos branquiais que representarão não só as suas paredes laterais dotadas de uma mobilidade complexa, como também o limite anterior, nomeadamente o complexo nasomaxilar. Deste depende a formação das invaginações palatomaxilares, que separarão finalmente a cavidade oronasal [7]. É um período em que o crescimento craniofacial se dá predominantemente no sentido sagital, com aumento das dimensões verticais e antero-posteriores em detrimento da transversal, e em que é marcante o desenvolvimento da cartilagem de Meckel.



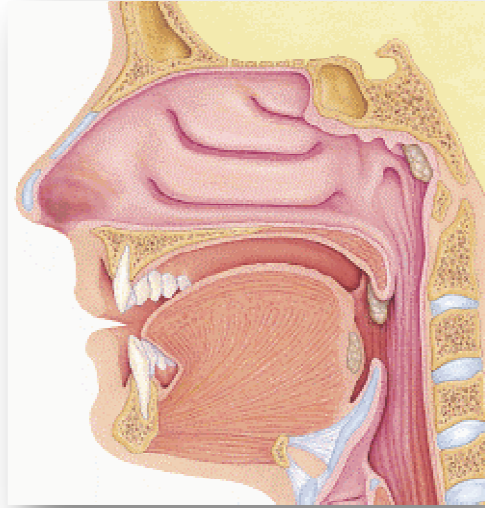


Figura 1  
Crânio (corte sagital) mostrando a nasofaringe  
(adaptado de [12]).

Anatomicamente a nasofaringe é, na generalidade dos mamíferos [8] e também no recém-nascido humano [9], uma estrutura trapezoidal oca, grosseiramente tubular. Contudo no “homo-erectus” adulto foi alvo de torção, apresentando um ângulo diedro variável, em média de 128 graus (Figura 1). Tem cerca de 4cm a 5,5cm de diâmetro

transverso, 2,5cm a 3,5cm de

diâmetro antero-posterior e 4cm de altura [10]. É relevante registrar que a fusão da sincondrose esfenobasilar, responsável pelo crescimento pós-nasal da base do crânio [11], ocorre entre os 12 – 14 anos no sexo feminino e entre os 13,5 – 15 anos no sexo masculino. A sua parede anterior é aberta continuando-se com a “coana” e apresenta um complexo mecanismo esfinteriano e valvular no seu limite inferior, que permite a comunicação com a orofaringe. As paredes faríngeas são formadas por quatro camadas tecidulares [3, 6]: membrana mucosa, fáscia faringo-basilar, camada muscular, fáscia bucofaríngea.

O revestimento mucoso da nasofaringe é constituído basicamente por tecido cilíndrico pseudo-estratificado ciliado. Dispõe de abundante tecido linfóide nomeadamente na sua parede postero-superior.

A fáscia faringo-basilar está superiormente firmemente fixa à porção basilar do osso occipital e apex petroso do temporal, fazendo a ponte entre o bordo superior do músculo constritor superior da faringe e a base do crânio, local onde se torna indissociável da membrana bucofaríngea.

A camada muscular que envolve a nasofaringe é composta principalmente pelo músculo constritor superior da faringe. Algumas das suas fibras inserem-se anteriormente na parte superior da aponevrose palatina constituindo a crista de Passavant que corresponde funcionalmente ao esfíncter palatofaríngeo.

A fáscia bucofaríngea é uma camada fina e fibrosa que reveste externamente a musculatura faríngea e está ligada à fáscia pré-vertebral, entre as quais se encontra o espaço virtual retro-faríngeo [3], o qual para alguns autores é já uma das subdivisões do espaço para-faríngeo[13]; contém tecido areolar e gânglios linfáticos da cadeia retro-faríngea. O espaço para-faríngeo propriamente dito, designado latero-faríngeo

pelos mesmos autores, encontra-se lateralmente à fáscia bucofaringea e anteriormente em relação à fáscia pre-vertebral. É um espaço potencial [6, 11], em forma de pirâmide pentagonal invertida, que se estende da base do crânio ao osso hióide; comunica superiormente com as estruturas endocranianas através dos múltiplos orifícios que se abrem na base do crânio, dando na maioria, passagem a importantes estruturas vasculares e nervosas, nomeadamente o nervo mandibular, a artéria meníngea média e ramo meníngeo do nervo mandibular, a artéria carótida interna, a veia jugular interna, nervos vago, glossofaríngeo e acessório e ainda o nervo hipoglosso. Mais inferiormente contém os gânglios cervicais profundos superiores [14].

As paredes da nasofaringe possuem, como anteriormente se evidenciou, relações importantes com o sistema linfático tanto do ponto de vista anatómico como funcional. A drenagem linfática [6, 15] é efectuada principalmente para os gânglios retrofaríngeos, mediano e laterais, que se situam entre as fâscias faríngea e pré-vertebral.

A nasofaringe é, assim, parte integrante das vias aero-digestivas superiores e tem relações privilegiadas com o sistema auditivo através do tubo faringo-timpânico de Eustáquio, e portanto a forma de apresentação clínica da sua patologia nomeadamente oncológica depende em grande parte das alterações induzidas nestes órgãos de vizinhança, com semiologia clínica muito mais rica. A sua relação estreita com o sistema linfático também é relevante nessa forma de apresentação.

## 1.2 O Carcinoma da Nasofaringe

O carcinoma nasofaríngeo (CN) representa mais de 90% das neoplasias desta região anatômica [16] (Figuras 2A e 2B). Tem origem nas células do epitélio da nasofaringe, e foi descrito pela primeira vez há pouco mais de cem anos [17], com a apresentação de 14 doentes com este tipo de neoplasia; no entanto, considera-se que a primeira caracterização científica desta patologia ocorreu em 1941 [18].

Na maioria dos casos, a localização inicial do tumor é na fosseta de Rosenmuller,

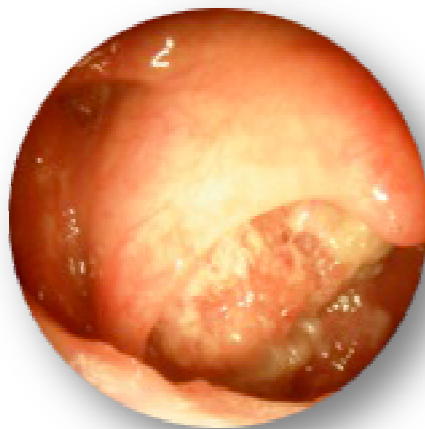
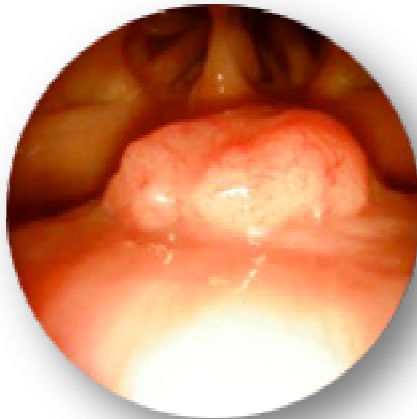


Figura 2 (A e B)  
Aspectos endoscópicos de carcinoma da nasofaringe,  
por rinoscopia posterior (A)  
e transoral (B)

embora alguns autores considerem ser na parede superior [19]. A partir daqui, atinge a cavidade nasal em 15% dos casos, as paredes laterais ou superiores da orofaringe em 20% [20]. Há invasão do espaço para-faríngeo em 80% dos casos e corrosão óssea da base do crânio em 20%, enquanto a extensão intra-craniana propriamente dita ocorre em 10%. No que respeita a metastização linfática, ocorre em 90% dos casos, frequentemente de forma bilateral. A metastização hematogénea é mais rara, entre 5-10%.

Considerando que o grau e tipo de invasão dependem das características de agressividade tumoral, não é menos verdadeiro que os aspectos embriológicos e anatômicos mencionados explicam também este tipo de disseminação.

O CN apresenta-se com diversos graus de diferenciação, a que parecem corresponder factores etiopatogénicos diferentes.

### 1.2.1 Classificação da Organização Mundial de Saúde (OMS)

As diferentes denominações atribuídas a esta neoplasia ao longo do tempo evidenciam alguma controvérsia sobre o seu tecido de origem. A designação “linfoepitelioma”, introduzida em 1921 independentemente por Regaud, privilegiando o seu aspecto carcinomatoso, e por Schmincke, valorizando a aparência do estroma [21], é ainda frequentemente utilizada, embora a Organização Mundial de Saúde (OMS) em 1978

tenha enfatizado a sua natureza epitelial [22-23].

Nesta data, a OMS classificou os carcinomas da nasofaringe em três subtipos histológicos: Tipo I, carcinoma de células escamosas queratinizante;

Tipo II, carcinoma não queratinizante e Tipo III, carcinoma indiferenciado.

Desde 1991 estas neoplasias são classificadas pela mesma entidade em carcinoma de células escamosas queratinizante (Figura 3 A, B)

e carcinomas não queratinizantes (Figura 4 A, B, C), sendo estes subdivididos em carcinomas diferenciados e indiferenciados [24]. Esta

subclassificação encontra-se justificada pela associação dos carcinomas não queratinizantes (II e III) com um comportamento epidemiológico e clínico que os diferencia dos carcinomas de tipo I, queratinizantes [25].

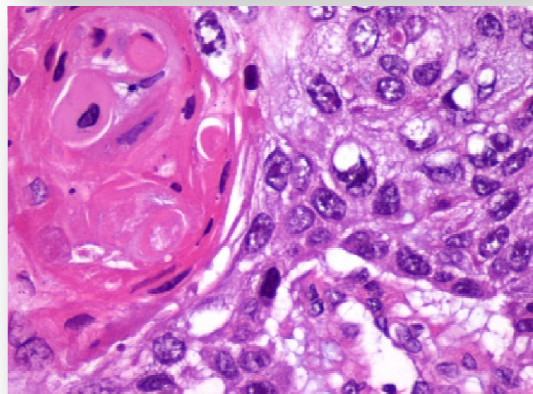
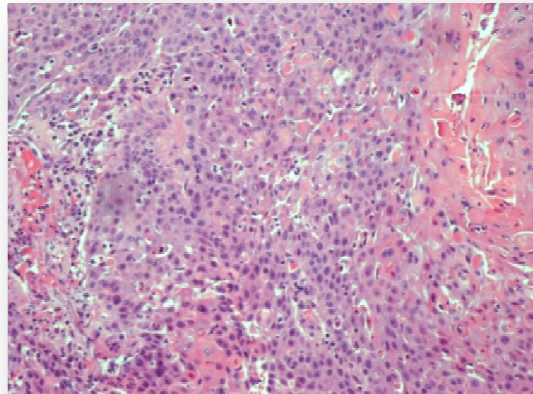


Figura 3 (A e B)  
Carcinoma escamoso queratinizante. Coloração HE, 100X (A), 400X (B)

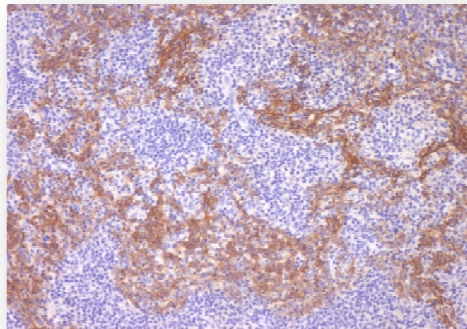
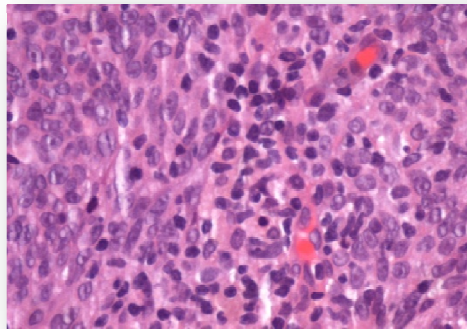
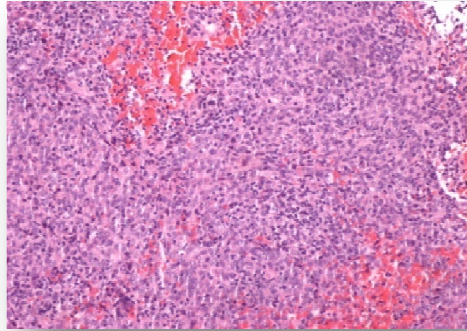


Figura 4 (A, B e C)  
Carcinoma não queratinizante, indiferenciado. Coloração HE 100X (A), 400X (B), citoqueratina 100X (C)

Em 2003, a OMS manteve a classificação dos carcinomas da nasofaringe em carcinoma não queratinizante e escamoso queratinizante, acrescentando a categoria de carcinoma de células escamosas basaloide[26]. No entanto, a classificação da OMS de 1978 é a que mais frequentemente se encontra referenciada nos dados bibliográficos disponíveis.

## 1.2.2 Apresentação Clínica

Os doentes com CN apresentam sintomas relacionados com a invasão das estruturas anatómicas de vizinhança, que se podem dividir em:

- 1 Por invasão anterior: sintomas nasais – epistáxis, obstrução respiratória, rinorreia
- 2 Por invasão lateral, da trompa de Eustáquio e/ou espaço para-faríngeo – hipoacusia, sensação de plenitude aurial, hipoacusia com autofonia, acufenos
- 3 Por invasão superior e posterior com comprometimento das estruturas nervosas da base do crânio – cefaleias, diplopia, dor e alteração da sensibilidade facial
- 4 Por disseminação linfática – adenopatias cervicais (usualmente da área II)



Figura 5 (A e B)  
Metástases cervicais de CN.

Neel e colaboradores [27], numa revisão de 151 doentes norte-americanos, referia que 46% dos pacientes apresentavam adenopatia unilateral e 22% bilateral como sintoma de apresentação da doença, 30% tinha sintomas nasais e 20% sintomas neurológicos.

Outros autores referem quadro clínico semelhante, em que os sintomas de apresentação são a adenopatia cervical que ocorre em 85% dos casos [28], frequentemente bilateral, a epistáxis e obstrução nasal, a diminuição da audição por otopatia seromucosa, a diplopia por atingimento do VI<sup>o</sup> par craneano e ainda outros compromissos neurológicos [29].

William Wei e colaboradores [30], numa revisão de 4768 doentes, referem que o quadro clínico de apresentação da doença (sem a preocupação de referenciar a queixa inicial) era em 76% dos doentes adenopatia cervical, 73% disfunção nasal, 62% disfunção otológica, sendo os restantes sintomas muito menos frequentes.

O estadiamento TNM (tumor, gânglio “node”, metástase) é um processo de categorização das neoplasias de uma forma sistematizada, permitindo uma melhor

avaliação comparativa do estado de evolução da patologia, prognóstico e forma de tratamento adequado a cada situação clínica. Toda a informação clínica pode ser usada: exame físico, achados radiográficos, intra-operatórios e histopatológicos. No entanto, os marcadores moleculares não são ainda considerados nos tumores da cabeça e pescoço. Ao contrário do que acontece nas restantes áreas anatómicas, a presença de adenopatia só por si não basta para classificar um CN como doença avançada [31].

A classificação TNM tem vindo a ser actualizada periodicamente, num esforço de adequação às novas tecnologias de diagnóstico e estudos de sobrevivência. Embora a última classificação TNM para a nasofaringe editada em 2010, seja obviamente a mais actual, esta não é considerada neste trabalho, já que o universo de doentes aqui considerado finaliza em 2005, transcrevendo-se nos Quadros I e II a classificação anterior (2002), que é de resto a analisada por toda a bibliografia disponível.

### **Quadro I** **Classificação TNM AJCC 2002**

---

#### **T Tumor Primário**

##### *Nasofaringe*

T1	Tumor confinado à nasofaringe
T2	Tumor que se estende às partes moles
T2a	Tumor que se estende à orofaringe e/ou cavidade nasal sem extensão parafaríngea*
T2b	Tumor com extensão parafaríngea*
T3	Tumor que invade estruturas ósseas e/ou seios paranasais
T4	Tumor com extensão intracraniana e/ou envolvimento de nervos cranianos, fossa infratemporal, hipofaringe, órbita ou espaço mastigador

Nota: \* A extensão parafaríngea indica infiltração póstero-lateral do tumor além da fáscia faringo-basilar

#### **N Gânglios Regionais**

##### *Nasofaringe*

NX	Os gânglios regionais não podem ser avaliados
N0	Ausência de metástases nos gânglios regionais
N1	Metástase unilateral em gânglio (s), com 6 cm ou menos em sua maior dimensão, acima da fossa supraclavicular
N2	Metástase bilateral em gânglio (s) com 6 cm ou menos em sua maior dimensão, acima da fossa supraclavicular
N3	Metástase em gânglio (s) com mais de 6 cm em sua maior dimensão ou em fossa supra-clavicular
	N3a com mais de 6 cm em sua maior dimensão
	N3b na fossa supra-clavicular

Nota: Os gânglios de linha média são considerados gânglios homolaterais

#### **M Metástase à Distância**

MX	A presença de metástase à distância não pode ser avaliada
M0	Ausência de metástase à distância
M1	Metástase à distância

---

De qualquer modo a grande diferença está na valorização da disseminação local na data de diagnóstico, passando o simples atingimento da cavidade nasal e orofaringe a ser estadiado como T1 e não como T2.

**Quadro II**  
**Agrupamento por Estádios de acordo com a classificação AJCC 2002**

<i>Nasofaringe</i>			
Estádio 0	Tis	N0	M0
Estádio I	T1	N0	M0
Estádio IIA	T2a	N0	M0
Estádio IIB	T1	N1	M0
	T2a	N1	M0
	T2b	N0, N1	M0
Estádio III	T1	N2	M0
	T2a	N2	M0
	T2b	N2	M0
	T3	N0, N1, N2	M0
Estádio IVA	T4	N0, N1, N2	M0
Estádio IVB	Qualquer T	N3	M0
Estádio IVC	Qualquer T	Qualquer N	M1

A falta de especificidade das queixas parece ser a razão para que frequentemente o diagnóstico seja efectuado em fases já avançadas da doença (estádios III e IV), com conseqüente compromisso da taxa de sobrevivência, que se estima em cerca de 60% [32]. No entanto, um exame objectivo cuidadoso, recorrendo sempre que necessário a endoscopia com fibra óptica, permite efectuar o diagnóstico clínico com elevado grau de certeza, o qual deve ser comprovado por exame histológico de tecido colhido por biópsia.



### 1.2.3 Caracterização Epidemiológica do CN

O CN tem uma distribuição geográfica mundial, mas muito diferenciada, sendo mais frequente no sudoeste asiático (30-80-100.000 pessoas/ano), onde é considerado endêmico, sendo relativamente raro nas populações americana e europeia (1-100.000 pessoas/ano) [33-35]. Taxas de incidência intermédias (8-12/100000) ocorrem em alguns países mediterrânicos e africanos [36], e ainda em populações (inuitas) da Groenlândia e Alasca e de Singapura e Malásia [37] (Figura 6 A, B).

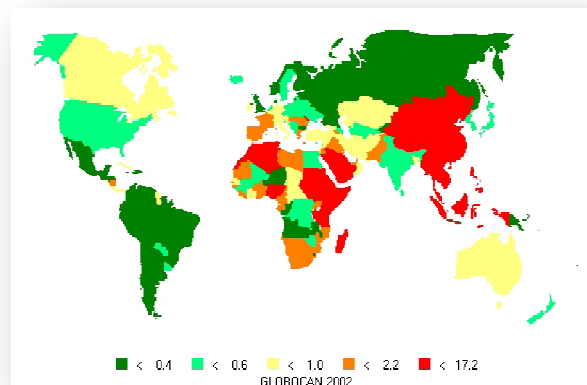


Figura 6 A  
Incidência mundial de cancro da nasofaringe nos homens em 2002 (adaptado de [38]).

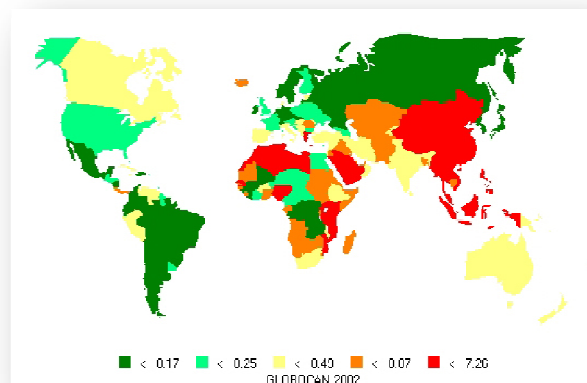


Figura 6 B  
Incidência mundial de cancro da nasofaringe nas mulheres em 2002 (adaptado de [38]).

Esta neoplasia atinge predominantemente o adulto jovem (40-50 anos) e o sexo masculino, na razão de 2-3:1; no norte de África está descrita uma distribuição etária bimodal, com um pico acentuado cerca dos 50 anos, e um outro, menos marcado cerca dos 10-25 anos [39]. Considerando todos os tumores da nasofaringe, a frequência relativa dos carcinomas não queratinizantes (tipo II-III da OMS / 1978)

varia de 75% a 95%, de acordo com a sua distribuição geográfica e taxa de incidência [40], podendo ser exceção a população branca não hispânica nascida nos EUA, na qual Marks e colaboradores [41], numa revisão de 5069 casos de CN provenientes do National Cancer Data Base, encontraram 75% de carcinomas queratinizantes. Do mesmo estudo resultava ainda que os tipos II e III (OMS / 1978) ocorreriam em idades mais precoces, teriam períodos livres de doença após tratamento mais longos e melhor sobrevivência, mas também metástases cervicais mais precoces e de pior significado prognóstico. Os tipos II e III da OMS /1978 apresentar-se-iam como

tumores localmente mais pequenos, submucosos e difíceis de detectar, por vezes clinicamente ocultos, parecendo apresentar maior sensibilidade a terapêutica com radiação que os de tipo I, os quais teriam maior tendência para recorrer ou persistir localmente após tratamento [30, 41].

Por outro lado, qualquer que seja a população considerada, existe uma associação comprovada entre os carcinomas não queratinizantes (tipos II e III da OMS /1978) e a ocorrência prévia de infecção pelo vírus de Epstein-Barr (EBV), com sequente imortalização do mesmo nos linfócitos B do hospedeiro [42]. Esta relação CN-EBV foi inicialmente baseada em estudos serológicos pela constatação da presença de títulos elevados de anticorpos para o vírus nos soros destes doentes, assumindo particular significado o IgA anti-VCA e o IgG anti-EA [43]. Posteriormente, estudos de hibridização "*in-situ*" demonstraram genoma do vírus no interior das células tumorais do CN [44-45]. Em Portugal, estudos de PCR documentavam também esta relação [46]. Apesar de não estarem completamente compreendidos os eventos precoces desta infecção bem como os mecanismos de transformação maligna, está geralmente aceite que o genoma monoclonal do EBV já está presente pelo menos nas lesões displásicas de alto grau [42].

No entanto, outros factores endógenos e exógenos estão indubitavelmente associados ao CN. Assim, é sabido que o passado genético pode influenciar o início do CN. Foram documentados «clusters» familiares da doença em populações chinesas [47], e o estudo de diversos polimorfismos de genes sugerem influência na susceptibilidade para CN (citocromo metabolizadores de nitrosaminas P450 2A6 (CYP2A6) [48], P450 2E1 (CYP2E1) [49] e P450 2F1 (CYP2F1) [50], glutathione S-transferase M1 (GSTM1) [51], XRCC1 (codões 194 arg-trp) [52], TP53 [53-54] e ciclina D1 [55]).

Factores ambientais e hábitos dietéticos são também associados ao CN. Um dos factores mais conhecido é o consumo de peixe salgado seco [56], contendo precursores das nitrosaminas e outras substâncias activadoras do EBV [57-58]. É também referido haver relação entre a exposição profissional inalatória a pó de madeira [59-60], e o aumento do risco de CN, o que estaria relacionado com a inalação de clorofenois, preservadores da madeira [61]. Hildesheim e colaboradores [62], num estudo caso-controlo envolvendo 375 casos de CN e 375 controlos, demonstrou uma associação estreita entre a exposição a este tipo de pó e o risco de

CN, mais acentuado para indivíduos expostos antes dos 25 anos e positivos para anticorpos anti-EBV.

A epidemiologia dos CN sugere, portanto, múltiplos determinantes, incluindo susceptibilidade genética, agentes dietéticos, inalantes e víricos. A relação entre CN e os hábitos alcoólicos e tabágicos, não parece ter a relevância apresentada nos carcinomas espinocelulares da cabeça e pescoço, mesmo da variante queratinizante (I) [63-64]. Yuan e colaboradores [65], num estudo em populações chinesas de Shangai, envolvendo 935 doentes com CN e 1032 controlos, concluíam que 12% dos casos de CN poderiam ser atribuídos a fumo de tabaco. A maioria dos estudos epidemiológicos sobre os factores determinantes para CN são efectuados nas populações de alto risco, não sendo fácil aceder a estudos efectuados em populações de menor risco de doença.



### 1.3 O Vírus Epstein-Barr, mecanismos de infecção e formas de expressão molecular

Primeiramente descrito por Sir M. Anthony Epstein e Dr<sup>a</sup> Yvonne Barr em 1964 [66], o EBV é um Gamma Herpes-vírus da família dos Linfocriptovirus, taxonomicamente denominado Virus Herpes Humano 4, sendo este o seu hospedeiro natural exclusivo. O genoma viral encontra-se no interior de um nucleocapsídeo icosaédrico [67], revestido por um invólucro proteico denominado tegumento, que contém também moléculas de mRNA vírico; este, por sua vez, é envolvido por um envelope lipídico, caracterizado por apresentar numerosas saliências glicoproteicas (Figura 7).

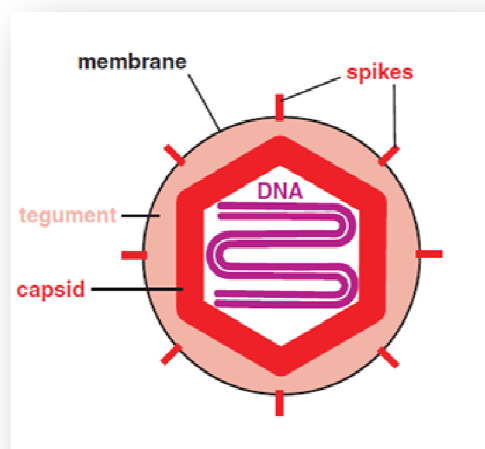


Figura 7  
Estrutura do Epstein-Barr vírus (adaptado de [68]).

CN [69]. A sua relação com outras entidades, nomeadamente o Granuloma Letal da

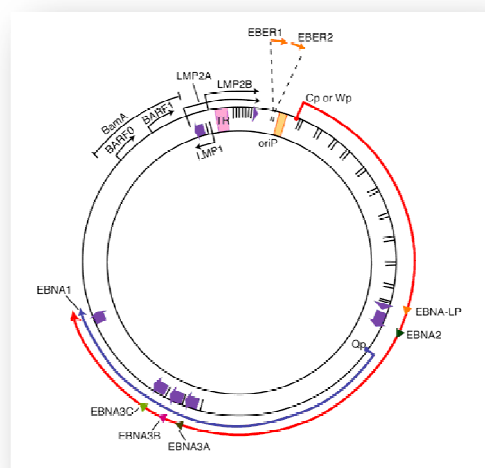


Figura 8  
Estrutura genética do epissoma vírico  
(adaptado de [80])

O EBV encontra-se distribuído mundialmente; a infecção primária é habitualmente adquirida na infância e 90% dos adultos são portadores, já que o vírus persiste de uma forma latente nos linfócitos B periféricos. É o agente causador da Mononucleose Infecciosa, e é também conhecido pela sua associação com o Linfoma de Burkitt e o CN [69]. A sua relação com outras entidades, nomeadamente o Granuloma Letal da Linha Média [70], "Linfoepiteliomas" do Timo [71], e do Pulmão [72], bem como com alguns tumores das Glândulas Salivares [73], e Cervix Uterino [74] é também conhecida há vários anos. A associação com a variante indiferenciada de Carcinoma Gástrico [75] e doenças linfoproliferativas pós-transplante [76] foi também descrita.

O genoma do EBV consiste numa cadeia dupla de DNA linear de 172-kbp, com uma só distribuição génica com repetições terminais (TR) de 0.5-kbp e várias repetições internas, que dividem o genoma em sequências curta e longa. Cada genoma tem TR idênticas, de dimensões iguais [77] (Figura 8). Sempre que o EBV estabelece uma infecção latente numa célula em proliferação, o genoma persiste como epissoma que tem um número de TR característico desta célula infectada, e todas as células dessa linhagem terão o mesmo número de TR. Este identificará a sua origem monoclonal, ou seja, a expansão clonal de uma só célula infectada pelo vírus. Assim acontece no CN [78], e esta infecção ocorre precocemente na evolução da doença, sendo possível detectá-la em lesões pré-invasivas [79].

O EBV infecta as células que expressam o CD21 (receptor C3d), o que inclui linfócitos B e T. A infecção do epitélio, nomeadamente a nível da orofaringe, parece também comprovada, mas ocorre de forma pouco eficaz e por mecanismos não totalmente esclarecidos [81].

Nos linfócitos B a infecção é latente, o genoma do vírus toma a forma de um epissoma no núcleo celular, formando "in-vitro" uma linha celular de células linfoblastoides imortalizadas (LCL). Nestas LCL encontram-se múltiplas cópias extracromossómicas do epissoma vírico, incluindo 11 produtos génicos codificados pelo EBV nomeadamente, proteínas nucleares (EBNA1, 2, 3A, 3B, 3C, LP), proteínas de membrana (LMP1, 2A e 2B) e RNA nuclear (EBER-1 e -2) [82].

O estado de latência pode-se expressar de diferentes modos, e algumas patologias relacionadas com o EBV estão associadas caracteristicamente a determinada forma de expressão vírica [83]. Esta variação levou a uma classificação em três tipos fenotípicos, tendo todos em comum a expressão da EBNA1, a única que se evidencia no Linfoma de Burkitt (Latência tipo I) [84]. O Linfoma de Hodgkin e o CN expressam a EBNA1, a LMP1, mas não a EBNA2 (Latência tipo II) [85] e as LCL das Doenças Linfoproliferativas associadas à imunossupressão e imunodeficiência apresentam-se fenotipicamente com EBNA1, LMP1 e EBNA2 (Latência tipo III) [85]. No estado de latência, a proteína EBNA 1 permite a permanência do genoma do EBV como epissoma extra-cromossómico [86], interagindo com uma determinada região do cromossoma vírico (oriP), enquanto a EBNA2 é necessária para o processo de imortalização linfocitária [87].

O polimorfismo genético do EBNA2 e também do EBNA 3, com diferenças na sequência de nucleotídeos, permitem a classificação do EBV em dois tipos: EBV1 (A) e EBV2 (B)[77]. Esta classificação teria nomeadamente implicações epidemiológicas,

já que o EBV1 predominaria nas comunidades Europeia, Americana e Chinesa [88] enquanto o EBV2 se associa aos CN das populações do Alaska.

No que diz respeito às restantes proteínas do genoma vírico do EBV anteriormente mencionadas, a LMP2A tem papel relevante na manutenção da infecção no estado latente [89], enquanto a LMP1 medeia as alterações fenotípicas dos linfócitos B associadas à infecção pelo vírus [90] e é o único produto génico com actividade transformadora provada também noutras células.

Está demonstrado que a expressão da LMP1 em células epiteliais inibe a diferenciação escamosa, diminui a expressão das citoqueratinas e conduz ao aumento das moléculas de adesão do tipo ICAM 1 e antigénio CD40 [91]. Foi também sugerido que a função da LMP1 seria semelhante à do TNF, tendo-se demonstrado que os factores associados aos receptores do TNF (TRAF) se ligam à terminação citoplasmática carboxil da LMP1 [92]. As moléculas de LMP1 agregam-se na membrana citoplasmática e assim poderiam mimetizar um receptor TNF activo, induzindo uma sinalização intracelular através do NF-kB [92]. A própria estrutura da LMP1 é susceptível de apresentar diversos polimorfismos, entre os quais os que parecem ter maior significado são a deleção de 30 bp perto da região terminal carboxil, associada a maior poder oncogénico "in-vitro", e a mutação no codão 17, de que resulta perda da posição XhoI no primeiro exão, a que corresponde a zona terminal N. Esta alteração, que não modifica a função da LMP1, corresponde à variante C do EBV, por contraposição com a variante D que a não apresenta. Uma outra variante evidencia um segmento de restrição adicional na região Bam HI F. Estas variantes têm ao que parece, significado epidemiológico, tendo o EBV1 Cf maior prevalência na Ásia e o EBV1 DF nos Estados Unidos da América [93].

A abundância de expressão das EBER em qualquer dos tipos de latência, torna estas proteínas de RNA codificado pelo EBV, objecto de estudo no sentido de avaliar a sua importância no diagnóstico de CN, tanto na lesão primária (onde permitiria esclarecer histologias duvidosas provando a existência de genes do EBV no interior da célula tumoral) [94], como nas metástases [95-96], como ainda na recidiva após radioterapia [97].

Periodicamente, a infecção latente expressada pelas proteínas virais referidas, pode converter-se na forma lítica, com secreção de partículas do vírus na saliva do hospedeiro, altura em que se expressam as proteínas BZLF1 e BRLF1 [98]. A relevância da fase lítica de infecção, e consequente resposta inflamatória e

imunológica, nos fenómenos da oncogénese do CN não está perfeitamente esclarecida; no entanto, o estudo de alguns polimorfismos relacionados com esta resposta e cujos primeiros resultados, que se encontram ainda para publicação, revelam-se promissores também em Portugal em neoplasias virais[99,100].



## 1.4 Processo de carcinogénese e alterações cromossómicas associadas a CN

Estudos citogenéticos e moleculares demonstraram que alterações em proto-oncogenes e genes supressores tumorais têm um papel fundamental para o processo faseado de desenvolvimento tumoral (iniciação, promoção, progressão), alterações estas que estão associadas a alterações cromossómicas.

Na patogénese do CN, algumas destas alterações cromossómicas estão comprovadamente associadas à transição do epitélio normal para tecido neoplásico. O processo inicia-se por deleções em 3p e 9p, que já se identificam em lesões displásicas de baixo grau. Estas deleções afectam genes supressores tumorais, nomeadamente RASSF1A (3p21.3) e CDKN2A (INK4 ou p16) (9p21) [101]. A ligação do p16 à cinase ciclina dependente (cdk4) bloqueia a sua ligação à ciclina D e inibe a fosforilação e inativação da proteína do retinoblastoma (*pRB*), suprimindo assim a progressão do ciclo celular da fase G1- S, já que a fosforilação do *pRB* iria provocar a libertação do E2F, factor de transcrição de genes essenciais à síntese de DNA, desencadeando a replicação do DNA e progressão para a fase S do ciclo celular.

A infecção por EBV parece ocorrer na fase imediatamente após o aparecimento das lesões displásicas, já que se identificam a expressão de EBER e mesmo o genoma monoclonal do vírus em lesões de displasia grave ou carcinoma in-situ, o que não é observado nas fases precedente [79]. O genoma do EBV pode-se manter como epissoma ou integrar-se no cromossoma da célula neoplásica e esta circunstância parece aumentar a instabilidade do DNA e potenciar alterações genéticas nas células tumorais [102].

As outras alterações genéticas observadas parecem ocorrer então, após a instabilidade genómica, havendo desregulação da telomerase, a sobre-expressão de *bcl2*, com perda de heterozigotia em 14q, 11q, 13q e 16q [103].

A heterozigotia em 11q altera a expressão do gene que codifica a proteína ciclina D1 (*CCND1*), mapeado em 11q13. No gene *CCND1* foi identificado um polimorfismo no nucleotídeo 870 que consiste na transição das bases adenina e guanina no exão 4. Este polimorfismo parece estar associado a maior susceptibilidade para cancro, nomeadamente colorectal [104], da cavidade oral [105] e do colo do útero [106] e o seu estudo na susceptibilidade para CN revela-se interessante, e pode de alguma forma justificar a tendência para o CN se desenvolver em estratos etários mais jovens que os restantes carcinomas da cabeça e pescoço.

Nesta fase a histologia aponta já claramente para carcinoma, seguindo-se outras alterações genéticas a nível da *TP53* e caderinas-E, que correspondem à fase de maior risco de disseminação metastásica [107-108].

A avaliação do impacto da TP53 é incontornável em qualquer estudo de oncogénese e a sua principal função é manter a integridade e a estabilidade do genoma. A proteína TP53 actua no ciclo celular nos pontos de controlo G1/S e G2/M, levando a uma paragem nestes pontos e permitindo a reparação de eventuais danos no DNA, evitando a sua replicação contendo alterações genéticas. A paragem no ciclo celular em G1 após a activação da p53 envolve a transcrição do gene codificador da proteína p21 / WAF inibidora de cinases dependentes de ciclinas (CDKs). O efeito imediato da indução da p21 é a inibição da atividade da proteína do retinoblastoma. A *pRB* na fase G1 encontra-se hipofosforilada e quando é fosforilada por cinases dependente de ciclinas, os factores de transcrição da família E2F são libertados, resultando na transcrição de genes da fase S do ciclo celular. A p21 inibe o complexo de CDKs, resultando na manutenção da *pRB* hipofosforilada, ligada ao E2F com paragem do ciclo celular em G1.

Em condições celulares normais a TP53 mantém-se em níveis relativamente baixos, sendo rapidamente degradada pelo mecanismo Mdm2 ubiquitina/proteosoma (UPS). Ao contrário, no desenrolar do processo de oncogénese, a sobre-expressão de Mdm2 (activada pela proteína EBNA3C do EBV) parece contribuir para a degradação de p53 [109], estando descrito um polimorfismo (Mdm2 SNP GG) que contribuiria para aumentar a susceptibilidade diversos tipos de neoplasias, nomeadamente CN [110-111]. Por outro lado, tem sido descrita uma associação entre a variante Pro do polimorfismo *TP53* e uma maior susceptibilidade para o desenvolvimento de CN, tanto em populações asiáticas como na Europa [54, 112].

## **2. Objetivos**



## **2. Objectivos**

### **2.1 Gerais**

**2.1.1** Proceder à caracterização do CN numa população portuguesa

**2.1.2** Verificar a relação entre EBV e CN em Portugal

**2.1.3** Perspectivar o papel de marcadores biomoleculares virais e não virais no CN

### **2.2 Específicos**

**2.2.1** Caracterizar epidemiologicamente o CN no Norte de Portugal, tendo por base a estatística hospitalar do IPO-Porto. Avaliar a frequência relativa dos diversos subtipos de CN, sua distribuição etária e por género, e ainda o seu comportamento clínico, incluindo formas de apresentação, métodos de diagnóstico, acuidade do estadiamento, protocolo de tratamento, taxa de sobrevivência e prognóstico. Estudar alguns aspectos, específicos da população portuguesa, que possam contribuir para a especificidade do CN em Portugal.

**2.2.2** Comprovar o relacionamento do CN com o EBV na população portuguesa com base em análise de amostras de doentes com CN do IPO-Porto e grupo de controlo saudável, colhidas de tecido tumoral (fresco ou em parafina) e de sangue periférico.

**2.2.3** Estudar alguns polimorfismos genéticos que possam estar relacionados com CN, na mesma população.



### **3. Material e Métodos**





### **3. Material e Métodos**

O desenvolvimento deste projecto baseou-se no estudo dos casos de CN observados e tratados no IPO-Porto, cumprindo os pontos descritos nos Objectivos.

#### **3.1 Amostragem Clínica (nº de doentes e caracterização)**

Para a prossecução do Objectivo Específico referido em 2.2.1, foi efectuado o levantamento do processo clínico dos doentes com o diagnóstico de CN. Os doentes eram provenientes da casuística do Serviço de Otorrinolaringologia (O.R.L.) do IPO-Porto. Consideraram-se para este estudo clínico os doentes com CN que finalizaram o primeiro tratamento entre Agosto de 1974 e Agosto de 2005, perfazendo um tempo total de seguimento de 31 anos. Foi realizada a revisão histológica de todos os casos, de modo a garantir homogeneidade nos critérios de diagnóstico. Obtiveram-se 320 doentes portadores de CN, que foram agrupados de acordo com a classificação da OMS de 1978, em carcinomas de tipo I,II e III. Destes, foram seleccionados os que apresentavam a variante histológica II e III. Os doentes assim seleccionados foram estudados prospectivamente em diversas vertentes – forma de apresentação clínica, tempo que mediou desde o primeiro sintoma notado pelo doente até ao diagnóstico, distribuição por sexos, idade à data do diagnóstico, estadiamento TNM. Para o estudo da disseminação local e regional foi considerado o estudo imagiológico local e cervical por TAC ou RMN. O estudo de metastização à distância foi de início efectuado com cintilograma ósseo de corpo inteiro, ecografia abdominal, Rx de tórax, hemograma, velocidade de sedimentação e análises de função hepática. Posteriormente englobou-se o TAC toraco-abdominal neste estudo, em detrimento da ecografia abdominal e Rx torácico. Foram então seleccionados os doentes que no estadiamento não apresentavam metástases à data de diagnóstico e que completaram o tratamento proposto.

A população de doentes tratados foi dividida em dois grupos:

1 Os que efectuaram radioterapia com ou sem cirurgia (79 doentes), que efectuaram tratamento apenas com radioterapia no tumor primário na dose média de 70 Gy e às cadeias ganglionares cervicais e supraclaviculares, com 50Gy a 70 Gy.

2 Os que, além da radioterapia efectuada nos moldes descritos, foi efectuada quimioterapia adjuvante (134 doentes), os quais se subdiviram em subgrupos, de acordo com o tipo que agentes quimioterápicos administrados:

- 37 Doentes: Bleomicina - 25mg/m EV, Metrotexato - 30 mg/m EV em faixas semanais até perfazer 5 ciclos, passando depois a Metrotexato isolado até atingir dose tóxica.
- 26 Doentes: Doxirubicina - 25 mg/m<sup>2</sup> EV, Bleomicina – 10 mg/m<sup>2</sup> EV, Vimblastina – 6mg/m<sup>2</sup>.EV, Dacarbazina – 375mg/m<sup>2</sup> EV, de 15-15 dias durante 3 meses.
- 71 Doentes: Cisplatina -100mg/m<sup>2</sup> EV dia 1, 5-Fluouracilo 1000mg/ m<sup>2</sup> EV, dias 1 a 5, perfusão contínua. Três faixas de 21-21 dias.

A cirurgia de esvaziamento cervical, que foi efectuada sempre que se constatou persistência clínica de adenopatias no final de tratamento quer com radioterapia isolada ou em combinação com quimioterapia, foi considerada englobada em cada uma das modalidades de tratamento.

Foi então estudado o seguimento dos doentes em função do tratamento efectuado. Assim, anualmente todos os doentes foram avaliados com os mesmos exames que tinham efectuado inicialmente. Finalmente, efectuou-se estudo das sobrevivências globais, por estadiamento e por tipo de tratamento. O longo tempo de seguimento obrigou a actualizações de estadiamento, especialmente relevantes na forma de classificar as adenopatias cervicais. Cada processo foi reavaliado sempre que houve alteração de classificação, de forma a permitir uma análise comparativa entre o valor prognóstico e os diferentes modos de estadiamento.

Para além da sobrevivência em si mesma, foi considerada também o que se julgou ser a causa de morte por cancro, que se agrupou em falência de ordem local, regional ou à distância.

### 3.2 Selecção de Amostras para Estudo do DNA Vírico

Para a prossecução do Objectivo Específico referido em 2.2.2, procedeu-se à recolha das amostras dos doentes com CN do IPO-Porto, com o objectivo de efectuar a identificação do DNA vírico no tecido tumoral e sangue periférico. Foram estudados 43 casos com fragmentos incluídos em blocos de parafina, dos quais foi possível a análise da presença do EBV em 19 casos de carcinoma indiferenciado da nasofaringe (10 homens e 9 mulheres) (idades compreendidas entre 13 e 86 anos). Foram também incluídas no estudo 17 biópsias de tecido tumoral da nasofaringe e amostras de sangue periférico provenientes de 32 doentes com carcinoma indiferenciado da nasofaringe (idades compreendidas entre 20 e 71 anos) e 45 amostras de doadores de sangue sem doença oncológica conhecida (idades compreendidas entre 18 e 64 anos).

#### ***Extracção e purificação de DNA***

O DNA viral nas amostras de blocos de parafina foi extraído através de uma digestão enzimática, usando 200ml de um tampão de digestão (TrisHCL 10mM, KCl 50mM, MgCl<sub>2</sub> 2.5mM, 0.5% Tween 20). Os tubos foram incubados durante a noite a 37°C, sendo a lise interrompida pela incubação a 95°C durante 10 min. O DNA obtido foi purificado pelo método fenolclorofórmio e ressuspenso em 50ml de água bidestilada. As amostras foram congeladas a - 20 °C para uso posterior.

Relativamente às amostras de sangue periférico, foram recolhidos 5ml de sangue periférico de cada doente para um tubo com EDTA para o isolamento de plasma. As amostras foram centrifugadas a 1600 x g e o plasma foi cuidadosamente removido dos tubos com EDTA e transferido para tubos de polipropileno, sendo depois armazenadas a - 20 °C até serem processadas. O DNA das amostras de plasma foi extraído através do kit comercial *Qiagen DNA Blood mini kit* (Qiagen). O protocolo utilizado seguiu os passos recomendados pelo fabricante. Foram utilizados 200 µL de plasma para a extracção do DNA por colunas.

A extracção do DNA a partir de amostras de biópsias da nasofaringe foi efectuada a partir de tecido fresco, recorrendo ao kit comercial *QIAamp Tissue Kit* (Qiagen), utilizando o protocolo recomendado pelo fabricante.

### ***Análise da presença de EVB no tecido tumoral em amostras de blocos de parafina***

A amplificação do DNA viral foi realizada através do método nested PCR, utilizando os seguintes *primers* (De 5' para 3'): E344mer: GCGGGTGGAGGGAAAGG; E525mer: GTCAGCCAAGGGACGCG; E32PCR: GCCACCTGGCAGCCCTAAAG e E52PCR: AGGCTGCCCACCTGAGGAT. Os *primers* E344mer e E525mer foram utilizados na primeira reacção de PCR, sendo seguida de outra reacção de PCR com os *primers* 32PCR e E52PCR, tendo o produto final um peso de 184pb. As reacções de PCR foram realizadas num termociclador programável (Biometra), juntando a cada tubo de PCR 2ml de DNA a uma mistura constituída por: tampão 1X, 1.5mM de MgCl<sub>2</sub>, 0.2mM de dNTPs, 0.5mM de cada *primer* e 1U de *Taq polymerase*. As condições da primeira reacção de PCR foram as seguintes: desnaturação inicial a 94°C durante 5min; 40 ciclos de 30s a 94°C, 30s a 57°C e 1min a 72°C, e um passo de extensão final de 7min a 72°C; 2 ml dos produtos obtidos na primeira reacção foram sujeitos a uma segunda PCR. Os parâmetros da segunda reacção foram idênticos aos da primeira, excepto a temperatura de *annealing* que passou de 57°C para 50°C. Foi efectuada electroforese em gel de agarose a 3% (p/v) corado com brometo de etídeo e visualizado sob luz ultravioleta.

### ***Análise da presença de EBV no tecido tumoral de biopsias e sangue periférico***

A detecção do EBV nas amostras de tecido fresco e sangue periférico foi realizada através da metodologia de PCR em tempo real. Os *primers* de PCR foram seleccionados de modo a emparelharem com a região BALF5 do genoma viral que codifica a DNA polimerase viral. As sequências dos *primers forward* e *reverse* foram, respectivamente: 5'CGGAAGCCCTCTGGACTTC3' e 5'CCCTGTTTATCCGATGGAATG3'. Foi utilizada uma sonda fluorogénica (VIC5'TGTACACGCACGAGAAATGCGCC3'TAMRA) com uma sequência localizada entre os *primers* do PCR, sintetizada pela PE Applied Biosystems (Foster city, Calif.). A reacção de PCR foi realizada usando o kit de PCR TaqMan (PE Applied Biosystems). Resumindo, 2.5 µL de solução de extracção de DNA a partir de 200 µL de plasma foram adicionados a uma mistura de PCR contendo 10 mM de Tris (pH 8.3), 50 mM de KCl, 10 mM de EDTA, 5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 100 µM de dATP, dCTP, dGTP e dTTP, 0.2 µM de cada *primer*, 0.1 µM da sonda e 1.25 U da AmpliTaq Gold (PE Applied Biosystems). Seguiu-se a amplificação, começando com um ciclo a 50°C durante 2min., a activação da AmpliTaq Gold durante 10 min a 95°C, 47 ciclos de 15 seg a 95°C e 1 min a 62°C. Todo o processo foi efectuado por um detector de sequências modelo ABIPRISM 7300 (PE Applied Biosystems). Efectuou-se a PCR para as sequências do gene da βglobina, com o objectivo de confirmar a presença de DNA amplificável. A sequência alvo é um segmento de

110pb e foram utilizados os seguintes *primers* (de 5' para 3'): PCO3: ACACAAGTGTGTTCACTAGC; PCO4:CAACTTCATCCACGTTACC. O protocolo incluiu 40 ciclos de 20s a 95°C, 45s a 55°C e 45s a 75°C.

A análise estatística dos resultados foi efectuada recorrendo ao software estatístico SPSS (vs 15.0). As diferenças entre as médias foram calculadas pelo teste t student. O teste de quiquadrado foi utilizado na comparação entre as frequências das variáveis categóricas. Um valor de  $p < 0.05$  foi considerado estatisticamente significativo.



### **3.3 Selecção de Amostras para Estudo de Polimorfismos Genéticos**

Para a prossecução do Objectivo Específico referido em 2.2.3, procedeu-se à recolha das amostras entretanto colhidas dos doentes com CN do IPO-Porto, com o objectivo de estudar alguns polimorfismos que pudessem estar relacionados com CN.

#### **3.3.1 Identificação do risco de CN associado ao polimorfismo do codão 72 do TP53**

Estudo caso-controlo com 392 amostras de sangue periférico, sendo 107 de doentes com CN (idade média  $49\pm 14$ ), 72 dos quais do sexo masculino (idade média  $49\pm 14$ ) e 35 do sexo feminino (idade média  $46\pm 15$ ), e 285 controlos saudáveis (idade média  $56\pm 15$ ), 140 dos quais do sexo masculino (idade média  $60\pm 16$ ) e 145 do sexo feminino (idade média  $52\pm 15$ ). Todas as amostras foram recolhidas de doentes do IPO-Porto, em indivíduos de raça branca do Norte de Portugal. As amostras dos doentes com CN foram estratificadas de acordo com o subtipo histológico da OMS e estadiamento TNM. O DNA vírico foi extraído pelo método de "salting out", descrito por Mullenbach e colaboradores (1989). Todas as amostras foram analisadas para detecção da presença dos alelos Arg (CGC) e Pro (CCC) no codão 72 do TP53, usando método de PCR específico por alelos (AS-PCR) conforme descrito por Storey e colaboradores (1998). As sequências "primer" usadas na reação PCR para cada alelo foram as seguintes: ARG (50-CTGGTGCAGGGGCCACGC-30) e TP53+ (50-TCCCCCTTGCCGTCCCAA-30) para o alelo Arg e PRO+ (50-GCCAGAGGCTGCTCCCC-30) e TP53 – (50-CGTGCAAGTCACAGACTT-30) para o alelo Pro. As reações AS-PCR foram realizadas num volume total de 50  $\mu$ l contendo tampão a 1U Taq, 1.5 mmol/l de  $MgCl_2$ , 0.2 mmol/l de dNTPs, 0.25 mmol/l de cada "primer" e 1U Taq DNA polimerase. As amplificações foram efectuadas usando os seguintes parâmetros: 95°C por 5 min para a activação da Taq DNA polimerase, seguida de 45 ciclos de desnaturação por 60 seg a 94°C, "annealing" a 60/55°C (repectivamente alelos Arg ou Pro) em 45 seg, extensão por 60 seg a 72°C e passo de extensão final a 72°C por 5 min. Os produtos de PCR geraram um fragmento de 141 pares de base a 141 (bp) para o alelo ARG e um fragmento de 177 bp para o alelo Pro, os quais foram analisados por electroforese num gel de agarose a 1,5% (p/v) fixado com brometo de etídeo.

Seguidamente foi efectuada a análise estatística de forma a avaliar o risco associado para o desenvolvimento de CN com a frequência dos três genótipos do polimorfismo do codão 72 do *TP53*.

Foi efectuada a análise dos dados usando o programa SPSS para Windows (versão 11.5). Na análise comparativa das variáveis pelo método Qui-Quadrado foi atribuído um nível de significância de 5%. A associação entre os genótipos *TP53* e o desenvolvimento de CN foi correlacionada com a idade, género, classificação histológica e estadiamento TNM. O risco para desenvolvimento de CN foi medido calculando o respectivo "odds ratio" (OR) e o intervalo de confiança para associação com o polimorfismo foi de 95%.



### 3.3.2 Avaliação do risco de CN associado ao polimorfismo A870G do CCND1

Estudo caso-controlo envolvendo 94 doentes com CN, seguidos e tratado no IPO-Porto de 1997 a 2003, com idade média de 50 anos (desvio padrão 14,5) e um grupo de 187 indivíduos saudáveis com idade média de 55 anos (desvio padrão de 16,8). O DNA foi colhido do sangue periférico segundo protocolo "salting out" descrito por Mullenbach e colaboradores (1989). A detecção do polimorfismo A870G do *CCND1* foi efectuada de acordo com o definido por Betticher et al (1995). As reacções de PCR consistiram de 0.2 µg de DNA do genoma, 30 pmol de cada "primer", 0.2 mM de cada dNTP, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 1U Taq tampão, e 1U Taq DNA polimerase perfazendo um volume final de 50 µL. OS "primers" utilizados na análise foram CY26 (50-GTG AAG TTC ATT, TCC AAT CCG C-30) e CY27 (50-GGG ACA TCACCC TCA CCC TCA CTTAC-30). Foram efectuados 35 ciclos que consistiram num aquecimento inicial a 95° C em 10 minutos, para activar as enzimas, seguido de 35 ciclos de desnaturação a 94°C por 1 minuto, e extensão a 78°C por 1 minuto e ainda extensão final a 72°por 2 minutos. Os produtos de PCR (15 µl) foram digeridos com 1 U ScrF1 a 37°C por 4 horas e visualizados por electroforese em gel a 3% (p/v) agarose contendo 0.5 µg/mL de brometo de etidio. O produto de PCR com 167 pares de base assim gerado não é cortado pelo ScrF1 se o alelo A está presente, mas o produto do alelo G é cortado para produzir fragmentos de 145 e 22 pares de base.

Foi efectuada a análise dos dados usando o programa SPSS para Windows (versão 12) e Epi Info (versão 6.04). Na análise comparativa das variáveis pelo método Qui Quadrado foi atribuído um nível de significância de 5%. O Odds Ratio e o seu intervalo de confiança de 95% foram calculados como medida da associação entre os genótipos *CCND1* e o risco de CN. Foi efectuada análise multivariada de regressão para calcular a OR ajustada (aOR) e intervalo de confiança de 95% para a influência dos genótipos *CCND1* para o risco de CN ajustado à idade e sexo. Foi testado o equilíbrio de Hardy-Weinberg através de um teste "goodness of fit" de Pearson de forma a comparar as frequências observadas e esperadas. Foi calculada a Proporção Atribuível (PA), fracção de doença atribuível a um determinado factor de risco, através da fórmula:  $PA = PFR \times (1 - 1/OR)$  (PFR é a percentagem do factor de risco nos casos, e OR é o "Odds Ratio").

### **3.3.3 Avaliação da influência do polimorfismo A870G do CCND1 na idade de aparecimento de duas neoplasias relacionadas com vírus (CN e cancro do cervix uterino)**

Estudo caso-controlo envolvendo 581 indivíduos, incluindo 247 controlos e 334 casos (108 com CN e 226 com carcinoma do cervix uterino), todos diagnosticados no IPO-Porto de 2000 a 2004. A mediana da idade na altura do diagnóstico de NPC foi 49.0 anos (idade média 47.5; desvio padrão 4.5). Nos casos de cancro do cervix uterino a idade mediana na altura do diagnóstico era 47.0 anos (idade média 47.2; desvio padrão 12.3). O grupo controlo consistiu em 247 indivíduos saudáveis, com idade mediana de 55.5 anos (idade média 51.1; desvio "standard" 16.8), sem história clínica de cancro, da mesma área geográfica. Todas as amostras foram colhidas após obtenção de consentimento informado de acordo com a Declaração de Helsínquia. Por razões clínicas e estatísticas foram definidos dois grupos de patologia maligna associadas a vírus oncogénicos: um, com 84 dos 108 doentes classificados como CN subtipos II e III e outro com 202 carcinomas invasivo do cervix uterino somados a 50 lesões com a mesma localização portadores de lesões de displasia de alto grau. A forma de colheita de DNA e processamento de PCR foi efectuada em moldes idênticos aos descritos anteriormente, bem como o tratamento estatístico. Foi analisada a seguinte questão: qual é a probabilidade de um recém-nascido iniciar cancro clinicamente detectável antes da idade X, supondo que ele chega a essa idade e assumindo que todos os casos se encontravam em igual risco de desenvolver cancros da nasofaringe e do cervix uterino na data de nascimento? Colocou-se como hipótese que os genótipos do CCND1 pudessem alterar o início destes tumores. Definiu-se data de início de cancro como facto e os genótipos como variáveis independentes. A associação entre a data de início de cancro e o polimorfismo A870G foi testada comparando as curvas Kaplan-Meyer de sobrevivência de acordo com o genótipo CCND1. Considerou-se o tempo decorrido até ao início da doença como intervalo entre a exposição ao factor de risco e o tempo de início da doença. Foi calculada a probabilidade cumulativa de ter cancro cervical e nasofaríngeo pelo método Kaplan – Meyer. A análise tempo-para-o-evento (cancro) foi efectuada usando o teste de log-rank com nível de significância de 5%.

## **4. Resultados**



## 4. Resultados

### 4.1 Caracterização do CN em doentes do Norte de Portugal

#### 4.1.1 Caracterização Histológica do CN (320 doentes):

Dos 320 doentes com carcinoma epidermóide localizado na nasofaringe, 247 (77,19%) apresentavam carcinoma indiferenciado não queratinizante, 53 (16,56%) carcinoma diferenciado não queratinizante, e 20 (6,25%) carcinoma escamoso queratinizante, ou seja 300 (93,75%) dos doentes estudados apresentavam carcinoma não queratinizante (II e III da OMS) e apenas 20 eram carcinomas de células escamosas queratinizantes (OMS tipo I).

#### 4.1.2 Apresentação Clínica (223 doentes):

Foi possível colher os dados respeitantes à forma de apresentação clínica em 223 dos 300 doentes com CN de tipo II e III da OMS.

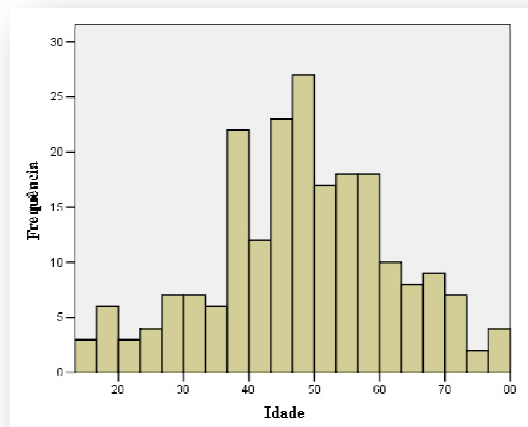


Figura 9  
Distribuição etária dos doentes com CN do IPO-Porto.

A idade à data do diagnóstico variou entre 14 e 80 anos, com mediana de 49,0 anos, média de 48,2, e desvio padrão de 14,2, não se verificando uma incidência bimodal (Figura 9).

No que diz respeito à distribuição por sexos (Figura 10) verificou-se serem do sexo masculino 150 doentes (67%) e do sexo feminino 73 (33%), o que corresponde a uma razão de 2/1. O intervalo entre o primeiro sintoma e o diagnóstico foi em média de 7,0 meses, variando entre 1 mês e 48 meses.

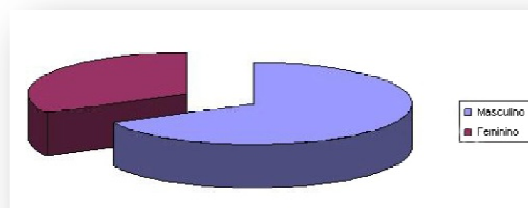


Figura 10  
Distribuição do género dos doentes com CN do IPO-Porto.

Para a análise do sintoma ou sinal de apresentação, consideraram-se 4 grupos (Figura 11). No 1º reuniram-se os sintomas nasais de epistaxis, rinorreia e obstrução nasal, no 2º grupo o sinal de apresentação foi tumefacção cervical traduzindo adenopatia, no 3º consideraram-se sintomas otológicos relacionados com disfunção da trompa, incluindo autofonia e hipoacusia e no 4º outros sintomas como dor facial e diplopia. A adenopatia foi o sinal mais frequente, sendo referido por 115 (51,6%) dos doentes, seguindo-se os sintomas nasais e otológicos respectivamente em 54 (24,2%) e 52 (23,3%) doentes. Apenas 2 (0,9%) doentes referiram outros sintomas ou sinais de apresentação.

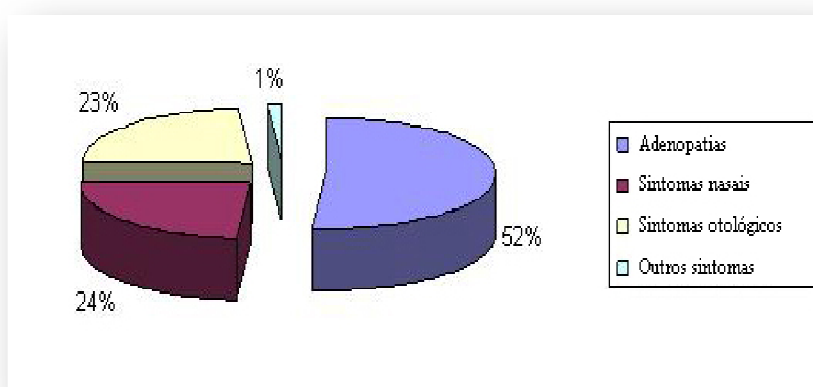


Figura 11  
Distribuição do primeiro sintoma ou sinal de doença dos doentes com CN do IPO-Porto.

#### 4.1.3 Análise de sobrevivência (213 doentes)

Para a análise de sobrevivência foram seleccionados os doentes com CN de tipo II e III da OMS que, tendo sido possível o estadiamento completo (UICC-AJCC/2002), não apresentavam metástases a distância na data de diagnóstico e de entre estes os que completaram o tratamento proposto. Obtiveram-se 213 doentes que preenchiem todos os requisitos, sendo estes os considerados na análise subsequente

O tempo médio de sobrevivência global aos 5 anos de seguimento foi de 46,0 meses (taxa de sobrevivência estimada de 64,5%), e aos 10 anos de seguimento o tempo médio de sobrevivência foi de 82,0 meses (taxa de sobrevivência estimada de 58,7%) (Figura 12). A análise de sobrevivência em função do sexo aos 10 anos de seguimento demonstrou não haver diferenças na taxa de mortalidade para qualquer dos sexos ( $P=0,253$ ).

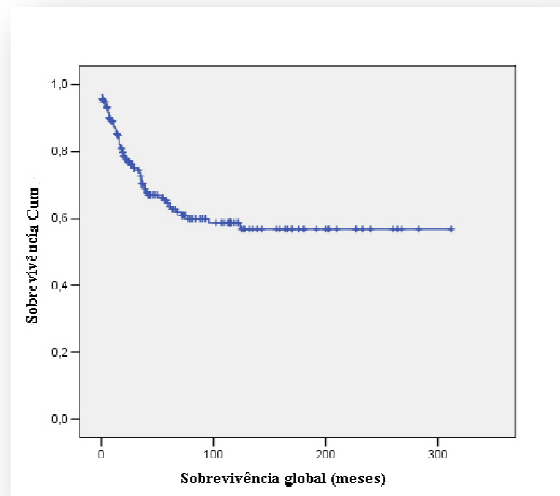


Figura 12  
Sobrevivência global dos doentes com CN.

A distribuição por estádio foi a seguinte: 4 doentes (1,9%) com estágio I, 36 (16,9%) em estágio II, 79 (37,1%) do estágio III e 94 (44,1%) em estágio IV. O número reduzido de doentes em estádios precoces, nomeadamente em estágio I, impossibilita uma análise estatisticamente concludente. Assim optou-se por considerar os estádios I e II conjuntamente nas análises seguintes. A taxa de sobrevivência aos 5 anos foi de 88,5% para os estádios I e II, 65,1% para o estágio III, e 52,1% para o estágio IV. As curvas de sobrevivência aos 5 anos ( $P=0,0002$ ), (dados não apresentados) e 10 anos para os estádios I e II, III, IV são estatisticamente diferentes ( $P=0,0002$ ) (Figura 13). O tempo médio de sobrevivência aos 10 anos para o estágio I e II foi de 106,4 meses, e 84,8 e 67,2 para os estádios III e IV, respectivamente.

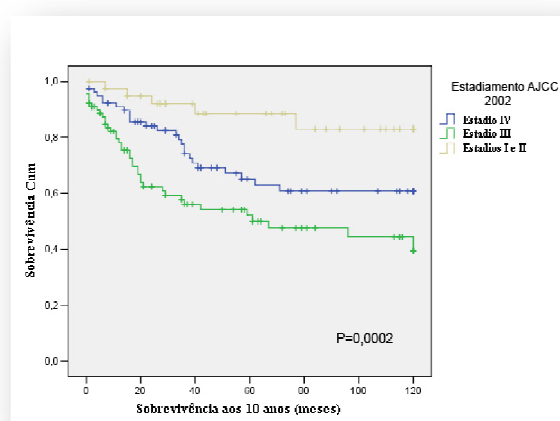


Figura 13  
Sobrevivência aos 10 anos dos doentes com CN do IPO-Porto, de acordo com o estágio tumoral.

A base de dados foi sendo actualizada ao longo do tempo, considerando também as diferentes modalidades de estadiamento que entretanto foram aprovadas, o que permite uma análise comparativa da acuidade prognóstica de cada uma delas, o que é particularmente evidente aos 10 anos de seguimento ( $P=0,001$  para o estadiamento UICC 1978,  $P=0,004$  para o UICC-AJCC 1987 e  $P=0,0002$  para o estadiamento AJCC 2002) (Figura 14 A e B).

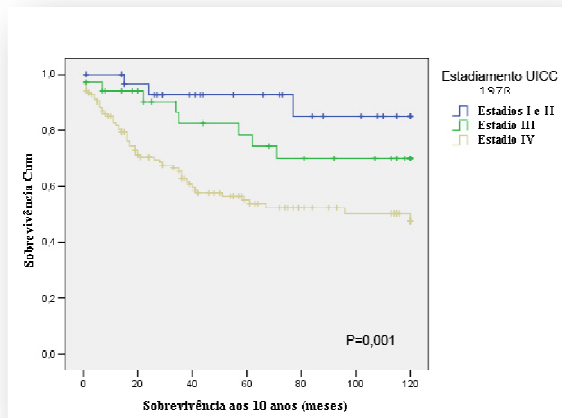


Figura 14 A  
Sobrevivência aos 10 anos dos doentes com CN do IPO-Porto, de acordo com o estágio tumoral com estadiamento UICC de 1978.

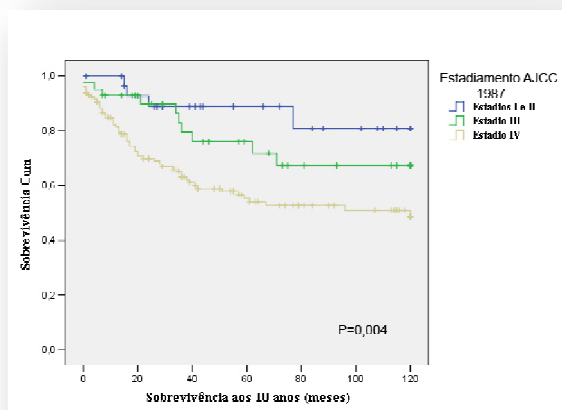


Figura 14 B  
Sobrevivência aos 10 anos dos doentes com CN do IPO-Porto, de acordo com o estágio tumoral com estadiamento AJCC de 1987.

Ao longo do tempo de seguimento, a modalidade de tratamento foi também evoluindo. Conforme anteriormente discriminado, na análise das sobrevivências em função do tratamento efectuado dividiu-se inicialmente a população em 2 grupos, os que efectuaram radioterapia com ou sem cirurgia (79 doentes), e os que beneficiaram de tratamento conjunto com quimioterapia, independentemente do seu tipo (134 doentes). Aos 3 anos de seguimento a taxa de sobrevivência para o primeiro grupo foi de 60,3% e de 75,0% para o segundo. Aos 5 anos a taxa de sobrevivência foi respectivamente de 49,0% e 71,8%. Aos 10 anos, o tempo médio estimado de sobrevivência foi de 65,4 meses para o 1º grupo (taxa de sobrevivência



38,1%) e de 89,8 meses para o 2º grupo (taxa de sobrevivência 68,6%), sendo também esta diferença estatisticamente significativa ( $P=0,003$ ) (Figura 15).

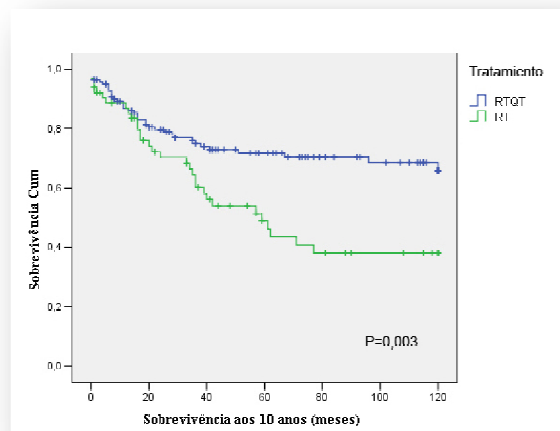


Figura 15  
Sobrevivência aos 10 anos dos doentes com CN do IPO-Porto, de acordo com o tipo de tratamento.

De entre os doentes que efectuaram tratamento com quimioterapia, 37 efectuaram - Metrotexato e Bleomicina, 26 ABVD e 71 CDDP e 5-Fluouracilo (5 FU). As sobrevivências estimadas aos 5 anos foram diferentes para as diversas modalidades, respectivamente de 57,8%, 62,7% e 85,9% ( $P=0,002$ , dados não relatados). As diferenças nas sobrevivências estimadas aos 10 anos para as diversas modalidades foram ainda mais significativas ( $P=0,003$ ). O tempo médio de sobrevivências para o 1º grupo de doentes foi de 72,7 meses (53,8%), para o 2º de 83,9 (62,7%) e 108,3 (71.6%) para o último grupo (Figura 16).

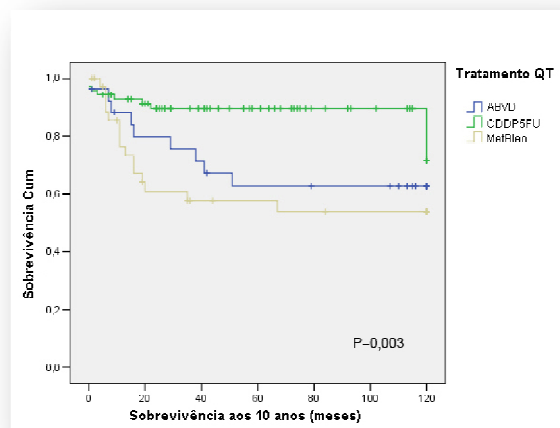


Figura 16  
Sobrevivência aos 10 anos dos doentes com CN do IPO-Porto, de acordo com o tipo de tratamento de quimioterapia.

Identificou-se a causa de morte em 59 dos 69 doentes do estudo, entretanto falecidos por cancro, verificando-se ser esta atribuível isoladamente a falência regional em 4 doentes (6,8%), local em 19 doentes (32,2%) e à distância em 27 (45,8%). Em 4 dos 9 doentes em que se constatou combinação de mais de uma

causa, a metastização a distância encontrava-se associada a falência local ou regional, dando uma percentagem total de 52,6% de falecidos com metástases a distância.

Quando analisada a frequência de metastização em função do tratamento, verificou-se que esta ocorreu em 23 (74,2%) doentes tratados apenas com radioterapia e em 8 (25,8%) dos que beneficiaram de quimioterapia adjuvante com CDDP e 5 FU.

## 4.2 Estudo da relação do EBV com CN em Portugal

O Quadro III ilustra os resultados do estudo efectuado no sentido de identificar o DNA vírico tanto no tecido tumoral como no sangue periférico. No grupo dos casos, 19 amostras eram provenientes de tecido tumoral em blocos de parafina (idade média de 56,6 anos, desvio padrão de 11,4), 17 amostras de tecido fresco (idade média de 51,8 anos, desvio padrão de 7,4) e 32 amostras de sangue periférico (idade média de 48,1 anos, desvio padrão de 11,3) de doentes com CN. A idade média dos indivíduos do grupo controlo foi de 51,8 anos (desvio padrão de 7,4). A frequência de indivíduos do género masculino e feminino foi de 73,5% e 26,5%, respectivamente no grupo dos casos com CN e de 60,0% e 40,0%, respectivamente no grupo controlo. A frequência de casos EBV positivos nas amostras de tecido tumoral em blocos de parafina foi de 84,2%. Os resultados da detecção de EBV nas amostras de tecido fresco demonstram uma percentagem de casos positivos de 100%. Nas amostras provenientes de sangue periférico dos doentes com CN foi encontrada uma frequência de casos EBV positivos de 53,1%. No grupo controlo, não foi encontrado DNA de EBV no sangue periférico de indivíduos saudáveis.

**Quadro III Resultado da detecção de EBV no grupo controlo e nos grupos de doentes com carcinoma da nasofaringe de acordo com o tipo de amostra**

	Detecção EBV	
	Positivo (%)	Negativo (%)
<b>Casos de carcinoma da nasofaringe</b>		
Blocos de parafina (n=19)	16 (84.2)	3 (15.8)
Biopsia - tecido fresco (n=17)	17 (100.0)	0 (0.0)
Sangue periférico (n=32)	17 (53.1)	15 (46.9)
<b>Total (n=68)</b>	<b>50 (73.5)</b>	<b>18 (26.5)</b>
<b>Grupo controlo</b>		
Sangue periférico (n=45)	0 (0.0)	45 (100.0)



### 4.3 Estudo de polimorfismos genéticos associados a CN

#### TP53

Os resultados do trabalho efectuado com o objectivo de estudar o polimorfismo do codão 72 do *TP53* no que diz respeito aos alelos prolina (CCC) e arginina (CGC), encontram-se explanados no Quadro IV. Os resultados demonstraram uma diferença estatisticamente significativa, com três vezes maior risco de desenvolvimento de carcinoma da nasofaringe para os portadores do genótipo Pro/Pro ( $P=0.012$  OR=2,67 CI 95%=1,21-5,90) (Quadro IV).

**Quadro IV Associação dos genótipos do codão 72 do *TP53* com CN**

	Doentes		Controlos		OR	95%CI	P
	n	%	n	%			
<b>Genótipos</b>	107		285				
<b>AA</b>	62	57,9	178	65,5	1,00	referência	
<b>AP</b>	32	30,0	93	32,6	0,97	0,58- 1,64	0,910
<b>PP</b>	13	12,1	14	4,9	2,62	1,10- 6,30	0,016
<b>AA/AP</b>	94	87,9	271	95,1	1,00	referência	
<b>PP</b>	13	12,1	14	4,9	2,67	1,21-5,90	0,012

#### CCND1

O Quadro V evidencia os resultados da análise da frequência do polimorfismo A870G no gene da ciclina D1 em casos de carcinoma da nasofaringe e indivíduos sem patologia oncológica conhecida. A análise das frequências dos genótipos *CCDN1* demonstra que os portadores do genótipo GG possuem um risco aumentado de desenvolver cancro da nasofaringe (OR=2,17; 95% CI 1,19-3,98;  $P=0,016$ ), e um risco ainda maior quando associado à variante indiferenciada deste tipo de neoplasia (OR=2,32; 95% CI 1,20-4,17;  $P=0,018$ ).

**Quadro V Prevalência e “odds ratio” dos genótipos *CCND1* em doentes com CN e Grupo de controlo**

	Doentes (n=94)		Controlos (n=187)		OR	95%CI	P
	n	%	n	%			
<b>Genótipos</b>							
AA	26	27.7	54	28.9			
AG	42	44.6	105	56.1			
GG	26	27.7	28	15.0			
<b>Recessivos Modelo</b>							
AA/AG	68	72.3	159	85.0	1.00	reference	
GG	26	27.7	28	15.0	2.17*	1.19-3.98*	0.016*

\*P=0.016, aOR=2.14 and 95% CI=1.14-4.04 com análise de regressão ajustada à idade.

A Figura 17 demonstra os resultados do estudo efectuado com o objectivo de investigar o papel do mesmo polimorfismo na idade de aparecimento de cancro em duas neoplasias relacionadas com antecedentes de infecção por vírus com potencial oncogénico reconhecido.

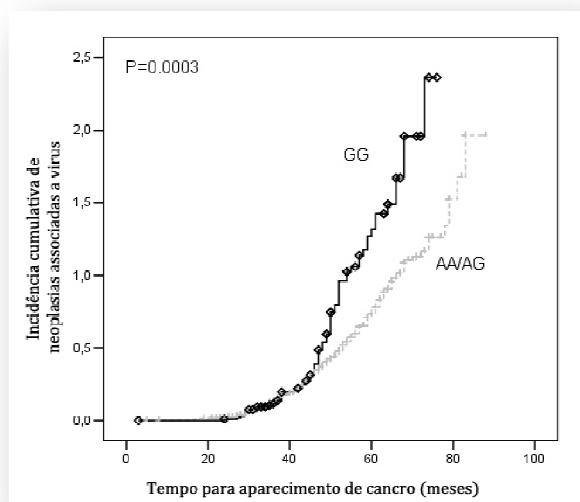


Figura 17  
Análise do tempo para aparecimento de neoplasias associadas a infecção viral (cancro do colo do útero e da nasofaringe), de acordo com o polimorfismo *CCND1* A879G.

Este estudo revelou que as frequências do *CCND1* AA, AG, GG foram respectivamente de 27,9%, 55,9%, 16,2% nos controlos normais, e de 31,1%, 54,9% e 14,0% no grupo de controlo restrito ao sexo feminino. A frequência do polimorfismo nos dois grupos de casos foi: 27,7% para o genótipo

AA, 45,5% para o genótipo AG e 26,7% para o genótipo GG, nos casos de cancro cervix uterino, e de 25,0%, 47,6% e 27,4% respectivamente para os genótipos AA, AG e GG nos casos de CN associados a EBV. A distribuição genotípica dos dois grupos

estava dentro do equilíbrio de Hardy-Weinberg ( $P = 0,679$  nos casos e  $P = 0,341$  nos controlos).

A análise de regressão ajustada à idade indica que os indivíduos portadores do genótipo GG apresentam um risco 2,44 vezes superior para o desenvolvimento de Cancro Cervix Uterino (aOR = 2,44, 95% CI 1,38–4,30,  $P = 0,002$ ), e 2,09 vezes superior para o risco de desenvolver CTN (aOR = 2,09, 95% CI 1,15–3,79,  $P = 0,016$ ).

O tempo médio para o aparecimento de cancro do cervix uterino foi de 60 anos para os portadores de genótipo AA e AG e de 50 anos para os de genótipo GG (log-rank:  $P = 0,0001$ ). O mesmo tempo para os casos de CN associados a EBV foi de 73 anos para os portadores de genótipo AA e AG e de 61 anos para os de genótipo GG (log-rank:  $P = 0,006$ ). Considerando todos os casos de cancro relacionado com vírus com potencial oncogénico deste estudo, a análise de Kaplan-Meier permite concluir que o tempo médio para o desenvolvimento de cancro em doentes homozigóticos GG para o genótipo *CCND1* (52 anos) era 8 anos menos quando comparado com os doentes portadores dos genótipos AG ou AA (60 anos) (log-rank:  $P = 0,0003$ ) (Figura 17).





## **5. Discussão**



## **5. Discussão**

### **5.1 Perspectiva comparativa das características epidemiológicas e clínicas do CN em Portugal**

De acordo com o Instituto Nacional de Estatística (INE), Portugal é um pequeno país com 92,391 km<sup>2</sup> e dez milhões de habitantes. Localizado no sul da Europa, é considerado um dos países europeus da bacia do Mediterrâneo à semelhança da Espanha, Itália e Grécia. A sua população, maioritariamente caucasiana, é composta por descendentes dos povos Iberos e Celtas, que viveram na Península desde o século VII AC (Antes de Cristo) e também de Judeus Sefarditas [113] que aqui habitaram desde o Século I AC até ao XV DC (Depois de Cristo). Tem também uma componente importante e geneticamente confirmada [114-115] de descendentes de populações oriundas do Norte de África, provavelmente muito anterior à sua ocupação do território continental a partir do século VII DC, que se manteve durante cerca de quinhentos anos [116-117].

Na presente análise, optou-se por manter a designação de carcinomas de tipo I, II e III da OMS de 1978 (seguidamente designada apenas por I, II e III da OMS) para subclassificar histologicamente os CN, por não colidir com as classificações que se seguiram [26], e por ser a que mais frequentemente se encontrou referida na literatura ao longo dos anos do estudo.

No que respeita à caracterização epidemiológica e clínica do CN, Portugal parece apresentar aspectos interessantes, combinando uma taxa de incidência de CN inferior à da maioria dos países mediterrânicos, uma percentagem superior das variantes de carcinoma não queratinizante (II e III da OMS), em comparação com os outros países europeus, e uma distribuição etária unimodal com pico cerca dos 50 anos idêntica à das regiões endémicas [118], como tentaremos demonstrar.

De acordo com a GLOBOCAN [119], a incidência ajustada à idade do CN em Portugal é de 0,9/100.000 habitantes/ano, e durante o ano de 2002 foram registado no nosso País 119 casos, 85 do sexo masculino e 34 do sexo feminino, o que corresponde a uma razão de 2,5/1. A taxa de incidência referida é semelhante à existente nas populações caucasianas dos restantes países da Europa e Estados Unidos da América [33-35], quatro a oito vezes inferior às taxas existentes em alguns países

mediterrânicos [120-121] e africanos [36, 122], e ainda em populações inuitas (da Groenlândia e Alasca) e malaias (de Singapura e Malásia), sendo ainda vinte a trinta vezes inferior à taxa do Sudoeste da Ásia [34].

A distribuição por sexos obtida no estudo hospitalar de doentes do Norte do País, realizado no IPO-Porto, com 67% de indivíduos do sexo masculino e 33% do sexo feminino [123], é análoga à recentemente publicada por Amaro e colaboradores [124] num estudo também de base hospitalar (IPO-Lisboa), referente a uma população do Sul de Portugal, e idêntica à que a GLOBOCAN refere para Portugal e para a maioria dos países de mundo [119, 125]. É também muito semelhante à apresentada por Ou e colaboradores [126], numa revisão de 2640 doentes com CN, recentemente efectuada nos EUA. Surpreendentemente, uma revisão de 84 doentes efectuada na Cantábria (uma população vizinha ao Norte de Portugal) apresentava uma razão de 4/1 [127].

A distribuição etária do CN em Portugal é unimodal [119], com um pico entre os 49 anos (mediana 49 anos, média 48,2, desvio padrão 14,2) [123] e os 53 anos [124], à semelhança com o que ocorre nos países onde a doença é considerada endémica [125] e também documentado em Espanha [127-129], mas difere não só da caracteristicamente bimodal do Norte de África [122] e dos países mediterrânicos do Médio-Oriente [130-131], mas também da apresentada pelos países ocidentais de mais baixo risco, nos quais a incidência aumenta de forma constante com a idade [37].

A GLOBOCAN [119] apresenta os dados de incidência do CN dos registos oncológicos dos diversos países sem considerar a frequência relativa de cada um dos seus tipos histológicos (segundo a OMS), e o mesmo se passa em Portugal. No entanto, esta série de doentes com CN observados sequencialmente no IPO Porto [123], revela que 77,19% apresentavam carcinoma indiferenciado não queratinizante (OMS tipo III), 16,56% carcinoma diferenciado não queratinizante OMS tipo II), e 6,25% carcinoma escamoso queratinizante (OMS tipo I), ou seja 93,75% dos doentes estudados apresentavam carcinoma não queratinizante (II e III da OMS). A constatação desta percentagem relativa, que posteriormente se verificou ocorrer de forma muito semelhante também no Sul de Portugal [124], foi de certo modo inesperada, porque está geralmente aceite que a frequência relativa dos três tipos de CN varia de acordo com a taxa de incidência da doença, em que as populações de alto risco têm uma percentagem maior de carcinomas não queratinizantes [132].

Assim, os tipos II e III da OMS representam 95% dos CN nas áreas de endemia [133], enquanto o tipo I é predominante nas zonas de baixo risco [41, 126, 134]. Dados publicados por Marks e colaboradores em 1998, numa revisão de 5069 CN registados no “National Cancer Data Base” dos EUA, apontam mesmo para 75% de carcinomas de tipo I na população branca norte-americana não-hispânica [41]. Segundo o mesmo autor, os tipos II e III de CN tenderiam também a ocorrer em idades mais jovens. Estas constatações estão em concordância com os achados descritos tanto no estudo hospitalar como com o resultado de estudo do polimorfismo A870G do *CCND1* efectuado pelo nosso grupo de trabalho [46, 55, 135]. Por outro lado, os CN de tipo I da OMS, estarão, segundo alguns autores [136], relacionados com abuso de tabaco e álcool e isso justificaria também uma curva etária mais próxima da apresentada pelos restantes carcinomas de cabeça e pescoço.

No que respeita aos CN de tipos II e III da OMS, parece existir associação comprovada entre estes tumores e a ocorrência prévia de infecção pelo vírus de Epstein-Barr (EBV), qualquer que seja a população considerada [42], o que aparentemente se confirma também em Portugal [46], como se tentará demonstrar no ponto 5.2.

No entanto, outros factores exógenos estão indubitavelmente associados ao CN, nomeadamente de tipo dietético e ambiental.

Do ponto de vista da dieta alimentar, o consumo de peixe salgado seco [56] contendo precursores de nitrosaminas voláteis e outras substâncias activadoras do EBV [57-58], estão há muito associados a CN. O mesmo se passa com o consumo de outros alimentos conservados como a “harissa”, “qaddid” e “toukليا”, usados comumente na Tunísia, e de um modo geral as dietas pobres em frutas e vegetais frescos estão também associadas a maior risco de CN, mas a relevância específica de cada um destes alimentos será sempre difícil de avaliar, já que os grandes consumidores de frutas e vegetais tenderiam a ser fracos consumidores de comida conservada de forma artesanal [37]. Neste sentido, o estudo dos hábitos alimentares da população portuguesa poderá revelar-se interessante, por dois motivos distintos. Portugal é o quarto maior consumidor de peixe do Mundo, com mais de 66 Kg “*per capita*”, dos quais 40% correspondem a bacalhau salgado seco, tornando Portugal o primeiro consumidor mundial desta variedade de peixe [137], o qual, seco e conservado em sal, apresenta no final do processo de conservação cerca de 18% de cloreto de sódio e 50% de humidade [138]. Por outro lado, historicamente a nutrição-base em Portugal é baseada na dieta mediterrânica, composta basicamente de teores generosos de fruta fresca, vegetais, cereais, gorduras derivadas do azeite e

peixe fresco, sendo a carne vermelha utilizada em quantidades moderadas [139]. Portugal ocupa o terceiro lugar no consumo “*per capita*” de cereais relativamente aos países da União Europeia (UE), atingindo em 2002 um valor de 132 kg/habitante/ano [140], e o quinto lugar como maior consumidor de vegetais e frutos frescos da EU, com uma capitação de 220 kg/habitante/ano [141], depois da Grécia, Itália e a Espanha. Alguns autores encontram alterações importantes no tipo de alimentação dos países da bacia do mediterrâneo as quais de qualquer modo são relativamente recentes [142-143], e portanto menos susceptíveis de ter impacto na população estudada em Portugal.

Do ponto de vista ambiental, a exposição profissional a inalantes tóxicos, nomeadamente a pó de madeira, é também referida como estando relacionada com aumento de risco de CN [59-60], o que estaria relacionado com a inalação de clorofenóis, produtos usados como conservantes da madeira [61]. O estudo caso-controlo de Hildesheim e colaboradores [62], com 375 casos e 375 controlos, demonstrou uma associação forte entre a exposição ao pó de madeira e o risco de CN, o qual era maior se a exposição fosse anterior aos 25 anos de idade e em indivíduos com anticorpos positivos para EBV. A importância de exposição a formaldeído seria menos importante para o risco de CN.

Em Portugal, o peso relativo das indústrias manipulando este tipo de inalantes é tradicionalmente bastante relevante. O sector da madeira e mobiliário representou em 2007, 5,9% do PIB total português e 11,6% das exportações nacionais [144]. As indústrias do calçado e têxtil (lar e vestuário) representaram nos últimos 20 anos 18-23% do emprego e 12-30% das exportações nacionais [145-146].

Do ponto de vista estritamente clínico, a forma de apresentação do CN encontra-se claramente dominada pela metástase cervical, seguida dos sintomas de empréstimo derivados da afectação das estruturas de vizinhança. Assim, Neel e Taylor [27] referiam como sinais mais frequentes de apresentação da doença a adenopatia cervical (68% dos casos) e a disfunção nasal (30% dos casos). Dickson [147] refere a adenopatia cervical em 60-70% dos doentes e disfunção nasal em 32-46%.

Na população hospitalar estudada no IPO-Porto [123], a adenopatia foi o primeiro sinal de apresentação da doença mais frequente (51,6%), seguindo-se os sintomas nasais (24,2%) e otológicos (23,3%). O quadro clínico por nós encontrado é assim muito semelhante ao descrito pela grande maioria dos autores em relação a diferentes populações [124, 127-128, 131, 148-150].

Segundo Huang e colaboradores [32], o diagnóstico de CN tende a ocorrer tardiamente no decurso da doença, (72-81% dos doentes em estágio III-IV), e isso aconteceria independentemente da nacionalidade, raça, género ou idade. Em concordância, no estudo efectuado pelo nosso grupo [123], 4 doentes (1,9%) encontravam-se em estágio I e 36 (16,9%) em estágio II, sendo 79 (37,1%) sido classificados em estágio III e 94 (44,1%) em estágio IV. A razão invocada para o diagnóstico maioritariamente em estádios avançados desta patologia, foi de o CN carecer de sintomas de apresentação claros e específicos, embora esta questão não se encontre objectivamente quantificada pelo autor. No sentido de aferir esta constatação de falta de especificidade de sinais e sintomas de apresentação, o nosso grupo de trabalho analisou também o tempo decorrente entre o 1º sintoma ou sinal e o diagnóstico. O cálculo do intervalo entre o primeiro sintoma e o diagnóstico tinha como objectivo por um lado avaliar o grau de especificidade e gravidade das queixas, tendo em conta que queixas mais intensas tendem a diagnósticos mais precoces pela necessidade de cuidados médicos e que a sua especificidade permitiria mais facilmente um diagnóstico correcto; por outro lado, permitiria indirectamente medir a proximidade dos cuidados médicos especializados junto da população. Trata-se de um cálculo não considerado nas fontes bibliográficas disponíveis, que no nosso estudo foi em média de 7 meses, não se registando variação ao longo do tempo considerado nesta revisão (31 anos). Este achado parece indiciar um grau relativamente baixo de especificidade sintomática e faz reflectir sobre a evolução da relação custo-benefício do sistema de saúde em geral e também em Portugal, ao longo do tempo, e ainda da relevância ou não da evolução das técnicas de diagnóstico, as quais, sendo mais exactas são também mais dispendiosas, requerendo um uso judicioso.

Ainda segundo Huang e colaboradores [32], o facto de o diagnóstico de CN se efectuar em estádios avançados seria a razão de sobrevivências consideradas modestas, cerca de 60% aos 5 anos. Alguns autores alertam ainda que a sobrevivência dependeria de forma isolada não só do estágio e da classificação da OMS, mas também da origem étnica, apontando nomeadamente que a raça chinesa teria melhor sobrevivência em estádios precoces, seja em tumores do tipo II e III da OMS, seja em tumores do tipo I [126]. Analogamente aos resultados encontrados no trabalho semelhante recentemente publicado pelo IPO-Lisboa [124], no presente estudo [123], a sobrevivência global aos 5 anos foi de 64,5%; no entanto, ao analisar a sobrevivência em função do tipo de tratamento encontram-se diferenças

estatisticamente significativas, com sobrevivências mais próximas de dados recentemente publicados [151].

No que respeita à influência do género sexual no prognóstico, o estudo português do IPO-Porto não regista diferenças estatisticamente significativas nas curvas de sobrevivência aos 10 anos para qualquer dos sexos. Esta constatação está de acordo com estudos recentemente publicados que indicam que o género não é um factor preponderante de prognóstico [39].

O estadiamento TMN dos tumores malignos em geral e do CN em particular, tem por objectivo não só conferir significado prognóstico às diferentes formas de apresentação clínica do CN, como adequar o tratamento a grupos de doentes de risco semelhante, como ainda permitir a comparação dos resultados dos diversos centros de tratamento. O estadiamento TNM aprovado em 1978 pela UICC (*Union International Contre le Cancer*) [152] classificava as adenopatias valorizando apenas as características de existência ou não de fixação e de homolateralidade ou não, seguindo um critério semelhante ao de todas as neoplasias de cabeça e pescoço. Simultaneamente, a AJCC (*American Joint Committee for Cancer Staging*) aprovava uma forma de estadiamento do CN semelhante à da UICC/1978, com a diferença que as adenopatias eram classificadas de acordo com a sua dimensão [153]. Esta opção veio a ser aceite pela UICC, dando origem à classificação da UICC-1987 [154]. Entretanto, uma outra forma de quantificar o valor prognóstico das adenopatias valorizando a sua localização cervical, era proposta por Ho [155]. Uma análise do valor prognóstico da variável “N” [156] quer da classificação UICC/1978, quer da UICC-AJCC/1987, quer da classificação de Ho, salientava que a fixação e dimensão das adenopatias teria relevância prognóstica, relacionada com maior índice de metastização à distância, o que não acontecia com a homolateralidade ou bilateralidade. A quinta edição de estadiamento UICC-AJCC/1997 concilia estas formas de classificação de “N”, fazendo uma melhor correspondência prognóstica entre esta variável e a sobrevivência, o que é confirmado nomeadamente por Chua e colaboradores numa revisão de 324 doentes [157] e por Lee e colaboradores, numa análise retrospectiva de 2687 doentes [158], sendo esta a razão por que, segundo este autor, a sexta edição de estadiamento UICC-AJCC/2002 [159], apenas faz alterações formais e de pequena relevância.

De entre os componentes do sistema TMN, o “T” o “N” e o “Estadio” são considerados os factores que independentemente mais influem no prognóstico dos doentes com CN [160]. No grupo de doentes estudados em Portugal, a dispersão dos



casos não permitiu efectuar uma análise independente dos valores prognósticos do “T” e “N”. No que respeita ao estadiamento do conjunto TNM, o mesmo motivo levou a que se considerassem os doentes em estágio I e II num único grupo, o que é suportado pelo facto de que segundo Lee e colaboradores [158] estes estádios não apresentarem diferenças prognósticas relevantes. Conseguiu-se assim um número de doentes em cada grupo que permitiu uma análise estatística comparativa (40 doentes em Estadio I e II, 79 em Estadio III, 94 em Estadio IV). A constante actualização da base de dados do estudo português, em que se foram introduzindo como variáveis as formas de estadiamento entretanto aprovadas (UICC/1978, UICC-AJCC/1987, AJCC/2002), permitiu analisar comparativamente a acuidade prognóstica de cada uma delas, que é particularmente evidente aos 10 anos de seguimento (Figura 14a e 14b). O estudo das classificações TNM permitiu concluir que em semelhança com a literatura, em Portugal, qualquer das formas de classificação apresenta diferenças estatisticamente significativas na relação sobrevivência – estadiamento (UICC/1978  $P=0,001$ ; UICC-AJCC/1987  $P=0,004$ ; AJCC/2002  $P=0,0002$ ), sendo estas diferenças mais evidentes quando aplicada a classificação da AJCC/2002.

A abordagem terapêutica deste tipo de carcinomas tem variado ao longo das últimas décadas. Inicialmente, todos os doentes eram apenas tratados com radioterapia externa, seguida de cirurgia de esvaziamento cervical para adenopatias residuais. Posteriormente a este esquema terapêutico foi associada a quimioterapia, com carácter adjuvante, neoadjuvante, concomitante ou concorrential em diversos esquemas de fármacos em ensaios constantes, visando otimizar o tratamento e melhorar as sobrevivências.

A análise dos resultados obtidos no IPO-Porto demonstrou que os doentes que efectuaram radioterapia isolada apresentaram uma taxa de sobrevivência aos 3 anos de 60,3%, semelhante nomeadamente ao descrito no estudo da Asian Oceania Clinical Oncology Association (AOCOA) [161]. Demonstra também que a taxa de sobrevivência aos 3 anos melhorou significativamente (75%) nos doentes que efectuaram de tratamento com quimioterapia adjuvante, independentemente do seu esquema ( $P=0,004$ ; resultados não apresentados). Esta diferença foi confirmada acentuando-se quando se analisaram os resultados com maior tempo de seguimento (Figura 15). Tal facto tornou-se particularmente evidente nos doentes que beneficiaram de esquemas de quimioterapia que incluíram CDDP (Figura 16) com taxas de sobrevivência de 85,9% aos 5 anos e 71,6% aos 10 anos. Os resultados obtidos são levemente superiores aos descritos na literatura, que apontam para uma sobrevivência de cerca de 80-90% nos estádios iniciais [162], 50-70% se não houver

metastização regional [163]. Deverá ter-se em conta que o estudo efectuado pelo nosso grupo de trabalho não é randomizado, apresenta um número reduzido de pacientes, todos com CN tipo II e III da OMS, os quais, segundo Marks e colaboradores [41] tendem a ser mais radiosensíveis, têm um período livre de doença maior após tratamento e mesmo melhores sobrevivências.

Uma análise de resultados de sobrevivência neste tipo de patologia requer ainda uma averiguação da causa de falecimento, que pode ser devido à persistência ou recidiva local, regional ou à distância, procurando assim relacionar a causa de morte com o tipo de tratamento e identificar o local da presumível falência terapêutica.

Foi possível investigar a causa de morte em 59 de 69 doentes falecidos por cancro, o que é um dado habitualmente não pesquisado nos estudos consultados, mas que se considera fundamental para uma correcta avaliação dos objectivos terapêuticos.

A análise da causa de falecimento demonstra ser a falência à distância a principal causa de morte, ocorrendo em cerca de metade dos casos, isoladamente, (45,8%), ou associada a falência local ou regional (52,6%). Quando analisada a frequência de metastização em função do tratamento, verificou-se que esta ocorreu em 74,2% dos doentes tratados apenas com radioterapia e em 25,8% dos que beneficiaram de quimioterapia adjuvante com CDDP e 5 FU, dando consistência ao objectivo da quimioterapia adjuvante, ou seja, reduzir a probabilidade de metastização a distância. No entanto, esta continua a ser a principal causa de morte constatada no nosso estudo, o que é corroborado pelo 9º Grupo de Estudo de Cancro da Nasofaringe [164], onde simultaneamente se refere não estar este problema resolvido pelo uso de Quimioterapia concomitante. A taxa de metastização à distância mantém-se assim como um problema crucial.

Finalmente, deve também ser considerado que a terapêutica com quimioterapia e radioterapia provoca diversos efeitos secundários de variada expressão e gravidade. A otorreia recorrente e a diminuição da acuidade auditiva (sensorial induzida pela quimioterapia, ou de transmissão relacionada com a disfunção tubar provocada pela radioterapia), são exemplos de efeitos secundários susceptíveis de reduzir a qualidade de vida futura destes doentes. A xerostomia, a fibrose muscular nas áreas englobadas no campo de radiação, os problemas dentários associados a este tipo de tratamento, são também exemplos de alguns destes efeitos que vão comprometer significativamente a capacidade de deglutição de uma forma progressivamente mais severa ao longo do tempo, levando a engasgamento fácil e opção forçada quase exclusivamente por dietas moles. A implementação da plataforma de avaliação

sistemática da Qualidade de Vida dos doentes oncológicos de ORL e cabeça e pescoço efectuada no IPO-Porto através de um protocolo entre esta Unidade de Saúde e a Universidade Fernando Pessoa, poderá contribuir no futuro para uma melhor avaliação da qualidade de vida dos doentes com CN.



## 5.2 Relação CN – EBV em Portugal

A relação entre as formas II e III de CN e o EBV estão larga e consistentemente documentadas na literatura. Têm sido publicados vários estudos acerca da infecção por EBV e o desenvolvimento CN [43-45], tendo sido também demonstrado que a infecção por EBV nas células epiteliais da nasofaringe ocorre antes da expansão clonal da população de células tumorais [42]. A maioria das publicações tem como base o estudo de populações com alta taxa de endemicidade da doença.

O objectivo deste estudo consistiu na detecção do EBV em tecido tumoral da nasofaringe e sangue periférico de doentes com carcinoma da nasofaringe e em indivíduos saudáveis, provenientes duma área não endémica, considerada de baixo risco.

Embora a frequência de casos EBV positivos nas amostras de tecido tumoral em blocos de parafina seja alta (84.2%), seria de esperar que todos os tecidos apresentassem células infectadas com EBV. Este resultado deve-se provavelmente à qualidade do DNA nas amostras e à eficiência da extracção e purificação do DNA viral, a partir de amostras de fragmentos de tecido tumoral em blocos de parafina. Dada a qualidade insuficiente das amostras, foi utilizado um protocolo de *nested* PCR, de forma a aumentar a sensibilidade do método de detecção. De facto, os resultados da detecção de EBV nas amostras de tecido fresco demonstram uma percentagem de casos positivos de 100%, corroborando outros estudos que demonstram que todas as células tumorais da nasofaringe apresentam DNA do vírus [165-166]. No caso de amostras provenientes de sangue periférico dos doentes com CN foi encontrada uma frequência de casos EBV positivos de 53.1%. No grupo controlo, não foi encontrado DNA de EBV no sangue periférico. Não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas na distribuição dos casos EBV positivos e negativos, atendendo ao género, nos grupos analisados. Estudos recentes indicam que doentes com carcinoma da nasofaringe apresentam DNA de EBV em circulação no sangue periférico [167-168]. A análise da detecção de EBV de acordo com o estágio tumoral, indica que a frequência de casos EBV positivos é superior em tumores de estágio mais avançado, apesar desta diferença estar no limiar da significância estatística ( $P=0.069$ ). Estes resultados sugerem a que a libertação de DNA de EBV para o sangue periférico, ocorre mais facilmente ou em maior quantidade nos doentes com tumores mais avançados.



### 5.3 Estudo de polimorfismos genéticos associados a CN em Portugal

A etiologia do CN é complexa e multifactorial, e como anteriormente se demonstrou, está associada também, não só com o EBV e a agentes carcinogénicos não víricos [56-61], mas também a predisposições genéticas do hospedeiro, que o tornam mais susceptível para a destabilização do seu genoma, induzida pelos factores carcinogénicos referidos. Neste contexto, têm sido estudados diversos polimorfismos genéticos contribuindo para aumentar a susceptibilidade individual para cancro, nomeadamente de CN [48-52, 54]. Foram também publicados estudos nacionais que contribuíram também para o melhor conhecimento da influência de polimorfismos genéticos em Portugal, nomeadamente na susceptibilidade para CN e na antecipação da idade de desenvolvimento da doença [53, 55, 135].

A TP53 é reconhecidamente um importante regulador do ciclo celular e uma alteração da sua função pode levar à proliferação celular descontrolada e consequentemente à transformação neoplásica [169-170]. A simples substituição no codão 72 do gene, de CGC (Arginina) para CCC (Prolina), induz a expressão de proteínas com características bioquímicas e biológicas diferentes [171]. Assim acontece com o polimorfismo do codão 72 no gene *TP53*, em que a variante Pro é descrita como sendo menos eficiente na indução da apoptose que a variante Arg [170, 172]. Esta é provavelmente a razão por que o genótipo Pro/Pro parece oferecer maior susceptibilidade para o desenvolvimento de CN. O estudo efectuado a este nível, no presente trabalho, contribui com os primeiros dados sobre a relevância deste polimorfismo no desenvolvimento de CN numa população ocidental [53], corroborando os estudos até então existentes, efectuados em populações asiáticas [54, 173], indicando que o genótipo Pro/Pro do *TP53* é de facto um factor de aumento de risco de CN, independentemente de se tratar de uma população caucasiana ou asiática.

No âmbito do trabalho que se apresenta, foi efectuado um outro estudo analisando o polimorfismo A870G no gene *CCND1*, de forma a avaliar a sua importância no desenvolvimento de CN, tendo como ponto de partida estudos publicados por Deng e colaboradores, demonstrando que a proteína LMP1 do EBV possui a capacidade de regular o crescimento celular pela expressão de *CCND1* através da via NF- $\kappa$ B no CN e sugerindo que o polimorfismo A870G no gene *CCND1* esteja associado ao desenvolvimento e susceptibilidade para CN [174]. O polimorfismo A870G do exão 4 parece modular o "splicing" do mRNA, originando 2 transcriptos (*a* e *b*). O genótipo

AA origina um aumento dos níveis de transcrito *b* nas células tumorais, resultando num aumento da quantidade de uma proteína que não possui sequências envolvidas no *turnover* e degradação rápida, a região PEST (destruction box) e alguns estudos indicam que possui um tempo de semi-vida superior [175-177]. No entanto, os indivíduos que possuem o genótipo GG parecem possuir níveis celulares de CCND1 diferentes dos indivíduos que possuem o genótipo AA. Por outro lado, um estudo recente indica que o transcripto *b* origina uma proteína que não é acumulada de forma alterada nas células e possui uma estabilidade semelhante à proteína originada pelo transcripto *a* [178]. Este estudo demonstra ainda que o transcripto *a* constitui um catalisador mais eficiente da fosforilação/inativação da RB, activando assim o ciclo celular.

Os resultados do presente trabalho, indicam que indivíduos portadores do genótipo GG possuem um risco 2,17 vezes superior para o desenvolvimento de cancro da nasofaringe e uma susceptibilidade ainda superior, com um risco acrescido de 2,32 vezes, quando considerados apenas os casos de pacientes com carcinoma indiferenciado da nasofaringe, associado à infecção por EBV. Estes achados são concordantes com os encontrados por outros autores, sugerindo que o genótipo GG está associado ao desenvolvimento CN [174, 179], e em linha com o que já vinha sendo descrito em outros tumores [180-181], nomeadamente em Portugal.

Para além de estar associado a um maior risco de CN, o polimorfismo A870G parece estar também associado a um encurtamento do intervalo de tempo para o aparecimento de CN, já que, no estudo caso-controlo referido [135] (englobando doentes com CN, cancro do cervix uterino e controlos saudáveis), o tempo médio para o aparecimento de CN associado a EBV foi de 73 anos para os portadores de genótipo AA e AG e de 61 anos para os de genótipo GG (log-rank:  $P = 0.006$ ). Mais, tendo em conta que o tempo médio para o aparecimento de cancro do cervix uterino foi de 60 anos para os portadores de genótipo AA e AG e de 50 anos para os de genótipo GG (log-rank  $P = 0.0001$ ), e considerando assim todos os casos de cancro relacionados com vírus com potencial oncogénico deste estudo, a análise de Kaplan-Meyer permite concluir que o tempo médio para o desenvolvimento de cancro em doentes homocigóticos GG para o genótipo CCND1 (52 anos) era 8 anos menor, quando comparado com os doentes portadores dos genótipos AG ou AA (60 anos) (log-rank:  $P = 0.0003$ ).



## **6. Conclusões e Perspectivas Futuras**



## 6. Conclusões e Perspectivas Futuras

O estudo do CN, apresentando numerosas interdisciplinaridades e implicações, é de tal forma vasto que a abordagem deste tema é uma tarefa sempre temerária e permanentemente inacabada. No entanto considera-se ter sido dada resposta à totalidade dos objectivos propostos neste trabalho, versando o estudo do CN em aspectos epidemiológicos, clínicos e moleculares, como tentaremos concluir.

No que respeita ao Objectivo Geral definido no ponto 2.1.1 especificado no ponto 2.2.1, onde se propunha proceder à caracterização epidemiológica do CN numa população portuguesa (especificamente do Norte de Portugal), o estudo retrospectivo da casuística do IPO-Porto identificou alguns aspectos relevantes para objectivar a nossa realidade. De salientar o facto de se ter encontrado uma percentagem elevada de carcinomas de tipo II e III da OMS (cerca de 94%), aspecto não analisado em estatísticas de âmbito nacional tanto em Portugal (Registo Oncológico Nacional) como na globalidade dos países (GLOBOCAN). Trata-se de uma percentagem que recentra a discussão da epidemiologia do CN em países não endémicos, e que foi discutida neste trabalho, tendo em conta alguns aspectos particulares da população portuguesa, sua origem, costumes e actividades. Verificou-se também que o intervalo de tempo entre o primeiro sintoma e o diagnóstico (7 meses), não variou ao longo dos 31 anos analisados; este dado tem implicações relevantes, demonstrando que neste tipo de tumores, os avanços tecnológicos e as melhorias em cuidados primários, não se traduziram numa maior acuidade diagnóstica. A apresentação clínica da doença foi, em Portugal, sobreponível ao verificado na literatura, bem como o diagnóstico em estádios avançados da doença. Neste aspecto, registou-se uma correspondência entre o estadiamento TNM e o prognóstico, que se vem tornando mais representativa com as mudanças introduzidas (UICC/1978 -  $P=0,001$ , UICC-AJCC/1987 -  $P=0,004$ , AJCC/2002 -  $P=0,0002$ ). No presente trabalho, tal como na pesquisa bibliográfica efectuada, a metastização à distância é a principal causa de insucesso no tratamento da doença.

O Objectivo Geral 2.1.2 propunha verificar a relação do EBV com o CN em Portugal, especificamente (2.2.2) estudando a presença de genoma do vírus em 68 doentes com CN, provenientes da casuística do IPO-Porto. Os resultados demonstram a presença de EBV em todas as amostras de tecido fresco de doentes com CN, em 84,2% das amostras de parafina, e em 53,1% das amostras de sangue periférico. Em contraposição, nenhum dos controlos saudáveis evidenciava genoma do EBV. Esta

diferença foi estatisticamente significativa e demonstra a relação entre o CN de tipo II e III com o EBV, também em Portugal.

O Objectivo Específico 2.2.2 consistia no estudo de alguns polimorfismos genéticos relacionados com o CN na população referida. Foram estudados dois polimorfismos que se revelaram muito interessantes, indicando que determinados genótipos apresentam maior susceptibilidade para CN, podendo inclusive contribuir para encurtar o tempo médio para o desenvolvimento de cancro.

A concretização do delineado nos Objectivos Específicos 2.2.2 e 2.2.3, abre caminho à prossecução do Objectivo Geral 2.1.3, ou seja, de perspectivar o papel de marcadores virais e não virais no CN. Os estudos efectuados e as conclusões obtidas, podem seguramente ser a base para estudos futuros, nomeadamente:

- 1- Sobre a relevância da quantificação da carga viral de EBV como biomarcador de prognóstico, também de outros polimorfismos, designadamente em moléculas envolvidas na resposta imunitária, regulação de ciclo celular, reparação de DNA e metabolização de xenobióticos (CYP3A4).
- 2- Desenvolvimento dos estudos sobre influência dos polimorfismos, numa perspectiva farmacogenómica. A avaliação do possível papel destas variantes genéticas, como factores preditivos de resposta ao tratamento e optimização dos esquemas de terapêutica com opções individualizadas e adequadas a cada doente, poderá contribuir para o objectivo de aumentar a eficácia e reduzir a toxicidade dos tratamentos.
- 3- Caracterização do perfil de incidência das variantes II e III da OMS em relação à variante I nas diversas populações caucasianas, estudando nomeadamente eventuais diferenças entre as da Europa do Sul em relação às da Europa do Norte.

Estas questões são apenas algumas, dentro de um universo de conhecimentos por desvendar, os quais terão, no futuro, enorme impacto nos processos de prevenção, diagnóstico e tratamento dos doentes com neoplasias do tipo CN. No entanto, o clínico sente dificuldade em esperar, porque em cada instante necessita tomar decisões cruciais, no interesse dos doentes. Este trabalho, sobre aspectos clínicos, epidemiológicos e moleculares do CN em Portugal, procura efectuar uma apreciação do "estado da arte", neste tema. A estreita colaboração entre o Clínico e o Laboratório é fundamental na evolução do conhecimento, mas a criação de um Grupo Nacional de estudo de Neoplasias Virais afigura-se imprescindível.

## **7. Referências Bibliográficas**



## 7. Referências Bibliográficas

1. Houseman, J.G., *Digital Zoology Student Workbook- version 1.0*, in *Jawed fishes*, McGraw-Hill, Editor. 2002, McGraw-Hill - higher education.
2. Bull, J.W., *Tentorium cerebelli*. Proc R Soc Med, 1969. **62**(12): p. 1301-10.
3. Kerr, A.G. and J. Groves, eds. *Anatomy of the pharynx and oesophagus* 5 ed. Basic Sciences, ed. B.P. David Wright. Vol. cap10;245-283. 1987, Scott-Brown's Otolaryngology
4. Beltramello, A., G. Puppini, G. El-Dalati, M. Girelli, R. Cerini, A. Sbarbati, and P. Pacini, *Fossa navicularis magna*. AJNR Am J Neuroradiol, 1998. **19**(9): p. 1796-8.
5. Sadler, T., ed. *Langman's Medical Embryology*. 1995.
6. William, P., R. Warwic, and M. Dyson, eds. *Gray's Anatomy thirty-seventh edition*,. Vol. pp161-8. 1993.
7. Diewert, V., *A morphometric analysis of craniofacial growth and changes in spatial relations during secondary palatal development in human embryos and fetuses*. Am J Anat., 1983. **167**(4): p. 494-522.
8. Masters, A.V., D. Falk, and T.B. Gage, *Effects of age and gender on the location and orientation of the foramen magnum in rhesus macaques (Macaca mulatta)*. Am J Phys Anthropol, 1991. **86**(1): p. 75-80.
9. Jeffery, N., *Cranial base angulation and growth of the human fetal pharynx*. Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol, 2005. **284**(1): p. 491-9.
10. Ondrey, F. and S. Wright, eds. *Ballenger's Otorhinolaryngology Head and Neck Surgery*. 16th, chapter 60. ed. 2003.
11. Nemzek, W.R., H.A. Brodie, S.T. Hecht, B.W. Chong, C.J. Babcook, and J.A. Seibert, *MR, CT, and plain film imaging of the developing skull base in fetal specimens*. AJNR Am J Neuroradiol, 2000. **21**(9): p. 1699-706.
12. Netter, F., ed. *Atlas of Human Anatomy*. 4th edition ed. 2006, Saunders, Elsevier: Philadelphia.
13. Michael Schünke, L.M.R., Edward D. Lamperti, ed. *Atlas of anatomy - neck and internal organs*. Thieme.
14. P. H. Rhys Evans, P.Q.M., Patrick J. Gullane, ed. *Tumors of Parapharyngeal Space*. Principles and practice of head and neck oncology 2003, Martin Dunitz: London. 375-384.
15. Pan, W.R., H. Suami, R.J. Corlett, and M.W. Ashton, *Lymphatic drainage of the nasal fossae and nasopharynx: preliminary anatomical and radiological study with clinical implications*. Head Neck, 2009. **31**(1): p. 52-7.
16. Bourihis, J. and G. Schwaab, *Cancer du Nasopharynx (cavum)*, in *Oto-rhinolaryngologie*, P. Enycl Méd Chir (Elsevier, Editor. 1999.
17. Jackson, C., *Primary carcinoma of the nasopharynx: a table of cases*. JAMA, 1901(37): p. 371-77.

18. Digby, K., W. Fook, and Y. Che, *Nasopharyngeal carcinoma*. Br J Surg, 1941; **28**: p. 517-37.
19. Kuang, G.Q., L.G. Mo, and R.N. Yang, [*Investigation of the site of origin to develop micro-focal nasopharyngeal carcinoma*]. Zhonghua Zhong Liu Za Zhi, 2005. **27**(8): p. 505-6.
20. Sham, J.S., Y.K. Cheung, D. Choy, F.L. Chan, and L. Leong, *Nasopharyngeal carcinoma: CT evaluation of patterns of tumor spread*. AJNR Am J Neuroradiol, 1991. **12**(2): p. 265-70.
21. Van Hasselt, C.A. and A.G. Gibb, eds. *Nasopharyngeal Carcinoma* 2ed. Vol. 1. 1999, Greenwich Medical Media Ltd: Hong Kong. 338.
22. Shanmugaratnam K and S. LH, *Hystologic typing of upper respiratory tract tumours in International Hystologic Typing of Tumours*. 1978, WHO. p. 19-21.
23. Vikram, B.-N.c., *Carcinoma of the Nasopharynx*. Clinics in Oncology, 1986. **vol 5** n°3 .(4): p. 475-483.
24. Shanmugaratnam, K. and L-. Sobin, *Hystologic typing of tumors of upper respiratory tract and ear*. International histological classification of tumors 2nd edn, WHO.;:32-33., ed. S.L.e. Shanmugaratnam K. 1991, Geneva.
25. Neel, H.B., 3rd, *Nasopharyngeal carcinoma. Clinical presentation, diagnosis, treatment, and prognosis*. Otolaryngol Clin North Am, 1985. **18**(3): p. 479-90.
26. IARC, ed. *Pathology and Genetics of Head and Neck Tumours*. Who Health Organization Classification of Tumours, ed. L.H.S. Paul Kleihues. 2005: Lyon.
27. Neel, H.B., 3rd and W. Taylor, *Clinical presentation and diagnosis of nasopharyngeal carcinoma:current status*. Nasopharyngeal Carcinoma:current concepts, ed. U. Prasad, Ablashi,DV, Levine, P. H. , eds and 1983, Kuala Lumpur: University of Malaya press. 1-10.
28. Lindberg, R., *Distribution of cervical lymph node metastases from squamous cell carcinoma of the upper respiratory and digestive tracts*. Cancer, 1972. **29**(6): p. 1446-9.
29. Wolden, S., *Cancer of the Nasopharynx*, Atlas of Clinical Oncology:Cancer of the Head and Neck, ed. M. Jatin P. Shah, MS (Surg.), FACS, and H.F.L. Hon. FRCS (Edin). 2001, London.
30. Wei, W.I. and J.S. Sham, *Nasopharyngeal carcinoma*. Lancet, 2005. **365**(9476): p. 2041-54.
31. Sharma, A.K. and M.S. Kies, *Pocket Guide to Neck Dissection Classification and TNM staging of head and neck cancer*. 3rd ed. American Academy of Otolaryngology–Head and Neck Surgery Foundation, Inc., ed. K.T. Robbins. 2008, Alexandria.
32. Huang DP, J.P., *Introduction:nasopharyngeal cancer*. Semin Cancer Biol, 2002. **12**: p **419**.
33. Parkin, D., S. Whelan, J. Ferlay, L. Raymond, and J. young, *Cancer Incidence in Five Continents*. IARC Scientific Publications n°143, 1997. **7**.



34. Vasef, M.A., A. Ferlito, and L.M. Weiss, *Nasopharyngeal carcinoma, with emphasis on its relationship to Epstein-Barr virus*. Ann Otol Rhinol Laryngol, 1997. **106**(4): p. 348-56.
35. Liebowitz, D., *Nasopharyngeal carcinoma: the Epstein-Barr virus association*. Semin Oncol, 1994. **21**(3): p. 376-81.
36. Cvitkovic, E., M. Bachouchi, and J.P. Armand, *Nasopharyngeal carcinoma. Biology, natural history, and therapeutic implications*. Hematol Oncol Clin North Am, 1991. **5**(4): p. 821-38.
37. Yu, M.C. and J.M. Yuan, *Epidemiology of nasopharyngeal carcinoma*. Semin Cancer Biol, 2002. **12**(6): p. 421-9.
38. Parkin D, *Cancer Burden in the year 2000. The global Picture*. Eur J Cancer, 2001. **37**: p. S4-S66.
39. Spano, J.P., P. Busson, D. Atlan, J. Bourhis, J.P. Pignon, C. Esteban, and J.P. Armand, *Nasopharyngeal carcinomas: an update*. Eur J Cancer, 2003. **39**(15): p. 2121-35.
40. Wenig, B.M., *Nasopharyngeal carcinoma*. Ann Diagn Pathol, 1999. **3**(6): p. 374-85.
41. Marks, J.E., J.L. Phillips, and H.R. Menck, *The National Cancer Data Base report on the relationship of race and national origin to the histology of nasopharyngeal carcinoma*. Cancer, 1998. **83**(3): p. 582-8.
42. Niedobitek, G., M.L. Hansmann, H. Herbst, L.S. Young, D. Dienemann, C.A. Hartmann, T. Finn, S. Pitteroff, A. Welt, I. Anagnostopoulos, and et al., *Epstein-Barr virus and carcinomas: undifferentiated carcinomas but not squamous cell carcinomas of the nasopharynx are regularly associated with the virus*. J Pathol, 1991. **165**(1): p. 17-24.
43. Pearson, G.R., L.H. Weiland, H.B. Neel, 3rd, W. Taylor, J. Earle, S.E. Mulroney, H. Goepfert, A. Lanier, M.L. Talvot, B. Pilch, M. Goodman, A. Huang, P.H. Levine, V. Hyams, E. Moran, G. Henle, and W. Henle, *Application of Epstein-Barr virus (EBV) serology to the diagnosis of North American nasopharyngeal carcinoma*. Cancer, 1983. **51**(2): p. 260-8.
44. Lung, M.L., K.H. Chan, W.P. Lam, S.K. Kou, D. Choy, C.W. Chan, and M.H. Ng, *In situ detection of Epstein-Barr virus markers in nasopharyngeal carcinoma patients*. Oncology, 1989. **46**(5): p. 310-7.
45. Weiss, L.M., L.A. Movahed, A.E. Butler, S.A. Swanson, H.F. Frierson, Jr., P.H. Cooper, T.V. Colby, and S.E. Mills, *Analysis of lymphoepithelioma and lymphoepithelioma-like carcinomas for Epstein-Barr viral genomes by in situ hybridization*. Am J Surg Pathol, 1989. **13**(8): p. 625-31.
46. Breda, E., A. Queirós, C. Moniz, V. Ferreira, C. Palmeira, D. Pinto, A. Vasconcelos, R. Medeiros, J. Aires, and C. Lopes, *Detecção do vírus Epstein-Barr no carcinoma indiferenciado da nasofaringe em Portugal - zona norte*. Rev. Port. ORL, 2001. **39**(4): p. 363-368

47. Zeng, Y.X. and W.H. Jia, *Familial nasopharyngeal carcinoma*. *Semin Cancer Biol*, 2002. **12**(6): p. 443-50.
48. Tiwawech, D., P. Srivatanakul, A. Karalak, and T. Ishida, *Cytochrome P450 2A6 polymorphism in nasopharyngeal carcinoma*. *Cancer Lett*, 2006. **241**(1): p. 135-41.
49. Hildesheim, A. and P.H. Levine, *Etiology of nasopharyngeal carcinoma: a review*. *Epidemiol Rev*, 1993. **15**(2): p. 466-85.
50. Jiang, J.H., Z. Li, G. Su, W.H. Jia, R.H. Zhang, X.J. Yu, M. Zhang, J.M. Wen, and Y.X. Zeng, *[Study on genetic polymorphisms of CYP2F1 gene in Guangdong population of China]*. *Zhonghua Yi Xue Yi Chuan Xue Za Zhi*, 2006. **23**(4): p. 383-7.
51. Nazar-Stewart, V., T.L. Vaughan, R.D. Burt, C. Chen, M. Berwick, and G.M. Swanson, *Glutathione S-transferase M1 and susceptibility to nasopharyngeal carcinoma*. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 1999. **8**(6): p. 547-51.
52. Cao, Y., X.P. Miao, M.Y. Huang, L. Deng, L.F. Hu, I. Ernberg, Y.X. Zeng, D.X. Lin, and J.Y. Shao, *Polymorphisms of XRCC1 genes and risk of nasopharyngeal carcinoma in the Cantonese population*. *BMC Cancer*, 2006. **6**: p. 167.
53. Sousa, H., A.M. Santos, R. Catarino, D. Pinto, A. Vasconcelos, C. Lopes, E. Breda, and R. Medeiros, *Linkage of TP53 codon 72 pro/pro genotype as predictive factor for nasopharyngeal carcinoma development*. *Eur J Cancer Prev*, 2006. **15**(4): p. 362-6.
54. Tsai, M.H., C.D. Lin, Y.Y. Hsieh, F.C. Chang, F.J. Tsai, W.C. Chen, and C.H. Tsai, *Prognostic significance of the proline form of p53 codon 72 polymorphism in nasopharyngeal carcinoma*. *Laryngoscope*, 2002. **112**(1): p. 116-9.
55. Catarino, R.J., E. Breda, V. Coelho, D. Pinto, H. Sousa, C. Lopes, and R. Medeiros, *Association of the A870G cyclin D1 gene polymorphism with genetic susceptibility to nasopharyngeal carcinoma*. *Head Neck*, 2006. **28**(7): p. 603-8.
56. Yu, M.C., J.H. Ho, S.H. Lai, and B.E. Henderson, *Cantonese-style salted fish as a cause of nasopharyngeal carcinoma: report of a case-control study in Hong Kong*. *Cancer Res*, 1986. **46**(2): p. 956-61.
57. Shao, Y.M., S. Poirier, H. Ohshima, C. Malaveille, Y. Zeng, G. de The, and H. Bartsch, *Epstein-Barr virus activation in Raji cells by extracts of preserved food from high risk areas for nasopharyngeal carcinoma*. *Carcinogenesis*, 1988. **9**(8): p. 1455-7.
58. Poirier, S., G. Bouvier, C. Malaveille, H. Ohshima, Y.M. Shao, A. Hubert, Y. Zeng, G. de The, and H. Bartsch, *Volatile nitrosamine levels and genotoxicity of food samples from high-risk areas for nasopharyngeal carcinoma before and after nitrosation*. *Int J Cancer*, 1989. **44**(6): p. 1088-94.
59. Armstrong, R.W., P.B. Imrey, M.S. Lye, M.J. Armstrong, M.C. Yu, and S. Sani, *Nasopharyngeal carcinoma in Malaysian Chinese: occupational exposures to particles, formaldehyde and heat*. *Int J Epidemiol*, 2000. **29**(6): p. 991-8.
60. Demers, P.A., P. Boffetta, M. Kogevinas, A. Blair, B.A. Miller, C.F. Robinson, R.J. Roscoe, P.D. Winter, D. Colin, E. Matos, and et al., *Pooled reanalysis of cancer mortality among five cohorts of workers in wood-related industries*. *Scand J Work Environ Health*, 1995. **21**(3): p. 179-90.

61. Mirabelli, M.C., J.A. Hoppin, P.E. Tolbert, R.F. Herrick, D.R. Gnepp, and E.A. Brann, *Occupational exposure to chlorophenol and the risk of nasal and nasopharyngeal cancers among U.S. men aged 30 to 60*. *Am J Ind Med*, 2000. **37**(5): p. 532-41.
62. Hildesheim, A., M. Dosemeci, C.C. Chan, C.J. Chen, Y.J. Cheng, M.M. Hsu, I.H. Chen, B.F. Mittl, B. Sun, P.H. Levine, J.Y. Chen, L.A. Brinton, and C.S. Yang, *Occupational exposure to wood, formaldehyde, and solvents and risk of nasopharyngeal carcinoma*. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 2001. **10**(11): p. 1145-53.
63. Sriamporn, S., V. Vatanasapt, P. Pisani, S. Yongchaiyudha, and V. Rungpitarangsri, *Environmental risk factors for nasopharyngeal carcinoma: a case-control study in northeastern Thailand*. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 1992. **1**(5): p. 345-8.
64. Armstrong, R.W., M.J. Armstrong, M.C. Yu, and B.E. Henderson, *Salted fish and inhalants as risk factors for nasopharyngeal carcinoma in Malaysian Chinese*. *Cancer Res*, 1983. **43**(6): p. 2967-70.
65. Yuan, J.M., X.L. Wang, Y.B. Xiang, Y.T. Gao, R.K. Ross, and M.C. Yu, *Non-dietary risk factors for nasopharyngeal carcinoma in Shanghai, China*. *Int J Cancer*, 2000. **85**(3): p. 364-9.
66. Epstein, M.A., B.G. Achong, and Y.M. Barr, *Virus Particles in Cultured Lymphoblasts from Burkitt's Lymphoma*. *Lancet*, 1964. **1**(7335): p. 702-3.
67. Umar, C.S., ed. *New developments in Epstein-Barr virus research* ed. Nova. 2006, Nova Science Publishers. 277-285.
68. Carter, J. and C. Suanders, eds. *Virology: Principles and Applications*. John Wiley and Sons, Ltd.
69. Lopes, V., L.S. Young, and P.G. Murray, *Epstein-Barr virus-associated cancers: aetiology and treatment*. *Herpes*, 2003. **10**(3): p. 78-82.
70. Harabuchi, Y., N. Yamanaka, A. Kataura, S. Imai, T. Kinoshita, F. Mizuno, and T. Osato, *Epstein-Barr virus in nasal T-cell lymphomas in patients with lethal midline granuloma*. *Lancet*, 1990. **335**(8682): p. 128-30.
71. Dimery, I.W., J.S. Lee, M. Blick, G. Pearson, G. Spitzer, and W.K. Hong, *Association of the Epstein-Barr virus with lymphoepithelioma of the thymus*. *Cancer*, 1988. **61**(12): p. 2475-80.
72. Butler, A.E., T.V. Colby, L. Weiss, and C. Lombard, *Lymphoepithelioma-like carcinoma of the lung*. *Am J Surg Pathol*, 1989. **13**(8): p. 632-9.
73. Hanji, D. and L. Gohao, *Malignant lymphoepithelial lesions of the salivary glands with anaplastic carcinomatous change. Report of nine cases and review of literature*. *Cancer*, 1983. **52**(12): p. 2245-52.
74. Mills, S.E., M.B. Austin, and M.E. Randall, *Lymphoepithelioma-like carcinoma of the uterine cervix. A distinctive, undifferentiated carcinoma with inflammatory stroma*. *Am J Surg Pathol*, 1985. **9**(12): p. 883-9.
75. Shibata, D. and L.M. Weiss, *Epstein-Barr virus-associated gastric adenocarcinoma*. *Am J Pathol*, 1992. **140**(4): p. 769-74.

76. Rickinson, A. and E. Kieff, *Epstein-Barr Virus*. Fields Virology, ed. D.K. BN Fields, PM Howley, et al,eds. 1996, Philadelphia: Lippincott-Raven. 397-2446.
77. Kieff, E., *Epstein-Barr virus and its replication*. Fields Virology, ed. K.D. Fields BN, Howley PM eds. 1996, Philadelphia: Lippincott-Raven. 2343-2396.
78. Raab-Traub, N. and K. Flynn, *The structure of the termini of the Epstein-Barr virus as a marker of clonal cellular proliferation*. Cell, 1986. **47**(6): p. 883-9.
79. Pathmanathan, R., U. Prasad, R. Sadler, K. Flynn, and N. Raab-Traub, *Clonal proliferations of cells infected with Epstein-Barr virus in preinvasive lesions related to nasopharyngeal carcinoma*. N Engl J Med, 1995. **333**(11): p. 693-8.
80. Young LS, R.A., *Epstein-Barr virus: 40 years on*. Nat Rev Cancer, 2004. **4**: p. 757-68.
81. Tanner, J.E., M.X. Wei, C. Alfieri, A. Ahmad, P. Taylor, T. Ooka, and J. Menezes, *Antibody and antibody-dependent cellular cytotoxicity responses against the BamHI A rightward open-reading frame-1 protein of Epstein-Barr virus (EBV) in EBV-associated disorders*. J Infect Dis, 1997. **175**(1): p. 38-46.
82. Niedobitek, G., A. Agathangelou, and J.M. Nicholls, *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): p. 165-74.
83. Kingma, D.W., W.B. Weiss, E.S. Jaffe, S. Kumar, K. Frekko, and M. Raffeld, *Epstein-Barr virus latent membrane protein-1 oncogene deletions: correlations with malignancy in Epstein-Barr virus-associated lymphoproliferative disorders and malignant lymphomas*. Blood, 1996. **88**(1): p. 242-51.
84. Schaefer, B.C., M. Woisetschlaeger, J.L. Strominger, and S.H. Speck, *Exclusive expression of Epstein-Barr virus nuclear antigen 1 in Burkitt lymphoma arises from a third promoter, distinct from the promoters used in latently infected lymphocytes*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1991. **88**(15): p. 6550-4.
85. Fahraeus, R., H.L. Fu, I. Ernberg, J. Finke, M. Rowe, G. Klein, K. Falk, E. Nilsson, M. Yadav, P. Busson, and et al., *Expression of Epstein-Barr virus-encoded proteins in nasopharyngeal carcinoma*. Int J Cancer, 1988. **42**(3): p. 329-38.
86. Yates, J., N. Warren, D. Reisman, and B. Sugden, *A cis-acting element from the Epstein-Barr viral genome that permits stable replication of recombinant plasmids in latently infected cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1984. **81**(12): p. 3806-10.
87. Hammerschmidt, W. and B. Sugden, *Genetic analysis of immortalizing functions of Epstein-Barr virus in human B lymphocytes*. Nature, 1989. **340**(6232): p. 393-7.
88. Zimmer, U., H.K. Adldinger, G.M. Lenoir, M. Vuillaume, M.V. Knebel-Doeberitz, G. Laux, C. Desgranges, P. Wittmann, U.K. Freese, U. Schneider, and et al., *Geographical prevalence of two types of Epstein-Barr virus*. Virology, 1986. **154**(1): p. 56-66.
89. Wang, D., D. Liebowitz, F. Wang, C. Gregory, A. Rickinson, R. Larson, T. Springer, and E. Kieff, *Epstein-Barr virus latent infection membrane protein alters the human B-lymphocyte phenotype: deletion of the amino terminus abolishes activity*. J Virol, 1988. **62**(11): p. 4173-84.

90. Dawson, C.W., A.B. Rickinson, and L.S. Young, *Epstein-Barr virus latent membrane protein inhibits human epithelial cell differentiation*. *Nature*, 1990. **344**(6268): p. 777-80.
91. Rowe, M., M. Peng-Pilon, D.S. Huen, R. Hardy, D. Croom-Carter, E. Lundgren, and A.B. Rickinson, *Upregulation of bcl-2 by the Epstein-Barr virus latent membrane protein LMP1: a B-cell-specific response that is delayed relative to NF-kappa B activation and to induction of cell surface markers*. *J Virol*, 1994. **68**(9): p. 5602-12.
92. Jenkins, P. and P. Farrel, *Are particular Epstein-Barr virus strains linked to disease?* *Sem Cancer Biology*, 1996. **7**:: p. 209-215
93. Sandvej, K., J.W. Gratama, M. Munch, X.G. Zhou, R.L. Bolhuis, B.S. Andresen, N. Gregersen, and S. Hamilton-Dutoit, *Sequence analysis of the Epstein-Barr virus (EBV) latent membrane protein-1 gene and promoter region: identification of four variants among wild-type EBV isolates*. *Blood*, 1997. **90**(1): p. 323-30.
94. Murono, S., T. Yoshizaki, S. Tanaka, H. Takeshita, C.S. Park, and M. Furukawa, *Detection of Epstein-Barr virus in nasopharyngeal carcinoma by in situ hybridization and polymerase chain reaction*. *Laryngoscope*, 1997. **107**(4): p. 523-6.
95. Chao, T.Y., K.C. Chow, J.Y. Chang, C.C. Wang, T.Y. Tsao, H.J. Harn, and K.H. Chi, *Expression of Epstein-Barr virus-encoded RNAs as a marker for metastatic undifferentiated nasopharyngeal carcinoma*. *Cancer*, 1996. **78**(1): p. 24-9.
96. Tsai, S.T., Y.T. Jin, and I.J. Su, *Expression of EBER1 in primary and metastatic nasopharyngeal carcinoma tissues using in situ hybridization. A correlation with WHO histologic subtypes*. *Cancer*, 1996. **77**(2): p. 231-6.
97. Nicholls, J.M., D. Chua, P.M. Chiu, and D.L. Kwong, *The detection of clinically occult nasopharyngeal carcinoma in patients following radiotherapy--an analysis of 69 patients*. *J Laryngol Otol*, 1996. **110**(5): p. 496-9.
98. Darr, C.D., A. Mauser, and S. Kenney, *Epstein-Barr virus immediate-early protein BRLF1 induces the lytic form of viral replication through a mechanism involving phosphatidylinositol-3 kinase activation*. *J Virol*, 2001. **75**(13): p. 6135-42.
99. Sousa H, B.E., Santos AM, Catarino R, Pinto D, Moutinho J, Machado JC, Lopes C, Medeiros R., *Role of IL-1RN VNTR polymorphism in genetic susceptibility to viral associated neoplasias*. *Molecular Carcinogenesis*, 2010. Código de fluxo MC-10-0120.
100. Sousa H, B.E., Santos AM, Catarino R, Pinto D, Lopes C, Medeiros R. , *Tumour Necrosis Factor Alpha -308 G>A polymorphism: a genetic risk marker for Nasopharyngeal Carcinoma in Portugal*. *BMC Câncer*. Código de fluxo 2092371521363154., 2010. Código de fluxo 2092371521363154.
101. Lo, K.W., J. Kwong, A.B. Hui, S.Y. Chan, K.F. To, A.S. Chan, L.S. Chow, P.M. Teo, P.J. Johnson, and D.P. Huang, *High frequency of promoter hypermethylation of RASSF1A in nasopharyngeal carcinoma*. *Cancer Res*, 2001. **61**(10): p. 3877-81.
102. Chang, Y., S.D. Cheng, and C.H. Tsai, *Chromosomal integration of Epstein-Barr virus genomes in nasopharyngeal carcinoma cells*. *Head Neck*, 2002. **24**(2): p. 143-50.

103. Hui, A.B., K.W. Lo, S.F. Leung, P. Teo, M.K. Fung, K.F. To, N. Wong, P.H. Choi, J.C. Lee, and D.P. Huang, *Detection of recurrent chromosomal gains and losses in primary nasopharyngeal carcinoma by comparative genomic hybridisation*. *Int J Cancer*, 1999. **82**(4): p. 498-503.
104. Sathyan, K.M., K.R. Nalinakumari, T. Abraham, and S. Kannan, *Influence of single nucleotide polymorphisms in H-Ras and cyclin D1 genes on oral cancer susceptibility*. *Oral Oncol*, 2006. **42**(6): p. 607-13.
105. Schernhammer, E.S., G.J. Tranah, E. Giovannucci, A.T. Chan, J. Ma, G.A. Colditz, D.J. Hunter, W.C. Willett, and C.S. Fuchs, *Cyclin D1 A870G polymorphism and the risk of colorectal cancer and adenoma*. *Br J Cancer*, 2006. **94**(6): p. 928-34.
106. Catarino, R., A. Matos, D. Pinto, D. Pereira, R. Craveiro, A. Vasconcelos, C. Lopes, and R. Medeiros, *Increased risk of cervical cancer associated with cyclin D1 gene A870G polymorphism*. *Cancer Genet Cytogenet*, 2005. **160**(1): p. 49-54.
107. Huang, G.W., W.N. Mo, G.Q. Kuang, H.T. Nong, M.Y. Wei, M. Sunagawa, and T. Kosugi, *Expression of p16, nm23-H1, E-cadherin, and CD44 gene products and their significance in nasopharyngeal carcinoma*. *Laryngoscope*, 2001. **111**(8): p. 1465-71.
108. Young, L.S. and A.B. Rickinson, *Epstein-Barr virus: 40 years on*. *Nat Rev Cancer*, 2004. **4**(10): p. 757-68.
109. Yi, F., A. Saha, M. Murakami, P. Kumar, J.S. Knight, Q. Cai, T. Choudhuri, and E.S. Robertson, *Epstein-Barr virus nuclear antigen 3C targets p53 and modulates its transcriptional and apoptotic activities*. *Virology*, 2009. **388**(2): p. 236-47.
110. Hu, Z., G. Jin, L. Wang, F. Chen, X. Wang, and H. Shen, *MDM2 promoter polymorphism SNP309 contributes to tumor susceptibility: evidence from 21 case-control studies*. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 2007. **16**(12): p. 2717-23.
111. Sousa H, P.M., Breda E, Catarino R, Medeiros R., *Role of MDM2 SNP 309 polymorphism in the initiation and early age of onset of nasopharyngeal carcinoma*. *Molecular Cancer* 2010. Código de fluxo 1339483401376379.
112. Birgander, R., A. Sjalander, Z. Zhou, C. Fan, L. Beckman, and G. Beckman, *p53 polymorphisms and haplotypes in nasopharyngeal cancer*. *Hum Hered*, 1996. **46**(1): p. 49-54.
113. Goncalves, R., A. Freitas, M. Branco, A. Rosa, A.T. Fernandes, L.A. Zhivotovsky, P.A. Underhill, T. Kivisild, and A. Brehm, *Y-chromosome lineages from Portugal, Madeira and Acores record elements of Sephardim and Berber ancestry*. *Ann Hum Genet*, 2005. **69**(Pt 4): p. 443-54.
114. Lucotte, G., N. Gerard, and G. Mercier, *North African genes in Iberia studied by Y-chromosome DNA haplotype 5*. *Hum Biol*, 2001. **73**(5): p. 763-9.
115. Gerard, N., S. Berriche, A. Aouizerate, F. Dieterlen, and G. Lucotte, *North African Berber and Arab influences in the western Mediterranean revealed by Y-chromosome DNA haplotypes*. *Hum Biol*, 2006. **78**(3): p. 307-16.
116. Arnaiz-Villena, A., J. Martinez-Laso, E. Gomez-Casado, N. Diaz-Campos, P. Santos, A. Martinho, and H. Breda-Coimbra, *Relatedness among Basques, Portuguese,*

- Spaniards, and Algerians studied by HLA allelic frequencies and haplotypes.* Immunogenetics, 1997. **47**(1): p. 37-43.
117. Ribeiro, A. and J. Saraiva, *História de Portugal-a formação do território-da Lusitânia ao alargamento do País.* 1 ed. Vol. 1. 2004: QuidNovi. 9-41.
118. Breda E, C.R., Medeiros R, *Nasopharyngeal carcinoma in a south european population: epidemiological and clinical aspects in Portugal.* European Archives of Oto-Rhino-Laryngology and Head & Neck 2010. Código de fluxo No. EAORL-D-09-00723R1.
119. Parkin, D.M., F. Bray, J. Ferlay, and P. Pisani, *Global cancer statistics, 2002.* CA Cancer J Clin, 2005. **55**(2): p. 74-108.
120. Fandi, A., M. Altun, N. Azli, J.P. Armand, and E. Cvitkovic, *Nasopharyngeal cancer: epidemiology, staging, and treatment.* Semin Oncol, 1994. **21**(3): p. 382-97.
121. Bar-Sela, G., A. Kuten, I. Minkov, E. Gov-Ari, and O. Ben-Izhak, *Prevalence and relevance of EBV latency in nasopharyngeal carcinoma in Israel.* J Clin Pathol, 2004. **57**(3): p. 290-3.
122. Boussen, H., N. Bouaouina, N. Mokni-Baizig, A. Gamoudi, L. Chouchane, F. Benna, and A. Ladgham, *[Nasopharyngeal carcinoma. Recent data].* Pathol Biol (Paris), 2005. **53**(1): p. 45-51.
123. Breda, E., R. Catarino, I. Azevedo, T. Fernandes, C. Barreira da Costa, and R. Medeiros, *[Characterization of the clinical evolution of nasopharyngeal carcinoma in a portuguese population].* Acta Otorrinolaringol Esp, 2007. **58**(5): p. 191-7.
124. d'Espiney Amaro, C., P. Montalvao, P. Henriques, M. Magalhaes, and J. Olias, *Nasopharyngeal carcinoma: our experience.* Eur Arch Otorhinolaryngol, 2009. **266**(6): p. 833-8.
125. Hirayama, T., *Descriptive and analytical epidemiology of nasopharyngeal cancer.* IARC Sci Publ, 1978(20): p. 167-89.
126. Ou, S.H., J.A. Zell, A. Ziogas, and H. Anton-Culver, *Epidemiology of nasopharyngeal carcinoma in the United States: improved survival of Chinese patients within the keratinizing squamous cell carcinoma histology.* Ann Oncol, 2007. **18**(1): p. 29-35.
127. Morales-Angulo, C., R. Megia Lopez, A. Rubio Suarez, F. Rivera Herrero, and J. Rama, *[Carcinoma of the nasopharynx in Cantabria].* Acta Otorrinolaringol Esp, 1999. **50**(5): p. 381-6.
128. Esteller More, E., M. Quer, J.M. Fabra, P. Garcia, X. Leon, J. Viladot, and J. Burgues, *[Nasopharyngeal carcinoma. An epidemiological and clinical study].* An Otorrinolaringol Ibero Am, 1990. **17**(5): p. 473-94.
129. Abad Iglesias, R., *[Descriptive study of cancer of the cavum, particularly epidermoid carcinoma (1)].* Acta Otorrinolaringol Esp, 1989. **40**(2): p. 81-99.
130. Andejani, A.A., V. Kundapur, and K. Malaker, *Age distribution of nasopharyngeal cancer in Saudi Arabia.* Saudi Med J, 2004. **25**(11): p. 1579-82.
131. Kamal, M.F. and S.M. Samarrai, *Presentation and epidemiology of nasopharyngeal carcinoma in Jordan.* J Laryngol Otol, 1999. **113**(5): p. 422-6.

132. Burt, R.D., T.L. Vaughan, and B. McKnight, *Descriptive epidemiology and survival analysis of nasopharyngeal carcinoma in the United States*. Int J Cancer, 1992. **52**(4): p. 549-56.
133. Zong, Y.S., R.F. Zhang, S.Y. He, and H. Qiu, *Histopathologic types and incidence of malignant nasopharyngeal tumors in Zhongshan County*. Chin Med J (Engl), 1983. **96**(7): p. 511-6.
134. Vokes, E.E., D.N. Liebowitz, and R.R. Weichselbaum, *Nasopharyngeal carcinoma*. Lancet, 1997. **350**(9084): p. 1087-91.
135. Catarino, R., D. Pereira, E. Breda, A. Coelho, A. Matos, C. Lopes, and R. Medeiros, *Oncogenic virus-associated neoplasia: a role for cyclin D1 genotypes influencing the age of onset of disease?* Biochem Biophys Res Commun, 2008. **370**(1): p. 118-22.
136. Vaughan, T.L., J.A. Shapiro, R.D. Burt, G.M. Swanson, M. Berwick, C.F. Lynch, and J.L. Lyon, *Nasopharyngeal cancer in a low-risk population: defining risk factors by histological type*. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, 1996. **5**(8): p. 587-93.
137. Asche, F., R. Menezes, and J.F. Dias, *Price transmission in cross boundary supply chains*. Empirica 2007. **34**: p. 477-489.
138. Dias, J., J. Filipe, R. Guia, R. Menezes, and V. Guerreiro, *Cod, the faithful friend: the Portuguese industry of codfish*. Economia Global e Gestão, 2001. **1**: p. 103-117.
139. Royal-College-Physicians, *London Conference - Scientific exchange 2000 consensus statement: Dietary fat, the Mediterranean diet and lifelong good health in Royal College of Physicians*. 2000, Royal College of Physicians: London.
140. Hervieu, B., R. Capone, and S. Abis, *The challenge posed by the cereals sector in the Mediterranean*. CIHEAM Analytic note, 2006. **9**.
141. Monteiro, A.A., *The vegetable processing industry in Portugal: Successes and failures* Options Mediterranennes, Les fruits et légumes dans les économies méditerranéennes, 1992 **Sér. A /no 19**.
142. Garcia-Closas, R., A. Berenguer, and C.A. Gonzalez, *Changes in food supply in Mediterranean countries from 1961 to 2001*. Public Health Nutr, 2006. **9**(1): p. 53-60.
143. Guerra, A., F. Feldl, and B. Koletzko, *Fatty acid composition of plasma lipids in healthy Portuguese children: is the Mediterranean diet disappearing?* Ann Nutr Metab, 2001. **45**(2): p. 78-81.
144. Pico, F.A., *Madeira Recuperável em Portugal: estudo do fluxo embalagens de madeira* in Departamento de Ciências e Engenharia do Ambiente - Faculdade de Ciências e Tecnologia. 2008, Universidade Nova de Lisboa: Lisboa. p. 113.
145. Costa, E.C., N., *Reflexos territoriais do processo da reestruturação industrial em Portugal Continental na década de oitenta*. Finisterra 1996. **XXXI**: p. 65-95.
146. AICEP (2009) *Portugal- country profile*. Portugal Global.
147. Dickson, R.I., *Nasopharyngeal carcinoma: an evaluation of 209 patients*. Laryngoscope, 1981. **91**(3): p. 333-54.
148. Van Hasselt, C.A. and D.W. Skinner, *Nasopharyngeal carcinoma. An analysis of 100 Chinese patients*. S Afr J Surg, 1990. **28**(3): p. 92-4.



149. Suzina, S.A. and M. Hamzah, *Clinical presentation of patients with nasopharyngeal carcinoma*. Med J Malaysia, 2003. **58**(4): p. 539-45.
150. Geara, F.B., E. Nasr, S.L. Tucker, E. Brihi, G. Zaytoun, U. Hadi, Z. Salem, N. El Saghir, P. Issa, and A. Shamseddine, *Nasopharyngeal cancer in the Middle East: experience of the American University of Beirut Medical Center*. Int J Radiat Oncol Biol Phys, 2005. **61**(5): p. 1408-15.
151. Baujat, B., H. Audry, J. Bourhis, A.T. Chan, H. Onat, D.T. Chua, D.L. Kwong, M. Al-Sarraf, K.H. Chi, M. Hareyama, S.F. Leung, K. Thephamongkhol, and J.P. Pignon, *Chemotherapy in locally advanced nasopharyngeal carcinoma: an individual patient data meta-analysis of eight randomized trials and 1753 patients*. Int J Radiat Oncol Biol Phys, 2006. **64**(1): p. 47-56.
152. UICC, ed. *TNM Classification of Malignant Tumours -third edition*. 3rd ed. 1978, UICC: Gèneve.
153. American Joint Committee, C., ed. *American Joint Committee for Cancer Staging and end Results Reporting (1978) Manual for Staging of Cancer*. 1978: Chicago.
154. Harmer, M., ed. *TNM Classification of Malignant Tumours / fourth edition*. fourth edition ed. 1990, IUCC- Union internationale Contre le Cancer.
155. Ho, J.H., *An epidemiologic and clinical study of nasopharyngeal carcinoma*. Int J Radiat Oncol Biol Phys, 1978. **4**(3-4): p. 182-98.
156. Roth, S.L., G. Bertram, and H. Sack, *Carcinoma of the nasopharynx--comparison of the UICC and Ho clinical staging systems*. Klin Wochenschr, 1989. **67**(2): p. 74-85.
157. Chua, D.T., J.S. Sham, W.I. Wei, W.K. Ho, and G.K. Au, *The predictive value of the 1997 American Joint Committee on Cancer stage classification in determining failure patterns in nasopharyngeal carcinoma*. Cancer, 2001. **92**(11): p. 2845-55.
158. Lee, A.W., J.S. Au, P.M. Teo, T.W. Leung, D.T. Chua, W.M. Sze, B.C. Zee, S.C. Law, S.F. Leung, S.Y. Tung, D.L. Kwong, and W.H. Lau, *Staging of nasopharyngeal carcinoma: suggestions for improving the current UICC/AJCC Staging System*. Clin Oncol (R Coll Radiol), 2004. **16**(4): p. 269-76.
159. Greene, F., D. Page, and I. Fleming, eds. *AJCC cancer staging handbook from AJCC staging manual*. 2002, Springer: New York.
160. Liu, M.Z., L.L. Tang, J.F. Zong, Y. Huang, Y. Sun, Y.P. Mao, L.Z. Liu, A.H. Lin, and J. Ma, *Evaluation of sixth edition of AJCC staging system for nasopharyngeal carcinoma and proposed improvement*. Int J Radiat Oncol Biol Phys, 2008. **70**(4): p. 1115-23.
161. Chua, D.T., J.S. Sham, D. Choy, V. Lorvidhaya, Y. Sumitsawan, S. Thongprasert, V. Vootiprux, A. Cheirsilpa, T. Azhar, and A.H. Reksodiputro, *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-Oceanian Clinical Oncology Association Nasopharynx Cancer Study Group. Cancer, 1998. **83**(11): p. 2270-83.

162. Bailet, J.W., R.J. Mark, E. Abemayor, S.P. Lee, L.M. Tran, G. Juillard, and P.H. Ward, *Nasopharyngeal carcinoma: treatment results with primary radiation therapy*. Laryngoscope, 1992. **102**(9): p. 965-72.
163. Teo, P.M., A.T. Chan, W.Y. Lee, T.W. Leung, and P.J. Johnson, *Enhancement of local control in locally advanced node-positive nasopharyngeal carcinoma by adjunctive chemotherapy*. Int J Radiat Oncol Biol Phys, 1999. **43**(2): p. 261-71.
164. *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**(3): p. 463-9.
165. Thompson, M.P. and R. Kurzrock, *Epstein-Barr virus and cancer*. Clin Cancer Res, 2004. **10**(3): p. 803-21.
166. Vera-Sempere, F., J. Burgos, M.S. Botella, and C. Morera, *Comparative analysis of Epstein-Barr virus (EBV) detection by nested-PCR and non-isotopic in situ hybridization in nasopharyngeal carcinoma (NPC)*. Clin Chim Acta, 1998. **271**(2): p. 119-32.
167. Leung, S.F., B. Zee, B.B. Ma, E.P. Hui, F. Mo, M. Lai, K.C. Chan, L.Y. Chan, W.H. Kwan, Y.M. Lo, and A.T. Chan, *Plasma Epstein-Barr viral deoxyribonucleic acid quantitation complements tumor-node-metastasis staging prognostication in nasopharyngeal carcinoma*. J Clin Oncol, 2006. **24**(34): p. 5414-8.
168. Chan, K.C. and Y.M. Lo, *Circulating EBV DNA as a tumor marker for nasopharyngeal carcinoma*. Semin Cancer Biol, 2002. **12**(6): p. 489-96.
169. Hollstein, M., D. Sidransky, B. Vogelstein, and C.C. Harris, *p53 mutations in human cancers*. Science, 1991. **253**(5015): p. 49-53.
170. Pim, D. and L. Banks, *p53 polymorphic variants at codon 72 exert different effects on cell cycle progression*. Int J Cancer, 2004. **108**(2): p. 196-9.
171. Thomas, M., A. Kalita, S. Labrecque, D. Pim, L. Banks, and G. Matlashewski, *Two polymorphic variants of wild-type p53 differ biochemically and biologically*. Mol Cell Biol, 1999. **19**(2): p. 1092-100.
172. Brooks, L.A., J.A. Tidy, B. Gusterson, L. Hiller, J. O'Nions, M. Gasco, M.C. Marin, P.J. Farrell, W.G. Kaelin, Jr., and T. Crook, *Preferential retention of codon 72 arginine p53 in squamous cell carcinomas of the vulva occurs in cancers positive and negative for human papillomavirus*. Cancer Res, 2000. **60**(24): p. 6875-7.
173. Tiwawech, D., P. Srivatanakul, A. Karaluk, and T. Ishida, *The p53 codon 72 polymorphism in Thai nasopharyngeal carcinoma*. Cancer Lett, 2003. **198**(1): p. 69-75.
174. Deng, L., X.R. Zhao, K.F. Pan, Y. Wang, X.Y. Deng, Y.Y. Lu, and Y. Cao, *Cyclin D1 polymorphism and the susceptibility to NPC using DHPLC*. Sheng Wu Hua Xue Yu Sheng Wu Wu Li Xue Bao (Shanghai), 2002. **34**(1): p. 16-20.

175. Betticher DC, T.N., Altermatt HJ, Hoban P, Ryder WD, Heighway J, *Alternate splicing produces a novel cyclin D1 transcript*. *Oncogene*, 1995. **11**: p. 1005-11.
176. Wang L, H.T., Takahashi T, Mitsumori K, Kamoto T, Kakehi Y, Kakinuma H, Sato K, Nakamura A, Ogawa O, Kato T, *Cyclin D1 gene polymorphism is associated with an increased risk of urinary bladder cancer*. *Carcinogenesis*, 2002. **23**(2): p. 257-64.
177. Sawa H, O.T., Ukita H, Murakami H, Chiba Y, Kamada H, Hara M, Saito I, *Alternatively spliced forms of cyclin D1 modulate entry into cell cycle in an inverse manner*. *Oncogene*, 1998. **16**: p. 1701-12.
178. Solomon DA, W.Y., Fox SR, Lambeck TC, Giesting S, Lan Z, Senderowicz AM, Conti CJ, Knudsen ES, *Cyclin D1 splice variants. Differential effects on localization, RB phosphorylation, and cellular transformation*. *J Biol Chem*, 2003. **32**: p. 30339-47.
179. Sui, J., W. Gao, X.J. Li, J. Ma, Y.X. Ren, X. Song, C.J. Xiao, and W.R. Tang, *[Cyclin D1 gene G870A polymorphism and susceptibility to nasopharyngeal carcinoma]*. *Zhonghua Er Bi Yan Hou Tou Jing Wai Ke Za Zhi*, 2009. **44**(3): p. 227-31.
180. Matthias C, B.K., Jahnke V, Leder K, Haas J, Heighway J, Jones PW, Strange RC, Fryer AA, Hoban PR, *Polymorphism within the cyclin D1 gene is associated with prognosis in patients with squamous cell carcinoma of the head and neck*. *Clin Cancer Res*, 1998. **4**(10): p. 2411-8.
181. Matthias C, J.V., Jones PW, Hoban PR, Aldersea JE, Worrall SF, Fryer AA, Strange RC, *Cyclin D1, Glutathione S-Transferase, and Cytochrome P450 Genotypes and Outcome in patients with upper aerodigestive tract cancers: assessment of the importance of individual genes using multivariate analysis*. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 1999. **8**: p. 815-23.



## **8. Artigos Publicados ou em Publicação**



# ESTUDO DO CARCINOMA DE TIPO NASOFARINGEO

## Introdução e Perspectiva Multidisciplinar

Eduardo BREDA, Raquel CATARINO, Ana COELHO, Hugo SOUSA, Rui MEDEIROS

*... nunca saberás como são as cousas, nem sequer que nomes são na realidade os seus, porque os nomes que lhes deste não são mais do que isso, os nomes que lhes deste.*

José Saramago – As Intermitências da Morte – 2005

### RESUMO

A nasofaringe é uma estrutura anatómica singular, entre o aparelho respiratório e o digestivo. A sua localização, por si só, confere-lhe um estatuto privilegiado, sendo o *centro geodésico* de toda a patologia de otorrinolaringologia.

Um sem número de aspectos filogénicos, ontogénicos e embriológicos contribuem para a estruturação anatómica e fisiológica desta entidade, contribuindo fortemente para o desenvolvimento de determinadas patologias, quer directamente como é o caso da patologia embriológica, quer de forma indirecta e interactiva com o meio, de que são exemplos as patologias inflamatória e neoplásica, onde assume especial importância o Carcinoma de Tipo Nasofaríngeo.

Pretende-se com este trabalho contribuir para realçar a importância de uma abordagem multidisciplinar no estudo da nasofaringe, no entendimento de que com um conhecimento mais abrangente, se abre o caminho a uma melhor explicação dos diferentes tipos de patologia com ela relacionadas.

### SUMMARY

#### NASOPHARYNGEAL CARCINOMA STUDY

##### Introduction and Multidisciplinary Perspective

Nasopharynx is a particular anatomic structure, located between the respiratory and digestive systems, and it is the geographic centre of all otorhinolaryngologic pathologies. Numerous filogenetic, ontogenic and embryogenic factors contribute to the anatomic and physiologic structure of nasopharynx. These factors may directly contribute to the development of several pathologies, as the embryogenic pathology, or even in an indirect way, through the interaction with the environment, as the inflammatory and neoplastic pathologies, of which the nasopharyngeal carcinoma acquires great significance.

The objective of this study was to endorse the importance of a multidisciplinary approach in the study of nasopharynx, contributing to a wider knowledge about the different kinds of diseases associated with this anatomic structure.

E. B.: Serviço de Otorrinolaringologia. Instituto Português de Oncologia Francisco Gentil. Porto

R.C., A.C., H.S., R.M.: Unidade de Oncologia Molecular. Instituto Português de Oncologia Francisco Gentil. Instituto Ciências Biomédicas Abel Salazar. Porto

© 2008 CELOM

## INTRODUÇÃO

A forma mais comum de transmitir e receber a percepção sempre parcial e transformada que temos da realidade<sup>1</sup>, e a que chamamos conhecimento<sup>2</sup>, é a de denominar os factos ou estruturas objecto do nosso estudo, usando para isso artificios mais ou menos racionais, usualmente relacionados com prévias denominações ou conceitos, segundo regras taxonómicas criteriosamente estabelecidas. Sequencialmente com alguma frequência se aplicam nomes a conceitos, factos e também a diagnósticos, sem pensar no conhecimento que lhe está subjacente, ficando estes pendurados por um nome que tudo diz e nada é.

O contributo das ciências básicas para o conhecimento da patologia nasofaríngea é de tal modo vasto que ultrapassa claramente a dimensão de um artigo. No entanto, assumindo o risco de tomar o papel de Jordain<sup>3</sup> quando atónito realizou que afinal sempre falara em prosa, propomo-nos lembrar alguns dos aspectos do papel de ciências básicas, pretendendo demonstrar que o seu estudo longe de árido e desconectado da prática clínica, é antes pelo contrário extraordinariamente interessante e relevante.

Pretende-se assim, realçar as potencialidades de uma abordagem multidisciplinar no estudo de uma estrutura anatómica, a nasofaringe, a qual raramente se encontra referida como entidade própria embora seja o *centro geodésico* de grande parte da patologia que dá sentido de unidade à especialidade de otorrinolaringologia.

Um sem número de aspectos filogénicos, ontogénicos e embriológicos contribuem para a estruturação anatómica e fisiológica desta entidade, de que resultam implicações patológicas de toda a ordem, quer directamente como é o caso da patologia embriológica, quer de forma indirecta e interactiva com o meio, de que são exemplos as pato-

logias inflamatória e neoplásica (Figura 1). Um exemplo da maior relevância é o carcinoma indiferenciado de tipo nasofaríngeo, indissolúvelmente relacionado com a sua localização anatómica, integrando as vias aero-digestivas superiores, e as características do tecido linfoide que parcialmente a constituem, permitindo uma infecção latente pelo vírus de Epstein – Barr.

Efectua-se também uma abordagem ao estudo desta variedade específica de neoplasia, procurando os alicerces que poderão ser o suporte da ponte entre a investigação básica e a investigação clínica

## NASOFARINGE – ABORDAGEM MULTIDISCIPLINAR

Nasofaringe, rinofaringe ou espaço pós-nasal são termos que retratam a ubiquidade de uma estrutura anatómica que ainda hoje se discute dever ser descrita ou não juntamente com a cavidade nasal ou com a faringe propriamente dita.

O revestimento da totalidade da faringe e grande parte das fossas nasais tem origem embriológica comum, derivando na extremidade cefálica do intestino primitivo, de um fundo de saco forrado por tecido endodérmico, separado pela membrana bucofaríngea do stomatodaeum, de origem ectodérmica<sup>4</sup>. Entre o stomatodaeum e a membrana bucofaríngea, desenvolve-se cefalicamente um recesso (bolsa de Rathke) que dará origem à adeno-hipófise, através da proliferação do mesenquima periplacodal. Entretanto o intestino primitivo invagina-se progressivamente em direcção ao cérebro<sup>5</sup>, formando a bolsa de Seessel. Seguidamente dá-se a ruptura da membrana bucofaríngea, o que permite a comunicação do intestino faríngeo com a cavidade celómica extra-embriónica, o que acontece pela quarta semana de gestação (Figura 2).

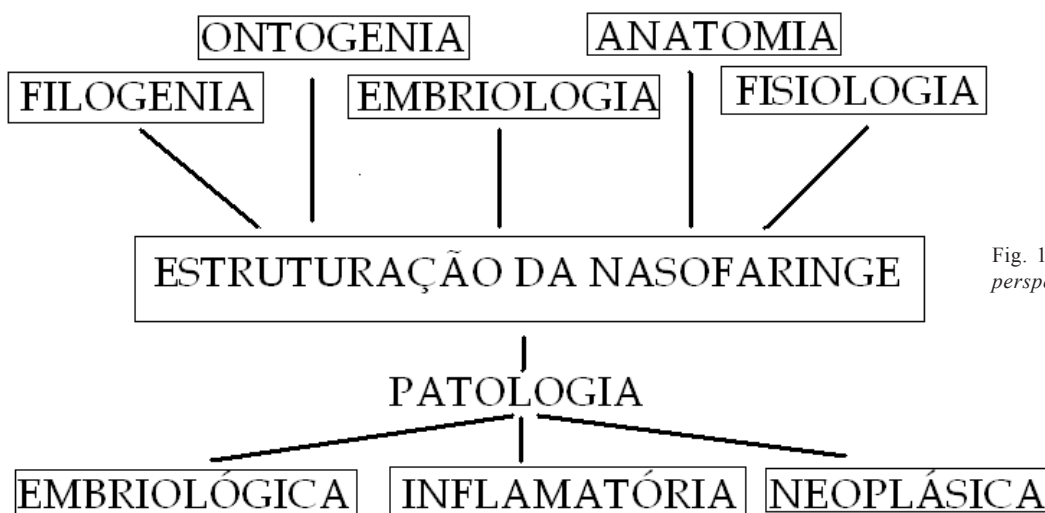


Fig. 1 – Nasofaringe, uma perspectiva multidisciplinar.



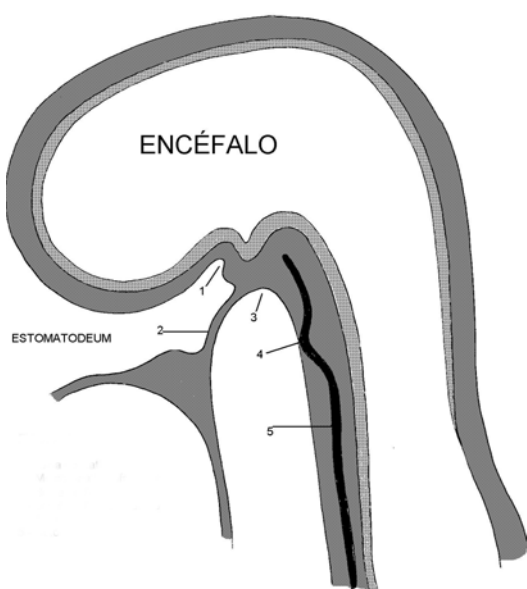


Fig. 2 – Embrião 3ª semana. 1-Bolsa de Rathke, 2-membrana bucofaringea, 3-bolsa de Seessel, 4-localização da bolsa de Tornwaldt, 5-notocórdio.

No seguimento da embriogénese da nasofaringe podemos considerar que o seu suporte músculo-esquelético se encontra dependente da evolução embriológica do viscerocrânio por um lado e do neurocrânio por outro<sup>6</sup>.

Do viscerocrânio depende o desenvolvimento dos arcos faríngeos ou branquiais, bolsas de mesoderme revestidas de um lado por ectoderme e de outro por endoderme. Este tecido mesodérmico diferencia-se em tecido ósseo, cartilágneo, muscular e vascular. Cada arco recebe ainda estruturas nervosas provenientes da crista neural, segundo padrões crânio-caudais bem definidos. Cada arco está separado pela prega e bolsa faríngeas respectivas (Figura 3).

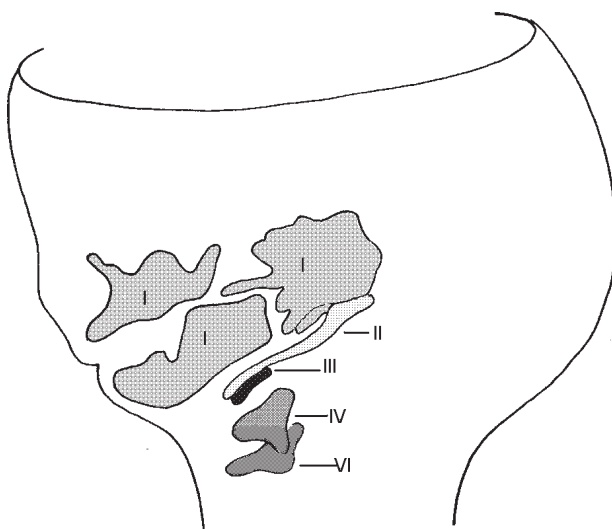


Fig. 3 – Distribuição esquemática das estruturas ósseo-cartilagíneas provenientes dos diversos arcos branquiais que se encontram que se encontram assinalados de I a IV.

Do primeiro arco branquial depende a formação, entre outros, do osso maxilar e mandíbula, bem como de dois dos ossículos do ouvido (martelo e bigorna), e ainda dos músculos da mastigação, do músculo tensor do tímpano e tensor do véu do palato. Da primeira e segunda pregas faríngeas origina-se o recesso faringo-timpânico que dá origem à cavidade do ouvido médio e a trompa auditiva (Eustáquio), bem como à parede faríngea dorsal, a qual é parcialmente invadida por tecido linfoide, proveniente da mesoderme.

Do neurocrânio desenvolvem-se as estruturas cranianas. São derivadas da crista neural, de origem ectodérmica (crânio pré-cordal) e também da mesoderme para-axial e lateral (crânio cordal), através de transformação mesenquimatoso, com posterior ossificação membranosa ou endocondral<sup>7</sup>. A base do crânio tem uma osteogénese predominantemente do tipo endocondral.

Cerca da quarta semana de vida intra-uterina, condensações de mesoderme formam uma placa occipital que irá constituir a porção basilar do osso occipital. Simultaneamente, a condensação mesenquimatoso prolonga-se para a frente, dorsalmente em relação à faringe para alcançar o primórdio da hipófise, constituindo assim o clivus da base do crânio e o dorso da sela do futuro osso esfenoide. De seguida prolonga-se ventralmente para formar a ligação com o etmóide e o septo nasal, e lateralmente dando origem às pequenas e grandes asas do esfenoide. Mais lateralmente envolve as vesículas auditivas, formando as cúpulas óticas (Figura 4).

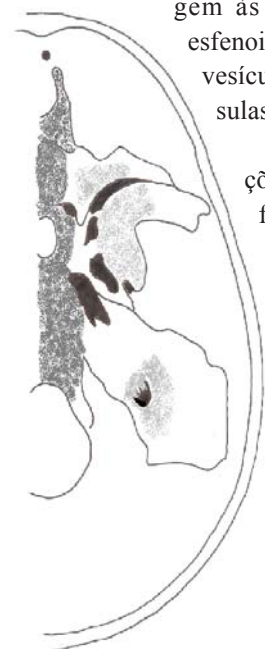


Fig. 4 – Vista dorsal do crânio, realçando as áreas dependentes do condrocrânio cordal e pré-cordal.

Podem entretanto ocorrer alterações da migração da adeno-hipófise, com paragem no interior do tecido mesenquimatoso que irá dar origem ao osso esfenoide.

Estas alterações são extremamente raras, ocorrendo na fase de obliteração da bolsa de Rathke, pela quinta/sexta semana de gestação. O canal faringo-hipofisário embrionário (canal craniofaringeo) pode assim persistir, (Figura 5) encontrando-se de uma forma assintomática em 0,42% da população<sup>8</sup>, estendendo-se entre a parede superior da nasofaringe e o pavimento da sela turca, anteriormente à sincondrose esfenobasilar. Esta

persistência pode também estar associada a alterações genéticas da migração neural, como a neurofibromatose de tipo I e a trissomia 13<sup>o</sup>, ou congénita mediante exposição a radiação ionizante, abuso de álcool, ou anticonvulsivantes<sup>10</sup>. No entanto há teorias que defendem que o canal craniofaríngeo representa apenas resíduos de um canal vascular formado durante a osteogénese<sup>11</sup>. De qualquer modo, uma parte ou a totalidade da adeno-hipófise pode estar neste canal ou mesmo na nasofaringe, situação em que uma cirurgia nesta área poderia conduzir a panhipopituitarismo<sup>12</sup>. Estão também referidas neoplasias com ponto de partida no canal craniofaríngeo – craniofaríngeomas, que sendo raros, podem ter uma localização infra-selar.

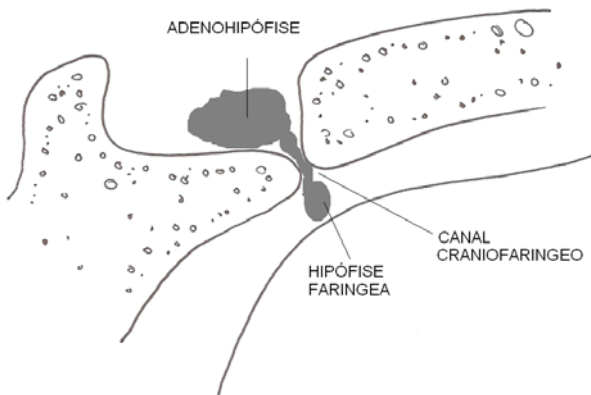


Fig. 5 – Canal craniofaríngeo.

De notar também que nesta fase, a extremidade cefálica do notocórdio, que tem profunda influência na génese do esqueleto, sendo o ponto de partida do esqueleto axial, atravessa a placa occipital obliquamente, da sua face dorsal até à face ventral, altura em que adere à endoderme reentrando em seguida na base do crânio para terminar caudalmente em relação à hipófise (Figura 6).

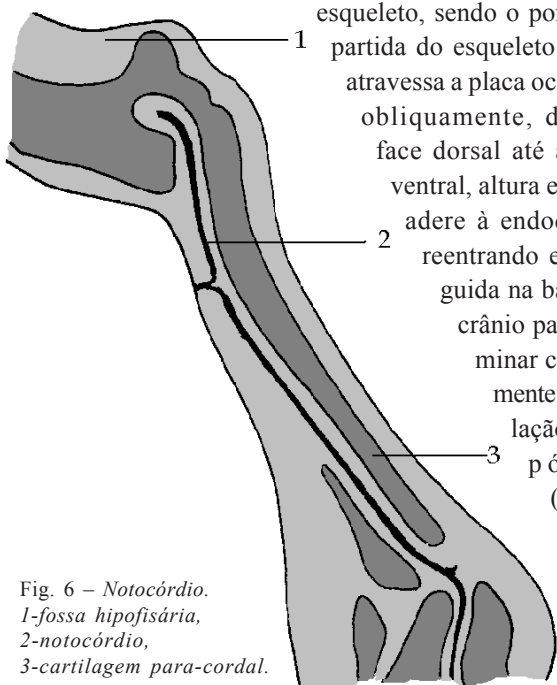


Fig. 6 – Notocórdio.  
1-fossa hipofisária,  
2-notocórdio,  
3-cartilagem para-cordal.

Quando se formam adesões nesta zona, fragmentos de mucosa faríngea acompanham a ascensão do notocórdio em direcção cefálica, provocando um divertículo, a bolsa faríngea de Tornwaldt, a que corresponderia uma depressão óssea na porção basilar do occipital denominada fossa navicular (Figura 7). No entanto esta correspondência não se confirmou num estudo de 492 crânios e 525 doentes, em que se detectou este achado anatómico em 5,3% dos primeiros e 3% dos segundos (estes estudados por TAC)<sup>13</sup> mas não se verificou em qualquer caso presença de Quisto de Tornwaldt.

A partir do notocórdio podem-se desenvolver neoplasias disontoténicas – cordomas – tumores de características benignas, que raramente se localizam a nível do clivus.

A morfologia da cavidade nasofaríngea fica assim na dependência do harmonioso desenvolvimento craniofacial, efectuado a partir do neurocrânio, que representará a sua parede fixa superior e posterior, e do viscerocrânio, dependente dos arcos branquiais que representarão não só as suas paredes laterais dotadas de uma mobilidade complexa, como também o limite anterior, nomeadamente o complexo nasomaxilar. Deste depende a formação das invaginações palatomaxilares, que separarão finalmente a cavidade oronasal<sup>14</sup>. É um período em que o crescimento craniofacial se dá predominantemente no sentido sagital, com aumento das dimensões verticais e antero-posteriores em detrimento da transversal, período esse em que é marcante o desenvolvimento da cartilagem de Meckel.



Fig. 7 – Localização do fossa navicular e tubérculo faríngeo.  
1-apófise pterigóide, 2-buraco lácer, 3-fossa navicular, 4-tubérculo faríngeo, 5-canal carotídeo, 6-cóndilo occipital, 7-buraco magno.

Numa rápida retrospectiva filogenética desta região, será relevante lembrar que tanto nos cordados como mesmo nos primeiros vertebrados, a comunicação com o exterior era comum, partilhada pelo tracto digestivo e respiratório. Na era aquática da sua evolução, a duas funções

estavam intimamente associadas, sendo o oxigénio dissolvido e as partículas em suspensão, absorvidas ou filtradas a partir da corrente de água entrando pela mesma abertura, a boca, e saindo via aparelho branquial, numa reminiscência do que é ainda utilizado por vertebrados actuais como as baleias e lampreias. Os Agnatas, confinados ao meio aquático e a um regime alimentar parasítico ou micrófago traduziam uma adaptação precária. A transformação dos primeiros arcos branquiais no sentido de dar sustentação à mandíbula, (Gnatóstomos) e permitir a separação da cavidade oronasal, com formação da coana primitiva são segundo E.C. Olson<sup>15</sup>, passos relevantes no sentido da satisfação das necessidades da oxigenação mais intensa que a respiração pulmonar permite nos Tetrápodes. É hoje comumente aceite que o sistema respiratório destes vertebrados terrestres é o resultado do desenvolvimento da bexiga-aérea ventral existente nos Dipnoi, os peixes com pulmão. No entanto, na maioria dos vertebrados a cavidade bucal e parte da faringe mantêm a sua função dupla mesmo após a separação da cavidade oronasal, apenas se conseguindo completa separação anatómica nos crocodilos, em que a laringe sobe para se continuar com a nasofaringe e permitir a respiração<sup>16</sup>.

As posições anatómicas relativas entre o aparelho digestivo e o respiratório a este nível traduzem esta dualidade, já que a cavidade nasal se coloca dorsalmente em relação à cavidade oral «digestiva», mas a laringe diverge ventralmente da faringe.

É ainda interessante do ponto de vista filogenético a relação com aspectos da evolução do córtex cerebral ao longo das espécies primatas, traduzida no desenvolvimento do córtex cerebral, separado das restantes estruturas do sistema nervoso central pela tenda do cerebelo. O desenvolvimento do lobo occipital, associado ao bipedalismo, segundo Bull (1969)<sup>17</sup>, não deixaria indiferentes as estruturas infratentoriais sujeitas a uma sobrecarga gravitacional, com consequente rotação inferior e posterior em direcção ao foramen magnum. Esta evolução mecânica encontra-se bem documentada no estudo de materiais fósseos.

Não deixará de ser um desafio relacionar estes dados com aspectos ontogénicos, através do estudo da morfogénese craniana ao longo do desenvolvimento pré-natal. Aqui se deverá ter em conta que, sendo verdade que o desenvolvimento do cérebro durante a gestação é considerável, não deixa de ser verdade que a questão gravitacional não se coloca na vida intra-uterina.

Um estudo de 50 fetos humanos efectuado em 2002 por Jeffery<sup>18</sup> demonstra que no início da gestação existe um progressivo aumento do ângulo supra-tentorial, bem

como do ângulo crâneo-basal, com consequente diminuição do ângulo infra-tentorial, traduzindo uma redução proporcional da massa infra-tentorial em relação à massa supra-tentorial em desenvolvimento (Figura 8). A velocidade desta alteração proporcional diminui com a idade, seguindo-se o aumento de volume do compartimento infra-tentorial, com consequente diminuição do ângulo supra-tentorial.

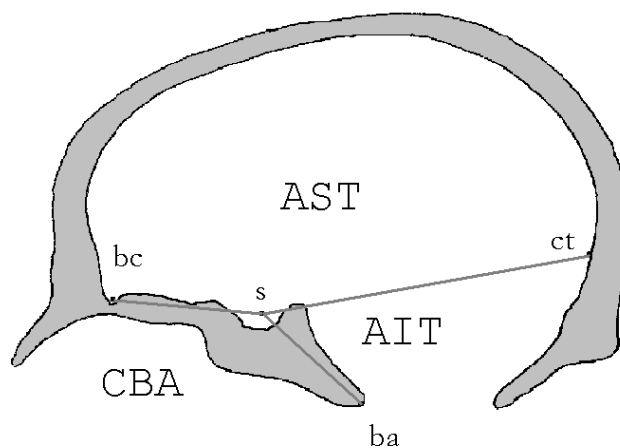


Fig. 8 – Aspectos ontogénicos da morfogénese craniana. AST-ângulo supratentorial, AIT-ângulo infratentorial, ACB-ângulo craniobasal, bc-buraco cego, s-sella, ba-basion, ct-união craniana de tenda do cerebelo.

Anatomicamente a Nasofaringe é, na generalidade dos mamíferos<sup>19</sup> e também no recém-nascido humano<sup>20</sup>, uma estrutura trapezoidal oca, grosseiramente tubular. Contudo no *homo-erectus* adulto foi alvo de torção, apresentando um ângulo diedro variável, em média de 128 graus. Tem cerca de 4-5,5 cm de diâmetro transversal, 2,5-3,5 cm de diâmetro antero-posterior e 4 cm de altura<sup>21</sup>. É relevante registar que a fusão da sincondrose esfenobasilar, responsável pelo crescimento pós-nasal da base do crânio<sup>22</sup>, ocorre entre os 12-14 anos no sexo feminino e entre os 13,5-15 anos no sexo masculino.

A sua parede anterior é aberta continuando-se com a «coana» e apresenta um complexo mecanismo esfíncteriano e valvular no seu limite inferior, que permite a comunicação com a orofaringe.

A parede superior continua-se harmonicamente pela posterior. Inicia-se na extremidade posterior livre do vomer, recobre a porção antero-inferior do corpo do esfenóide e porção basilar do occipital até ao tubérculo faríngeo, cobrindo a fascia faringo-basilar anteriormente ao arco anterior do atlas.

Nas paredes laterais abre-se a trompa auditiva ou tubo faringo-timpânico de Eustáquio, orifício fibro-cartilaginoso em forma de vírgula, atrás da qual se esconde o recesso faríngeo (fosseta de Rosenmuller). Este recesso ultrapassa

sa lateralmente o limite superior do músculo constritor superior da farínge, correspondendo à fosseta supra-subária<sup>23</sup> ou seio de Morgagni.

As paredes faríngeas são formadas por quatro camadas<sup>4,7</sup> a saber:

1. Membrana mucosa
2. Fascia faríngeo-basilar
3. Camada muscular
4. Fascia bucofaríngea

**1 – O revestimento mucoso** da nasofarínge é constituído basicamente por tecido cilíndrico pseudo-estratificado ciliado, excepto numa pequena área de transição para a orofarínge em que se transforma em epitélio cilíndrico estratificado. Sob este epitélio está a lâmina própria, uma camada de tecido conjuntivo elástico que substitui a *muscularis-mucosae* que se encontra ao longo do tubo digestivo. Possui células caliciformes e ductos que fazem comunicar as glândulas mucosas e serosas da zona mais profunda com a superfície.

Segundo Nielson<sup>24</sup>, os tecidos epiteliais da nasofarínge, como de resto de todo o aparelho respiratório apresentam na membrana plasmática proteínas de canais de água -aquoporinas – que permitiriam um movimento de água maior do que a sua camada lipídica dupla permitiria por difusão simples (Figura 9). O canal de água foi identificado pela primeira vez como uma nova proteína integrante da membrana por Denker et al<sup>25</sup> em 1988 na membrana dos eritrócitos humanos. Desde então foram descritos onze isómeros, cada um dos quais codificado por um gene diferente. A nasofarínge disporia de aquoporinas 1,3,4 e 5. As aquoporinas estão presentes nos tecidos onde ocorrem rápidos movimentos de água, como o epitélio secretor das glândulas salivares, rim, pâncreas, olho, cérebro, aparelho reprodutor masculino, músculo, tracto respiratório e digestivo estando directa ou indirectamente envolvidas em doenças como por exemplo o síndrome de Sjogren<sup>26</sup>.

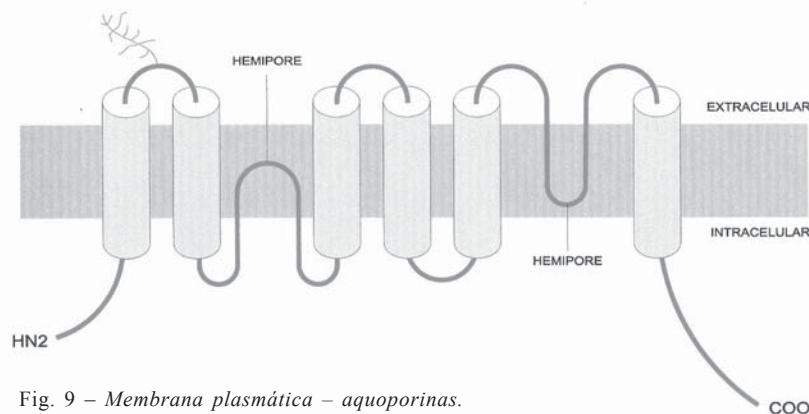


Fig. 9 – Membrana plasmática – aquoporinas.

O revestimento mucoso da nasofarínge dispõe ainda de abundante tecido linfoide nomeadamente na sua parede postero-superior. De facto, as paredes do tracto respiratório e digestivo contêm algum tecido linfoide não capsulado, mas é especialmente proeminente na nasofarínge, constituindo no seu conjunto o chamado anel de Waldeyer. Este tecido linfoide, situado na lâmina própria (embora se possa estender para a submucosa), é constituído por folículos arredondados com centros germinativos, e, entre estes, camadas de linfócitos parafoliculares, tudo suportado por uma fina malha de reticulina e fibroblastos. A rede vascular muito rica destes tecidos permite a livre circulação de linfócitos em ambos sentidos. Estudos de imunofluorescência demonstraram que os folículos apresentam linfócitos B e os tecidos parafoliculares linfócitos T, os primeiros destinados à síntese de anticorpos do tipo IgA e os segundos à mediação da imunidade celular.

De referir que estudos recentes<sup>27</sup> parecem indicar que a organogénese do tecido linfoide associado à nasofarínge é diferente da dos outros tecidos linfoides. O tecido linfoide da nasofarínge teria um papel muito relevante na indução de respostas imunes, incluindo a formação de linfócitos T1 e T2 HELPER e linfócitos B produtores de IgA, o que induzindo imunidade específica para determinado antígeno nos compartimentos imunes quer mucoso quer sistémico, justificaria a criação de vacinas nasais.

**2 – A fascia faríngeo-basilar** encontra-se entre a membrana mucosa e a camada muscular, substituindo a submucosa. Superiormente, onde não há fibras musculares, é muito espessa e está firmemente fixa à porção basilar do osso occipital e apex petroso do temporal, medialmente em relação ao canal carotídeo, fazendo a ponte entre o bordo superior do músculo constritor superior da farínge e a base do crânio, local onde se torna indissociável da membrana bucofaríngea. À medida que se caminha em sentido posterior a partir do tubérculo faríngeo torna-se mais resistente. dando origem ao rafe faríngeo mediano onde se vão inserir os músculos constritores. Lateralmente tem uma solução de continuidade para dar passagem à trompa auditiva (tubo faríngeo-timpânico) e continua-se em direcção à lâmina pterigoideia medial.

**3 – A camada muscular** que envolve a nasofarínge é composta principalmente pelo músculo constritor superior da farínge. Algumas das suas fibras inserem-se anteriormente na parte superior da

aponevrose palatina constituindo a crista de Passavant que corresponde funcionalmente ao esfíncter palatofaríngeo.

Na sua parede inferior, a nasofaringe dispõe ainda de um grupo de músculos com características específicas, actuando como uma unidade funcional. Este sistema, que quando aberto dá continuidade ao fluxo aéreo de e para a laringe, e quando fechado impede a regurgitação alimentar e permite o arejamento do ouvido médio e mastóide, é composto por cinco pares de músculos que constituem o palato mole. Têm ainda papel relevante na regulação do fluxo aéreo aquando da vocalização, sendo alvo de estudos também no sentido de melhor perceber o seu papel na apneia obstrutiva do sono.

Os músculos constituintes do palato mole – tensor do véu do palato, levantador do véu do palato, palatofaríngeo, músculo da úvula e palatoglosso – têm como características anatómicas comuns a de apenas apresentarem uma única inserção esquelética distal, sendo a outra extremidade uma inserção conjunta na forma de aponevrose no centro do palato mole (Figura 10).

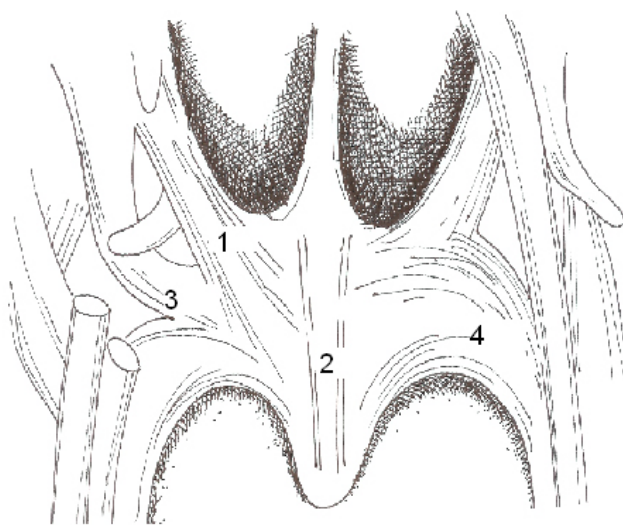


Fig. 10 – Músculos do palato. 1-levantador do palato, 2-úvula, 3-tensor do palato, 4-palatofaríngeo.

Stal<sup>28</sup> efectuou um estudo deste grupo muscular, colhendo biopsias em locais predeterminados de quatro destes músculos, que analisou sob diversos aspectos. Assim no que diz respeito à composição das fibras em ATPase miofibrilar, o palatofaríngeo e o músculo da úvula apresentavam clara predominância de fibras de tipo II numa percentagem só comparável no corpo humano à do músculo zigomático, própria para a execução de movimentos rápidos como baixar o palato e encurtar a faringe, ou ainda levantar rapidamente a úvula para controlar a rigidez do palato e prevenir a sua distorção. Os músculos tensor e levantador do palato apresentavam fibras de tipo I, mais

resistentes à fadiga, adequadas aos movimentos mais lentos de elevação e fortalecimento do palato.

A análise da composição em miosina da cadeia pesada demonstrou que as fibras tipo I apresentavam miosina lenta, enquanto as de tipo II tinham miosina rápida, confirmando a observação anterior.

No que diz respeito ao estudo da morfologia da fibra muscular, os músculos do palato apresentam fibras mais pequenas, menos poligonais e com mais tecido conjuntivo do que os músculos dos membros, mas semelhante aos músculos faciais. O facto de tanto a maior parte da musculatura facial como a do palato ter apenas uma inserção esquelética, e portanto menos carga, é uma explicação plausível e adequada às necessidades da função velofaríngea.

Em conclusão, os músculos do palato humano apresentam um conjunto de características que comparativamente os tornam mais parecidos com os músculos faciais do que com os dos membros, traduzindo diferenças tanto nos programas genéticos embriológicos e filogenéticos reguladores da miogénese, como nas exigências funcionais.

**4 – A fascia bucofaríngea** é uma camada fina e fibrosa que reveste externamente a musculatura faríngea e está ligada à fascia pre-vertebral.

Posteriormente em relação à fascia bucofaríngea, e entre esta e ao fascia pre-vertebral, situa-se o espaço virtual retrofaríngeo<sup>4</sup>, com tecido areolar e gânglios linfáticos da cadeia retrofaríngea. De forma semelhante, o espaço parafaríngeo encontra-se lateralmente à fascia bucofaríngea e anteriormente em relação à fascia pre-vertebral, medial ao lobo profundo da parótida e posterior ao músculo pterigoideu medial é cruzado pela apófise e músculos estilóides e contém mais inferiormente os gânglios cervicais profundos superiores.

Este espaço parafaríngeo<sup>7,22</sup> que se estende da base do crânio ao mediastino, comunica superiormente com as estruturas endocranianas através dos múltiplos orifícios que se abrem na base do crânio, dando na maioria, passagem a importantes estruturas anatómicas, nomeadamente: o buraco lacero, buraco oval (nervo mandibular), buraco espinhoso (artéria meníngea média e ramo meníngeo do nervo mandibular), canal carotídeo (artéria carótida interna), buraco jugular (veia jugular interna, nervos vago, glossofaríngeo e acessório) e canal do nervo hipoglosso.

A irrigação da nasofaringe<sup>4</sup> é efectuada principalmente à custa da artéria faríngea ascendente e também da artéria palatina descendente, ramo da artéria maxilar interna, que irriga o palato mole. A drenagem venosa está organizada em duas redes, o plexo submucoso e o perifaríngeo, que se continuam pelos vasos nasais.

O plexo faríngeo<sup>7</sup>, constituído maioritariamente por fibras dos nervos glossofaríngeo, vago fornece grande parte da inervação motora a esta estrutura, à excepção do músculo tensor do palato, efectuada pelo nervo mandibular. A inervação sensitiva da nasofarínge é predominantemente garantida pelo nervo maxilar. Do ponto de vista de componentes funcionais os nervos referidos contêm fibras eferentes viscerais especiais e aferentes somáticas, excepção feita para o glossofaríngeo que contém também fibras aferentes especiais.

As paredes da nasofarínge possuem como anteriormente se evidenciou, relações importantes com o sistema linfático tanto do ponto de vista anatómico como funcional. A drenagem linfática<sup>7</sup> é efectuada principalmente para os gânglios retrofaríngeos, mediano e laterais, que se situam entre as fascias faríngea e pré-vertebral. Os gânglios retrofaríngeos laterais estão localizados anteriormente à apófise lateral do atlas, ao longo do bordo lateral do músculo longo do pescoço. Daqui drenam indiferentemente para ambos lados do pescoço desaguando nos grupos ganglionar cervical profundo superior direito ou esquerdo e daqui ao tronco jugular directamente ou através da cadeia cervical profunda inferior. Estes grupos ganglionares encontram-se junto à veia jugular interna respectivamente no seu segmento superior e inferior. O grupo ganglionar cervical inferior apresenta também gânglios localizados no triângulo subclávio, onde se destaca o gânglio jugulo-omohióideo, que facilmente se detecta quando atingido por patologia neoplásica ou inflamatória, nomeadamente em lesões atingindo as áreas adjacentes à nasofarínge. As implicações desta drenagem linfática, sendo óbvias na patologia inflamatória e infecciosa, são extraordinariamente relevantes na forma de apresentação clínica e no prognóstico da patologia oncológica da área.

## CARCINOMA DE TIPO NASOFARÍNCEO – PERSPECTIVA CLÍNICA E MOLECULAR

De entre a patologia oncológica, o carcinoma de tipo nasofaríngeo (NPC) representa mais de 90% das neoplasias da nasofarínge<sup>29</sup>. Inicia-se ao nível da fossa de Rosenmuller, embora alguns autores afirmem ser a parede superior a localização inicial do tumor<sup>30</sup>. A partir daqui atinge a cavidade nasal em 15% dos casos, as paredes laterais ou superiores da orofarínge em 20%<sup>31</sup>. Há invasão do espaço parafaríngeo em 80% dos casos e corrosão óssea da base do crânio em 20%, enquanto a extensão intra-craniana propriamente dita ocorre em 10%. No que respeita a metastização linfática, ocorre em 90% dos casos, frequentemente de forma bilateral. A metastização hematogénea é mais rara, entre

5-10%. Se é verdade que o grau e tipo de invasão dependem das características de agressividade tumoral, não é menos verdadeiro que os aspectos embriológicos e anatómicos mencionados explicam também este tipo de disseminação.

A epidemiologia dos NPC sugere múltiplos determinantes, incluindo susceptibilidade genética, agentes dietéticos, inalantes e víricos. Ao contrário dos carcinomas espinocelulares da cabeça e pescoço e mesmo da variante bem diferenciada (I), nem os hábitos alcoólicos nem o consumo de tabaco parecem ter papel na oncogénese<sup>32</sup>.

Os determinantes genéticos potenciais do NPC são sugeridos pela muito elevada incidência da doença numa distribuição geográfica definida (sudoeste da China), em determinados grupos familiares e em indivíduos com perfis específicos de Complexos Major de Histocompatibilidade (HLA-BW46 ou antigénico de Singapura, HLA-B17, onde parece associado a estratos etários mais jovens, HLA-AW19)<sup>33</sup>. Outros determinantes genéticos têm sido descritos como importantes no desenvolvimento de diversas neoplasias<sup>34-51</sup> estando em investigação o seu papel no carcinoma da nasofarínge. Recentemente, resultados publicados numa população portuguesa demonstraram a influência de polimorfismos genéticos no genes TP53 e Cíclina D1 para o desenvolvimento do cancro da nasofarínge reforçando o papel do *background* genético de cada população e a necessidade de estudos regionais como fundamentação científica das diferenças epidemiológicas observadas na distribuição desta neoplasia em populações caucasianas e não caucasianas<sup>52,53</sup>.

Diversa documentação suporta a tese da importância dos factores dietéticos na génese do NPC. Ho, em 1971<sup>54</sup> sugeria que o hábito da ingestão de peixe conservado em sal, um alimento tradicional na China Meridional, poderia causar uma incidência excepcionalmente alta desta doença em Guangdong.

A relação NPC-EBV foi inicialmente baseada em estudos serológicos pela constatação da presença de títulos elevados de Anticorpos para o vírus nos soros destes doentes, assumindo particular significado o IgA anti-VCA e o IgG anti-EA<sup>55</sup>. Posteriormente estudos de hibridização *in-situ* demonstraram genoma do vírus no interior das próprias células tumorais do NPC<sup>56,57</sup>.

Primeiramente descrito por Epstein em 1964<sup>58</sup>, o EBV é um Gamma Herpes-vírus da família dos Linfocriptovirus, taxionomicamente denominado Vírus Herpes Humano 4, sendo este o seu hospedeiro natural exclusivo. Encontra-se distribuído mundialmente; a infecção primária é habitualmente adquirida na infância e 90% dos adultos são portadores, já que o vírus persiste de uma forma latente nos linfócitos B periféricos.

O EBV infecta as células que expressam o CD21 (receptor C3d), o que inclui linfócitos B e T bem como células epiteliais<sup>59</sup>, nomeadamente a nível da orofaringe. Nos linfócitos B a infecção é latente, o genoma do vírus toma a forma de um epissoma no núcleo celular, formando *in-vitro* uma linha celular de células linfoblastoides imortalizadas (LCL). Nestas LCL encontram-se múltiplas cópias epissómicas do genoma vírico, incluindo 11 produtos génicos codificados pelo EBV nomeadamente, proteínas nucleares (EBNA1, 2, 3A, 3B, 3C, LP), proteínas de membrana (LMP1, 2A e 2B) e RNA nuclear (EBER-1 e -2)<sup>60</sup>.

A expressão do estado de latência varia de acordo com o tipo de neoplasias relacionadas com o EVB<sup>61</sup>. Esta variação levou a uma classificação em três tipos fenotípicos, tendo todos em comum a expressão da EBNA1, que é a única a ser evidenciada no Linfoma de Burkitt (Latência tipo I)<sup>62</sup>. O Linfoma de Hodgkin e o NPC expressam a EBNA1, O LMP1, mas não a EBNA2 (Latência tipo II)<sup>63</sup> e as LCL das Doenças Linfoproliferativas associadas à imunossupressão e imunodeficiência apresentam-se fenotipicamente com EBNA1, LMP1 e EBNA2 (Latência tipo III)<sup>64</sup>.

No estado de latência, a proteína EBNA 1 permite a permanência do genoma do EBV como epissoma extracromossómico<sup>65</sup> interagindo com uma determinada região do cromossoma vírico (oriP), enquanto a EBNA2 é necessária para o processo de imortalização linfocitária<sup>66</sup>. É o polimorfismo genético do EBNA2 e também do EBNA 3, com diferenças na sequência de nucleotídeos, que permite a classificação do EBV em dois tipos: EBV1 (A) e EBV2 (B)<sup>67</sup>. Esta classificação teria nomeadamente implicações epidemiológicas, já que o EBV1 predominaria nas comunidades Europeia, Americana e Chinesa<sup>68</sup> enquanto o EBV2 se associa aos NPC das populações do Alasca.

No que diz respeito às restantes proteínas do genoma vírico anteriormente mencionadas, a LMP2A tem papel relevante na manutenção da infecção no estado latente<sup>69</sup> enquanto o LMP1 medeia as alterações fenotípicas dos linfócitos B associadas à infecção pelo vírus<sup>70</sup> e é o único produto génico com actividade transformadora provada também noutras células.

Está demonstrado que a expressão do LMP1 em células epiteliais inibe a diferenciação escamosa, diminui a expressão das citoqueratinas e conduz nomeadamente ao aumento das moléculas de adesão do tipo ICAM 1 e antigénio CD40<sup>71</sup>. Foi também sugerido que a função do LMP1 seria semelhante à do TNF, tendo-se demonstrado que os factores associados aos receptores do TNF (TRAF) se ligam à terminação citoplasmática carboxil do LMP1. As moléculas de LMP1 agregam-se na membrana citoplasmática e assim poderiam mimetizar um receptor TNF activo, induzindo uma

sinalização intracelular através do NFκB<sup>72</sup>.

A própria estrutura do LMP1 é susceptível de apresentar diversos polimorfismos, entre os quais os que parecem ter maior significado são a deleção de 30 pb (pares de base) perto da região terminal carboxil, associada a maior poder oncogénico *in-vitro*, e a mutação no codão 17 de que resulta perda da posição XhoI no primeiro exão, a que corresponde a zona terminal N. Esta alteração que não modifica a função da LMP1, corresponde à variante C do EBV por contraposição com a variante D que a não apresenta. Uma outra variante evidencia um segmento de restrição adicional na região Bam HI F.

Estas variantes têm ao que parece significado epidemiológico, tendo o EBV1 Cf maior prevalência na Ásia e o EBV1 DF nos Estados Unidos da América<sup>73</sup>. Na Europa do Norte, um estudo englobando 34 cidadãos, compreendendo 11 portadores são de EBV e 23 sem evidência de doença relacionada com EVB (submetidos a transplante alogénico de medula óssea), demonstrou uma prevalência alargada de variações de LMP1<sup>74</sup>.

Está assim equacionado o papel relevante do EBV na oncogénese do NPC, sendo escassos os estudos na população portuguesa sobre esta matéria<sup>75</sup>.

## CONCLUSÃO

O *conhecimento*, sendo a única forma disponível, embora imperfeita, de percepção da realidade está ainda assim sujeito a espartilhamento por disciplinas, o que sendo compreensível por razões que se prendem com *condicionamentos logísticos* da mente humana, pode obstar a uma leitura integrada, que seria a sua essência. Pretendeu-se contribuir modestamente para lembrar a necessidade de uma visão de conjunto no estudo das diversas ciências numa perspectiva de melhor explicar alguma da patologia nasofaríngea e nomeadamente do carcinoma indiferenciado, lançando a ponte para novos estudos e desafios.

## AGRADECIMENTOS

Os autores pretendem aqui demonstrar o seu profundo reconhecimento a Manuel Barbosa e Maria de Lourdes Pereira, pela revisão anatómica e biológica e a Mário Ramos pela concepção das figuras apresentadas.

### Conflito de interesses:

Os autores declaram não ter nenhum conflito de interesses relativamente ao presente artigo.

### Fontes de financiamento:

Não existiram fontes externas de financiamento para a realização deste artigo.

## BIBLIOGRAFIA

1. DAMÁSIO A: O Sentimento de Si, Publ Europa-America Lda 2000;365-6
2. FOERSTER H: Construyendo una realidad in La realidad inventada-Paul Watzlawick Gedisa eds 1998;38-54
3. POQUELIN JB (Molière): Le Bourgeois gentilhomme.1670
4. BEASLEY P: Anatomy of the pharynx and oesophagus – Scott-Brown's Otolaryngol fifth edition 1987;cap10;245-283
5. BELTRAMELLO A, PUPPINI G, EL-DALATI G, GIRELLI M: Fossa Navicularis Magna. Am J Neuroradiol 1998;19:1796-8
6. SADLER TW: Langman's Medical Embryology seventh edition 1995
7. Gray's Anatomy thirty-seventh edition, edited by WILLIAM PL, WARWIC R, DYSON M et al: 1993;pp161-8
8. ARCY LB: The craniopharyngeal canal rewied and re-interpreted. Anat res 1950;106:1-16
9. MARSOT-DUPOUCH K, SMOKER W, GRAUER W: A rare Expression of neural crest disorders: an intrasphenoidal development of the anterior pituitary gland. Am J Neuroradiol 2004;25:285-8
10. BARKOVICH AJ, CHUANG SH, NORMAN D: Mr of neuronal migration anomalies. Am J Neuroradiol 1987;8:1009-17
11. EKINCI G, KILIÇ T, BALTACIOGLU I et al: Transphenoidal (large craniopharyngeal) canal associated with a normally functioning pituitary gland and nasopharyngeal extention, hyperprlactinemia and hypothalamic hamartroma. Ajr 2003;180:76-7
12. ESTEBAN F,RUIZ-AVILA I, VILCHEZ R et al: Ectopic pituitary adenoma in the sphenoid causing Nelson's syndrome. J Laryngol Otol 1997;111:565-7
13. CANKAL F, UGUR H.C., TEKDEMIR I., ELHAN A et al: Fossa Navicularis: Anatomic Variation at the Skull Base. Clin Anat 2004;17:118-122
14. DIEWERT VM: A morphometric analysis of craniofacial growth and changes in spacial relations during secondary palatal development in human embryos and fetuses. Am J Anat 1983; 167(4):494-522
15. ANTUNES MT: Enciclopédia luso-brasileira de cultura, Verbo ed. 1976;18:pp 958/9
16. Gray's Anatomy 36ª edition, edited by Peter L Williams and Roger Warwick, 1980;pp126-7
17. BULL JW: Tentorium Cerebelli. Proc.Royal Soc Med 1969;62:1301-10
18. JEFFERY N: Differential regional brain grow and rotation of the prenatal human tentorium cerebelli. J Anat 2002;200:135-144
19. MASTERS AV, FALK D, GAGE TD: Effects of age and gender on the location and orientation of the foramen magnum in rhesus macaque (macaca mulatta), Am J Physical Antropol 2005;86(1):75-80
20. JEFFERY N: Cranial base angulation and growth of the human pharynx, The Anatomical Record part A Disc. Mov Cell Evol Biol 2005;284(1):491-9
21. ONDREY FG,WRIGHT SK: Ballenger's Otrhinolaryngology Head and Neck Surger y sixteenth ed 2003;chapter 60
22. NEMZEK WR, BRODIE HI, HECHT ST et al: MR, CT and Plain film Imaging of the Developing Skull Base in Fetal Specimens. Am J Neuroradiol 2000;21:1699-1706
23. ROUVIÈRE H, DELMAS A. Anatomie Humaine descriptive, topographique et fonctionelle, 1º edition Tome I 1967
24. NIELSEN S, KING LS, CHRISTENSEN MB et al: Aquaporin in complex tissues II. Subcellular distribution in respiratory and glandular tissues of rat. Am J Physiol Cell physiol 1997;273:C1549-61
25. DENKER BM, SMITH BL, KUHAJDA FP et al: Identification, purification and parcial characterization of a novel M 28000 integral membrane protein from erythrocytes and renal tubules. J Biol Chem 1988;271;25079-82
26. MATSUZAKI T, TAJIKA Y, TSERENTSODOL N et al: Aquoporins:a water channel family. Anat Scien Int 2002;77,85-93
27. KIVONO H, FUKUYAMA S: NALT- versus Peyer's-patch-mediated mucosal immunity. Nat Rev Immunol 2004;4(9):699-710
28. STAL PS, LINDMAN R: Charactersation of human soft palate muscles with respect to fibre types, myosin and capillary supply. J Anat 2000;197:275-290
29. BOURIHIS J, SCHWAAB G: Cancer du Nasophrynx (cavum). Enycl Méd Chir (Elsevier,Paris), Oto-rhino-laryngologie 1999;20-590-A-10
30. KUANG GQ, MOLG, YANG RN: Investigation of the site of origin to develop micro-focal nasopharyngeal carcinoma. Zhonghua Zhong liu Za Zhi 2005;27(8):505-6
31. SHAM JS, CHEUNG YK, CHOY D et al: Nasopharyngeal Carcinoma: CT evaluation of patterns of tumor spread. AJNR 1999;12:265-270
32. MENDENHALL WM: Nasopharynx. In Millio RR and Cassisi NJ eds. Management of Head and Neck Cancer, A Multidisciplinary Approach. Philadelphia: J. B. Lippincott Company (2º edition) 1994;599:626
33. CHAN SH, DAY NE, KUNARATNAM N et al: HLA and Nasopharyngeal Carcionoma in Chinese – a further study. Int J Cancer 1983;32;171-6
34. COELHO A, MATOS A, CATARINO R et al: Protective role of the polymorphism CCR2-64I in the progression from squamous intraepithelial lesions to invasive cervical carcinoma. Gynecol Oncol 2005;96(3):760-4
35. COSTA S, PINTO D, MORAIS A et al: Acetylation genotype and the genetic susceptibility to prostate cancer in a southern European population. Prostate 2005;64:246-252
36. FREITAS-SILVA M, PEREIRA D, COELHO C et al: Angiotensin I-converting enzyme gene insertion/deletion polymorphism and endometrial human cancer in normotensive and hypertensive women. Cancer Genet Cytogenet 2004;155(1):42-6
37. RIBEIRO R, LOPES C, MEDEIROS R: Leptin and prostate: implications for cancer prevention – overview of genetics and molecular interactions. Eur J Cancer Prev 2004;13(5):359-68. Review
38. MEDEIROS R, SOARES R, VASCONCELOS A et al: Glutathione S-transferase genotype GSTM1 as a predictor of elevated angiogenic phenotype in patients with early onset breast cancer. Angiogenesis 2004;7(1):53-8
39. PINTO D, VASCONCELOS A, COSTA S et al: HER2 polymorphism and breast cancer risk in Portugal.Eur J Cancer Prev 2004;13(3):177-181
40. CRAVEIRO R, COSTA S, PINTO D et al: Related Articles, Links TP73 alterations in cervical carcinoma. Cancer Genet Cytogenet 2004;150(2):116-121
41. RIBEIRO R, VASCONCELOS A, COSTA S et al: Overexpressing leptin genetic polymorphism (-2548 G/A) is associated with susceptibility to prostate cancer and risk of advanced disease. Prostate 2004;59(3):268-274
42. MEDEIROS R, VASCONCELOS A, COSTA S et al: Linkage of angiotensin I-converting enzyme gene insertion/deletion polymorphism to the progression of human prostate cancer. J Pathol 2004;202(3):330-5



43. MEDEIROS R, VASCONCELOS A, COSTA S et al: Metabolic susceptibility genes and prostate cancer risk in a southern European population: the role of glutathione S-transferases GSTM1, GSTM3, and GSTT1 genetic polymorphisms. *Prostate* 2004; 58(4):414-420
44. MEDEIROS R, PEREIRA D, AFONSO N et al: Platinum/paclitaxel-based chemotherapy in advanced ovarian carcinoma: glutathione S-transferase genetic polymorphisms as predictive biomarkers of disease outcome. *Int J Clin Oncol* 2003;8(3):156-161
45. FERREIRA PM, MEDEIROS R, VASCONCELOS A et al: Association between CYP2E1 polymorphisms and susceptibility to prostate cancer. *Eur J Cancer Prev* 2003;12(3):205-211
46. MEDEIROS R, VASCONCELOS A, COSTA S et al: Steroid hormone genotypes ARStuI and ER325 are linked to the progression of human prostate cancer. *Cancer Genet Cytogenet* 2003;141(2):91-6
47. COSTA S, MEDEIROS R, VASCONCELOS A et al: A slow acetylator genotype associated with an increased risk of advanced cervical cancer. *J Cancer Res Clin Oncol* 2002;128(12):678-82 Epub 2002 Nov 12
48. MEDEIROS R, MORAIS A, VASCONCELOS A et al: Endothelial nitric oxide synthase gene polymorphisms and the shedding of circulating tumour cells in the blood of prostate cancer patients. *Cancer Lett* 2003;189(1):85-90
49. MEDEIROS RM, MORAIS A, VASCONCELOS A et al: Outcome in prostate cancer: association with endothelial nitric oxide synthase Glu-Asp298 polymorphism at exon 7. *Clin Cancer Res* 2002;8(11):3433-7
50. MEDEIROS R, MORAIS A, VASCONCELOS A et al: Linkage between polymorphisms in the prostate specific antigen ARE1 gene region, prostate cancer risk, and circulating tumor cells. *Prostate*. 2002;53(1):88-94
51. MEDEIROS R, MORAIS A, VASCONCELOS A et al: Endothelial nitric oxide synthase gene polymorphisms and genetic susceptibility to prostate cancer. *Eur J Cancer Prev* 2002;11(4):343-50
52. CATARINO RJ, BREDA E, COELHO V et al: Association of the A870G cyclin D1 gene polymorphism with genetic susceptibility to nasopharyngeal carcinoma. *Head Neck* 2006;28(7):603-8
53. SOUSA H, SANTOS AM, CATARINO R et al: Linkage of TP53 codon 72 pro/pro genotype as predictive factor for nasopharyngeal carcinoma development. *Eur J Cancer Prev* 2006;15(4):362-6
54. HO JHC: Genetic and environmental factors in nasopharyngeal carcinoma (NPC). In W Nakahara, Nishioka, Hiayama, Y Ito Eds. *Recent Advances in Human Tumor Virology and Immunology*. Baltimore, University Park Press 1971;275-295
55. PEARSON G, WEILAND LH, NEEL B et al: Application of Epstein-Barr Serology to the Diagnosis of North American Nasopharyngeal Carcinoma. *Cancer* 1983;51:260-268
56. LUNG ML, CHAN KH, LAM WP et al: In-situ Detection of Epstein-Barr Virus Markers in Nasopharyngeal Carcinoma Patients. *Oncol* 1989;46:310-7
57. WEISS LM, MOVAHED LA, BUTLER AE 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):624-631
58. EPSTEIN MA, BARR YM: Virus particules in cultured lymphoblasts from Burkitt's Lymphoma. *Lancet* 1964;1:702-3
59. TANNER JE, WEI MX, ALFIERI C et al: Antibody and antibody-dependent Cellular Cytotoxic Responses against the BamHI A Rightward Open-reading Frame-1 Protein of EBV and EBV-Associated disorders. *J Infectious Dis* 1997;175:38-46
60. NIEDOBITEK G, AGATHANGGELOU A, NICHOLS JM: Epstein-Barr virus infection and the pathogenesis of the nasopharyngeal carcinoma: viral gene expression, tumor cell phenotype, and the role of the lymphoid stroma. *Sem Cancer Biol* 1996;7:165-174
61. KINGMA DW, WEISS WB, JAFFE ES et al: M-Epstein Virus Latent Membrane Protein-1 Oncogene Deletions: correlations with malignancy in Epstein-Barr virus-associated lymphoproliferative disorders and malignant lymphomas, *Blood* 1996;88:242-251
62. SCHAEFER B, WOISETSCHLAEGER M, STROMINGER J et al: Exclusive expression of Epstein-Barr virus nuclear antigen I in Burkitt lymphoma arise from a third promoter distinct from the promoters used in latently infected lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991;8:6550
63. FAHRAEUS R, FU H, ERNBERG I et al: Expression of Epstein-Barr virus-encoded protein in nasopharyngeal carcinoma. *Int J Cancer* 1988;42:329
64. HAMILTON-DUTOIT S, REA D, RAPHAEL M et al: Epstein-Barr virus-latent gene expression and tumor cell phenotype in acquired immunodeficiency syndrome phenotype with three distinct patterns of viral latency. *Am J Pathol* 1993;143:1072
65. YATES J: A cis-acting element from the Epstein-Barr virus genome that permits stable replication of recombinant plasmids in latently infected cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1984;81:3806-10
66. HAMMERSCHMIDT W, SUGDEN B: Genetic analysis of immortalizing functions of Epstein-Barr virus in human B lymphocytes. *Nature* 1989;340:393-7
67. KIEFF E: Epstein-Barr virus and its replication. Fields BN, Knipe DM, Howley PM, eds *Fields Virology*, Lippincott-Raven, Philadelphia 1996; 2343-96
68. ZIMMER U, ADLINDER HK, LENOIR GM et al: Geographical prevalence of two types of Epstein-Barr virus. *Virology* 1986;154:56-66
69. MILLER CL: Integral membrane protein 2 of Epstein-Barr virus regulates reactivation from latency through dominant negative effects on protein-tyrosine kinases. *Immunity* 1995;2:155-166
70. WANG D, LEIBOWITS D, WANG F et al: Epstein-Barr virus latent infection membrane protein alters the human B-lymphocytes phenotype: deletion of the aminin terminus abolishes activity. *J Virol* 1988;62:4173-84
71. DAWSON CW, RICKINSON AB, YOUNG LS: Epstein-Barr virus latent membrane protein inhibits human epithelial cell differentiation. *Nature* 1990;344:777-780
72. ROWE M, PENG-PILON M, HUEN DS et al: Upregulation of bcl-2 by the Epstein-Barr virus latent membrane protein LMP1: a B-cell specific response that is delayed relative to NF- $\kappa$ B activation and to induction of cell surface markers, *J Virol* 1994;8:122-131
73. SANDJEV K, GRATAMA JW, MUCH M, et al.: Sequence Analysis of Epstein-Barr Virus Latent Membrane Protein-1 Gene and Promoter Region: Identification of Four Variants among Wild-type EBV isolates. *Blood* 1997;90:323-330
74. MURONO S, YOSHIZAKI T, TANAKA S et al: Detection of Epstein-Barr Virus in Nasopharyngeal Carcinoma by in Situ Hybridization and Polymerase Chain Reaction; *Laryngoscope* 1977;107:523-6
75. BREDA E, QUEIRÓS A, MONIZ C et al: Detecção do Vírus Epstein-Barr (EBV) no Carcinoma Indiferenciado da Nasofaringe em Portugal – Zona Norte. *Rev Port* 2001;39(4):363-8



*Instituto Português de Oncologia Francisco Gentil, Porto*

# Caracterización de la evolución clínica del carcinoma de la nasofaringe en una población portuguesa

E. Breda<sup>a</sup>, R. Catarino<sup>b</sup>, I. Azevedo<sup>c</sup>, Tomé Fernandes<sup>d</sup>, C. Barreira da Costa<sup>a</sup> y Rui Medeiros<sup>b,e</sup>

<sup>a</sup>Departamento de Otorrinolaringología. Instituto Português de Oncologia. Porto. Portugal.

<sup>b</sup>Oncología/virología Molecular. Instituto Português de Oncologia. Porto. Portugal.

<sup>c</sup>Oncología Médica. Instituto Português de Oncologia. Porto. Portugal.

<sup>d</sup>Radioterapia. Instituto Português de Oncologia. Porto. Portugal.

<sup>e</sup>ICBAS. Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar. Porto. Portugal.

**Objetivo:** Caracterización de la evolución clínica del carcinoma de la nasofaringe en una población portuguesa en 31 años de seguimiento.

**Material y método:** 320 enfermos portadores de carcinoma epidermoide nasofaríngeo fueron seleccionados para este trabajo. Los siguientes parámetros fueron analizados: variante histológica, tasas de supervivencia después de diferentes modalidades de tratamiento y diferentes estadios (AJCC y UICC).

**Resultados:** La variante histológica más frecuente fue el carcinoma indiferenciado del tipo nasofaríngeo. La clasificación de la AJCC de 2001 se consideró la más adecuada para el pronóstico de los enfermos. Los enfermos tratados con quimioterapia adyuvante han obtenido mejores tasas de supervivencia, sobre todo los que recibieron tratamiento con cisplatino y 5-fluorouracilo (resultados similares a los obtenidos en otros trabajos).

**Conclusiones:** Aunque la quimioterapia adyuvante reduce la probabilidad de metástasis a distancia, continúa siendo la principal causa de muerte constatada en nuestro estudio. La tasa de metástasis a distancia sigue siendo el problema crucial, y disminuirla es una meta cada vez más próxima y un desafío para el futuro.

**Palabras clave:** Carcinoma de la nasofaringe. Variantes histológicas. Evolución clínica. Métodos de estadificación. Supervivencia. Tratamiento.

## Characterization of the Clinical Evolution of Nasopharyngeal Carcinoma in a Portuguese Population

**Objective:** Characterization of the clinical evolution of nasopharyngeal cancer (NPC) patients in a Portuguese population during 31 years of follow-up.

**Materials and methods:** Three hundred and twenty patients with epidermoid nasopharyngeal carcinoma were selected for this study. Histological subtypes were analyzed along with survival rates after different treatment schemes and according to AJCC and UICC staging classification systems.

**Results and conclusions:** The most frequent histological subtype was undifferentiated nasopharyngeal carcinoma. The AJCC-2001 staging classification was considered the most suitable system for survival prediction. Better survival rates were found in patients treated with adjuvant chemotherapy (cisplatin and 5-fluorouracil) and these findings were similar to other published results. Although adjuvant chemotherapy may reduce the likelihood of distant metastasis, the latter is still the main cause of death in our study. The distant metastasis rate remains the crucial problem and bringing it down is an ever closer goal and a challenge for the future.

**Key words:** Nasopharyngeal carcinoma. Histological subtypes. Clinical evolution. Staging systems. Survival. Treatment.

Este proyecto ha sido patrocinado por el Ministerio de la Salud de Portugal (CFICS: 261/1999).

Correspondencia: Dr. Rui Medeiros.  
Laboratórios. Unidade de Oncologia Molecular.  
Instituto Português de Oncologia.  
Dr. A. Bernardino Almeida, 4200-072 Porto. Portugal.  
Correo electrónico: ruimedei@ipporto.min-saude.pt

Recibido el 18-9-2006.

Aceptado para su publicación el 5-3-2007.

*"... el carpintero y el geómetra investigan de forma diferente el ángulo recto. Uno valora el aspecto útil para su trabajo y el otro, sin embargo, la esencia y la cualidad específica (del ángulo recto), porque está poseído por la mirada de la verdad."*

ARISTÓTELES. *Ética a Nicómaco*, 1089 a 29  
(traducción al portugués: Antonio Caeiro.)

## INTRODUCCIÓN

El carcinoma nasofaríngeo, entidad descrita por primera vez hace poco más de cien años<sup>1</sup>, es la neoplasia maligna más frecuente de esta estructura anatómica<sup>2,3</sup>. Aunque frecuente en el sudoeste asiático<sup>4</sup> (30-80/100.000 personas/año) el carcinoma de tipo nasofaríngeo es una afección relativamente rara en las poblaciones americana y europea (1/100.000 personas/año)<sup>5</sup>. Tiene como punto de partida el epitelio nasofaríngeo, y se ha descrito, de acuerdo con la Organización Mundial de la Salud (OMS) en 1978<sup>6</sup>, tres subtipos: tipo I, carcinoma de células escamosas queratinizante; tipo II, carcinoma de células escamosas no queratinizante, y tipo III, carcinoma indiferenciado.

Actualmente estas neoplasias son clasificadas en carcinomas de células escamosas y carcinomas no queratinizantes, que se subdividen en carcinomas diferenciados e indiferenciados<sup>7</sup>. El porqué de esta subclasificación es la asociación con el virus de Epstein-Barr (EBV)<sup>8-12</sup> de los carcinomas no queratinizantes, es decir, los tipos II y III de la OMS. Estos carcinomas, denominados carcinomas tipo nasofaríngeo (CTN), poseen características epidemiológicas y patológicas propias que los diferencian de la generalidad de los carcinomas epidermoides de las vías aerodigestivas.

En el Instituto Português de Oncologia do Porto (IPO CROP-SA), este tipo de carcinomas fueron estudiados prácticamente desde su fundación en 1974, hasta agosto de 2005. Así, en este trabajo se pretende proceder al análisis de los datos recogidos de forma sistemática durante estos años, con el objetivo de caracterizar la forma de presentación y la evolución clínica, analizando sus tasas de supervivencia considerando la clasificación y los diferentes tratamientos del carcinoma de la nasofaringe en una población portuguesa.

## MATERIAL Y MÉTODO

El estudio se inició en la fecha de finalización del primer tratamiento, en agosto de 1974, y terminó en agosto de 2005, concluyendo un tiempo total de seguimiento de 31 años.

Se analizó a 320 enfermos con carcinoma epidermoide nasofaríngeo. De éstos, fueron seleccionados los que presentaban la variante histológica de CTN y, de este subgrupo, los que en la clasificación no presentaban metástasis a la fecha de diagnóstico y además completaron el tratamiento propuesto. De los individuos finalmente seleccionados, se analizaron de manera prospectiva los siguientes parámetros: forma de presentación clínica, tiempo transcurrido desde el primer síntoma percibido por el enfermo hasta la realización del diagnóstico, distribución por sexos, edad a la fecha de diagnóstico y estadio según TNM. En este último caso se valoró la extensión local y cervical mediante estudios de imagen por tomografía computarizada (TC). Las metástasis a distancia fue inicialmente efectuado con cintilograma escintigrafía ósea de cuerpo entero, ecografía abdominal, radiografía de tórax, hemograma, velocidad de sedimentación y análisis de función hepática. Más recientemente se ha incorporado la TC torácica y abdomi-

nal en el estudio, en detrimento de la ecografía abdominal y la radiografía torácica.

Todos los pacientes tratados (213) realizaron tratamiento con radioterapia, efectuada al tumor primario en dosis media de 70 Gy, así como a las cadenas ganglionares cervicales y supraclaviculares, con 50 a 70 Gy según el grado de la afección. Con el tiempo las técnicas de tratamiento evolucionaron, pasando de máquinas de cobalto y aceleradores lineares de baja energía a aceleradores de alta energía. De la misma forma también evolucionó el método de evaluación por imagen y planeamiento radioterápico (planeamiento dosimétrico inicialmente bidimensional y posteriormente tridimensional conformacional).

Se aplicó quimioterapia adyuvante a 134 pacientes, con los siguientes protocolos:

- 37 pacientes: bleomicina 25 mg/m<sup>2</sup> iv; metotrexato 30 mg/m<sup>2</sup> iv, en ciclos semanales hasta un total de 5 ciclos, pasando después a metotrexato aislado hasta alcanzar dosis tóxica.
- 26 pacientes: doxirubicina 25 mg/m<sup>2</sup> iv; bleomicina 10 mg/m<sup>2</sup> iv; vimblastina 6 mg/m<sup>2</sup> iv; dacarbazina 375 mg/m<sup>2</sup> iv cada 15 días durante 3 meses.
- 71 pacientes: cisplatino (CDDP) 100 mg/m<sup>2</sup> iv día 1; 5-fluorouracilo 1.000 mg/m<sup>2</sup> iv, desde el primer día al quinto día en perfusión continua, 3 ciclos cada 21 días.

La cirugía de vaciamiento cervical fue efectuada siempre que se constató persistencia clínica de adenopatías al final del tratamiento con la radioterapia sola o en combinación con la quimioterapia.

El largo tiempo de seguimiento obligó a actualizaciones de los estadios, y fueron especialmente relevantes en la forma de clasificar las adenopatías cervicales. Cada proceso fue revaluado siempre que hubo alteraciones de clasificación, permitiendo la comparación entre las diferentes metodologías utilizadas para la determinación de los estadios.

Después de examinar los datos obtenidos en el momento de admisión de los pacientes, se realizó un seguimiento en función del tratamiento efectuado. Así anualmente todos los pacientes fueron estudiados con los mismos exámenes que se habían realizado "al ingreso". Finalmente, se llevó a cabo un análisis de las supervivencias totales, en relación con los estadios y el tipo de tratamiento, teniendo en cuenta, a su vez, el posible motivo de muerte.

Fue estudiada seguidamente la evolución de los pacientes en función del tratamiento realizado, y finalmente se efectuó el estudio de las supervivencias totales, por estadio y tipo de tratamiento. Además de la supervivencia, fue considerada también la causa de muerte. Se agrupó la etiología de la muerte en: de causa local, regional o a distancia.

## RESULTADOS

De los 320 enfermos con carcinoma epidermoide localizado en la nasofaringe, solamente 20 eran carcinomas de células escamosas (queratinizantes), y los restantes eran carcinomas no queratinizantes.

Se obtuvo que 300 enfermos tenían CTN, cuyos datos de presentación clínica fueron analizados. De éstos fueron seleccionados finalmente los enfermos que, habiendo sido posible la estadificación completa, no presentaban metástasis a distancia a la fecha del diagnóstico, y de entre éstos, los que completaron el tratamiento propuesto. De los 300 individuos con CTN analizados, 213 cumplían todos los requisitos: estadificación completa, no presentaban metástasis a distancia a la fecha del diagnóstico y habían completado el tratamiento.

### Presentación clínica

La edad a la fecha de diagnóstico varió entre 14 y 80 años, con mediana de 49 años, media de 48,2 y desviación estándar de 14,2; no se observó incidencia bimodal (fig. 1). En cuanto a la distribución por sexos (fig. 2), se verificó que 150/213 enfermos (67%) eran varones y 73/213 (33%), mujeres, lo que corresponde a una relación de 2:1. El intervalo entre el primer síntoma y el diagnóstico fue una media de 7 (1-48) meses. El análisis del síntoma o manifestación inicial (fig. 3) fue efectuado considerando 4 grupos. En el primero se reunieron los síntomas nasales de epistaxis, rinorrea y obstrucción nasal; en el segundo grupo el síntoma de presentación fue la tumefacción cervical por adenopatía; en el tercero se consideraron síntomas otológicos relacionados con disfunción de la trompa, como autofonía e hipoacusia, y en el cuarto, otros síntomas como dolor facial y diplopía.

La adenopatía fue la señal más frecuente, hallada en un total de 115 (51,4%) de los enfermos, seguida de los síntomas nasales y otológicos, en 54 (24,1%) y 52 (23,2%) enfermos, respectivamente. Apenas 3 (1,3%) enfermos hicieron referencia a otros síntomas o señales de presentación.

### Análisis de la supervivencia

El tiempo medio de supervivencia total a los 5 años de seguimiento fue de 46 meses (tasa de supervivencia estimada, 64,5%) y a los 10 años de seguimiento el tiempo medio de supervivencia fue de 82 meses (tasa de supervivencia estimada, 58,7%) (fig. 4).

El análisis de la supervivencia en función del sexo a los 10 años de seguimiento mostró que no había diferencias en la tasa de mortalidad entre los sexos ( $p = 0,253$ ).

La determinación de los estadios, como referimos anteriormente, fue posible en 213 enfermos y su distribución (tabla I), la siguiente: 4 (1,9%) enfermos con estadio I; 36 (16,9%) en estadio II; 79 (37,1%) en estadio III, y 94 (44,1%) en estadio IV. El número reducido de enfermos en estadios precoces, concretamente en estadio I, imposibilita un análisis estadísticamente concluyente. Así, se ha optado por considerar los estadios I y II conjuntamente en los análisis siguientes, teniendo en cuenta que el paso de estadio I a II se produce en función de la dimensión del tumor primitivo, que en cualquier caso no afecta a los límites óseos de la nasofaringe.

Las curvas de supervivencia a los 5 ( $p = 0,0002$ ; datos no consignados) y 10 años para los estadios I-II, III y IV son estadísticamente diferentes ( $p = 0,0002$ ) (fig. 5). El tiempo medio de supervivencia a los 10 años para el estadio I-II fue

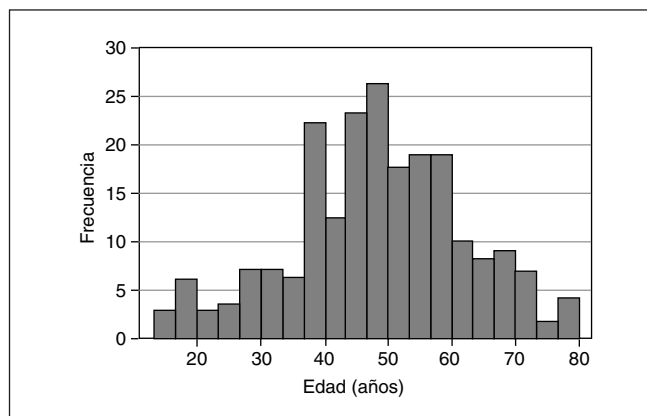


Figura 1. Gráfico de edades.

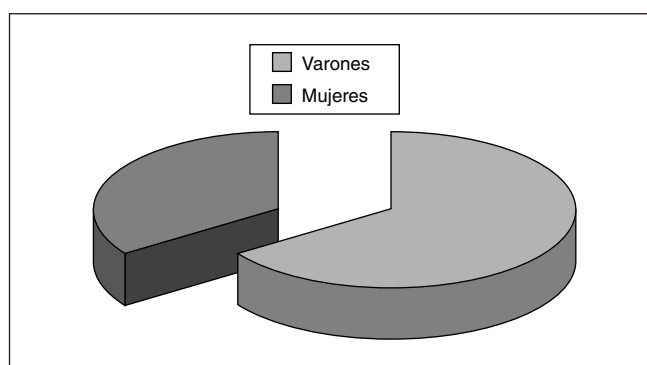


Figura 2. Distribución por sexos.

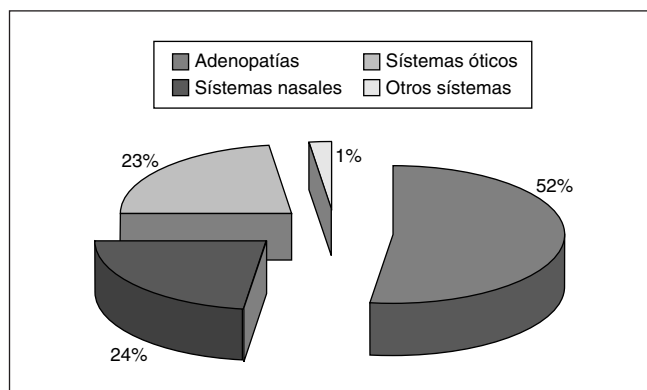


Figura 3. Síntoma o señal de presentación.

de 106,4 meses, y 84,8 y 67,2 meses para los estadios III y IV, respectivamente.

Nuestra base de datos se fue actualizando con el tiempo, considerando también las diferentes modalidades de estadificación que han sido aprobadas, lo que permite actualmente un análisis comparativo de importancia pronóstica de cada una de ellas, particularmente evidente a los 10 años de seguimiento ( $p = 0,001$ ;  $p = 0,004$ ;  $p = 0,0002$ ) (fig. 6).

Durante el seguimiento la modalidad de tratamiento también fue evolucionando.

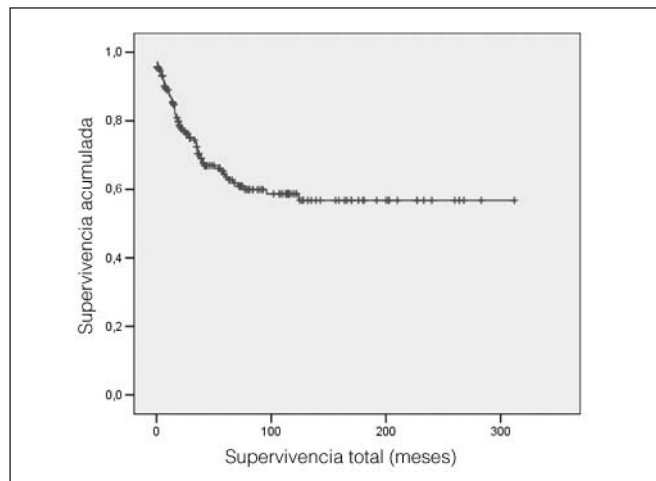


Figura 4. Supervivencia total.

Tabla I. Estadios de la AJCC de 2002

	I	II	III	IV
Enfermos, n (%)	4 (1,9)	36 (16,9)	79 (37,1)	94 (44,1)

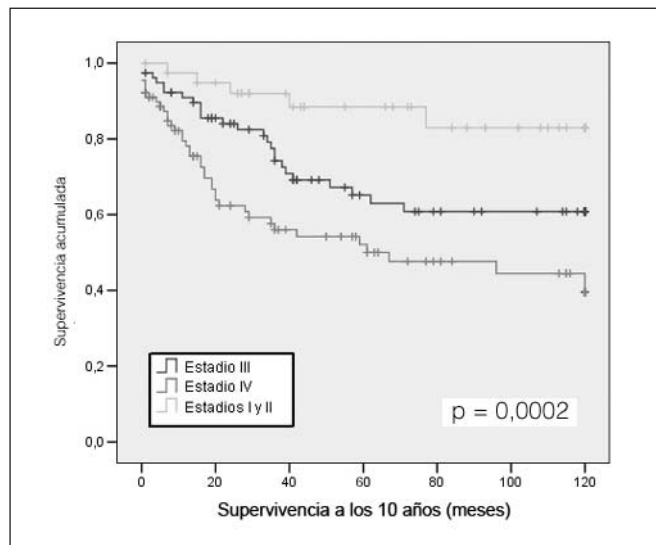


Figura 5. Supervivencia a 10 años según estadificación de la AJCC 2002.

En el análisis de las supervivencias en función del tratamiento se determinaron inicialmente dos grupos. Los individuos sometidos a radioterapia con o sin cirugía (79 enfermos) y los que se beneficiaron de tratamiento conjunto con quimioterapia, independientemente de su tipo (134 enfermos). A los 10 años el tiempo medio estimado de supervivencia fue de 65,4 meses para el primer grupo y de 89,8 meses para el segundo, diferencia que también fue estadísticamente significativa ( $p = 0,003$ ) (fig. 7).

De entre los enfermos que se beneficiaron del tratamiento con quimioterapia, 37 recibieron metrotexato y bleomicina, 26 ABVD y 71 CDDP y 5-fluouracilo. Las superviven-

cias estimadas a los 5 años fueron diferentes, dependiendo de la modalidad administrada ( $p = 0,002$ ; datos no publicados). Las diferencias fueron mayores al analizar las supervivencias estimadas a los 10 años, ( $p = 0,003$ ), 72,7 (53,8%) meses para los pacientes tratados con metrotexato y bleomicina, 83,9 (62,7%) para los tratados con ABVD y 108,3 (89,5%) para el último grupo (fig. 8). Las curvas de supervivencia total de los enfermos por décadas son estadísticamente diferentes ( $p \leq 0,001$ ) (fig. 9). El tiempo medio de supervivencia para la década 1974-1984 fue de 135,4 meses, 118,4 meses en 1984-1994 y de 140 meses en 1994-2004.

Se identificó la causa de la muerte por cáncer en 59 de los 69 enfermos del estudio, verificándose un fracaso local en 32,2% de los casos y en un 45,8% a distancia (tabla II).

Cuando analizamos la frecuencia de metástasis en función del tratamiento, se observó que ocurrieron en el 74,2% de los enfermos tratados con radioterapia y en el 25,8% de los que recibieron quimioterapia adyuvante con CDDP y 5-fluouracilo (tabla III).

## DISCUSIÓN

Teniendo en cuenta su duración (31 años) y el número de enfermos considerados (320), éste es el mayor estudio realizado en Portugal sobre el carcinoma nasofaríngeo. Aunque frecuente en el sudoeste asiático<sup>4</sup> (30-80/100.000 personas/año), el carcinoma de tipo nasofaríngeo es una enfermedad relativamente rara en las poblaciones americana y europea (1/100.000 personas/año)<sup>5</sup> y también en Portugal, según los datos recogidos del IARC (International Agency for Research on Cancer), Globocan online, donde se refiere una tasa de incidencia en el padrón del 0,9% en 2002<sup>18</sup>, por lo que ese período ha sido necesario para recoger un número representativo de enfermos y, simultáneamente, lograr un tiempo de seguimiento que permitiese aquilatar la evolución de la enfermedad con evaluación del patrón de recidiva local y regional, bien como metástasis a distancia precoz, bien como tardía, y así evaluar las complicaciones tardías del tratamiento.

Es interesante constatar que apenas 20 (6,25%) de los 320 enfermos con carcinoma de nasofaringe presentan la variante I de la OMS, es decir, carcinoma queratinizante, porcentaje mucho más próximo al presentado por las poblaciones del sudeste asiático (0,3%)<sup>19</sup> que al presentado por las poblaciones occidentales<sup>20</sup>. Hay que destacar que esta especificación de variedad de carcinoma difícilmente se encuentra en la mayoría de los registros poblacionales que provienen de los diferentes países de la Unión Europea consultados, ya que la frecuencia de carcinoma de nasofaringe se trata como un todo, sin mención de los subtipos. Así, un reducido porcentaje de carcinomas de tipo I de la OMS en nuestro estudio adquiere una mayor importancia.

Con respecto a la presentación clínica, se confirmó que la enfermedad se presenta en un intervalo de edad muy amplio, entre los 14 y los 80 años (media, 48,2 años), sin que por ello se observe una tendencia (fig. 1). Este hecho concuerda con los datos epidemiológicos consultados para la población europea, y al revés, no concuerda con lo que se

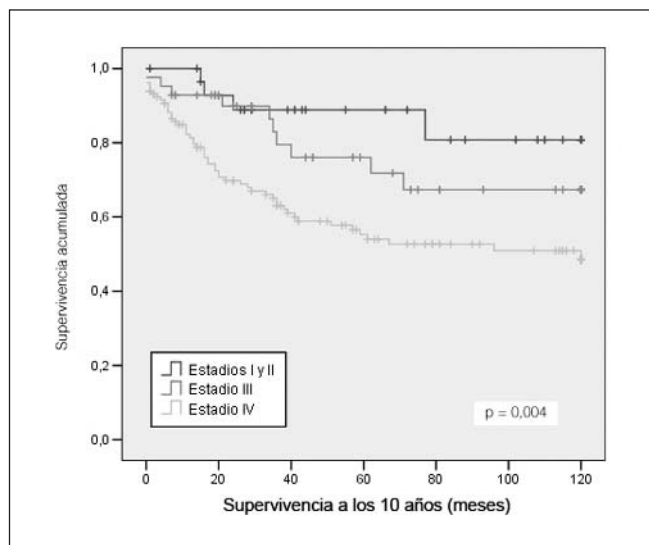
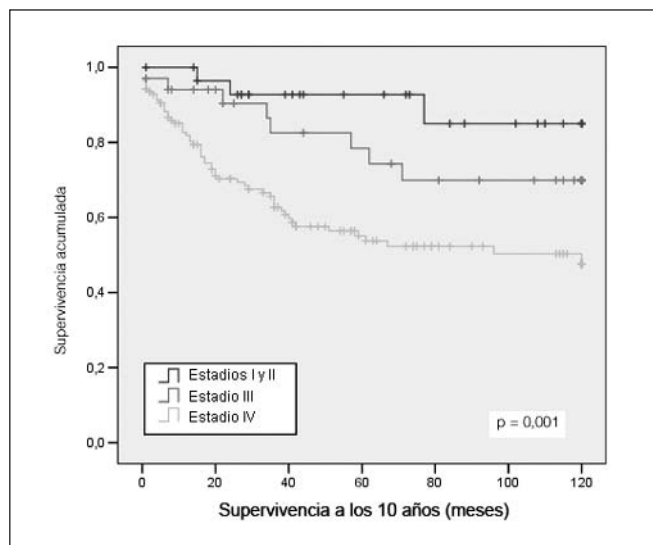


Figura 6. A: supervivencia a 10 años según estadificación de UICC/1978. B: supervivencia a 10 años según estadificación de la AJCC/1987.

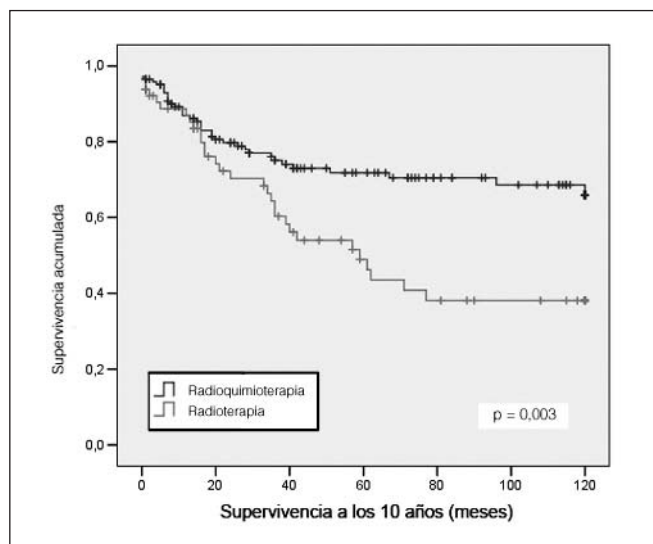


Figura 7. Supervivencia a 10 años. Radioterapia frente a radioquimioterapia.

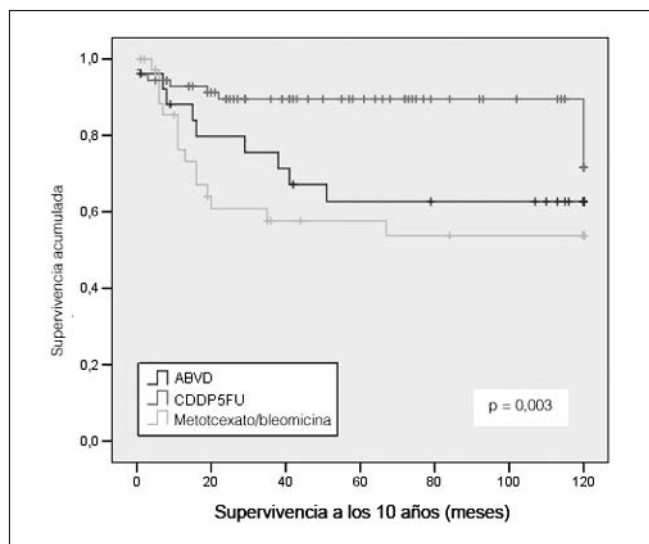


Figura 8. Supervivencia a 10 años con quimioterapia.

verifica en poblaciones del norte de África, donde se constata la existencia de 2 picos de incidencia, uno entre los 10 y los 20 años y otro a los 50,21. En cualquier caso, es una curva etaria relativamente joven en comparación con la de los carcinomas más frecuentes de la cabeza y cuello.

El análisis de la distribución considerando el sexo demostró una razón de 2 casos en varones por cada 1 que se determina en mujeres, puesto que el 67% de los enfermos eran varones y el 33%, mujeres. Las estadísticas consultadas para las poblaciones caucásica y oriental refieren una razón hombres:mujeres 3,5:121.

El cálculo del intervalo entre el primer síntoma y el diagnóstico vale, por una parte, para evaluar el grado de especificidad y gravedad de las quejas, teniendo en cuenta que quejas más intensas tienden a diagnósticos más precoces por la necesidad de cuidados médicos y que su especifici-

dad permitiría más fácilmente un diagnóstico correcto. Además, el cálculo de este intervalo nos permite evaluar, de una forma indirecta, la accesibilidad de los cuidados médicos especializados para la población en general. Éste es un dato no referido en las fuentes bibliográficas, y en nuestro trabajo se ha determinado una media de 7 meses, que no ha variado durante todo el estudio. La interpretación conjunta de este valor y el cuadro clínico de presentación más frecuente del carcinoma nasofaríngeo indica un grado relativamente bajo de especificidad sintomática.

El análisis estadístico de señales y síntomas de presentación aislada o en grupos se ha referido también escasamente. Los datos obtenidos en nuestro estudio indican que la adenopatía es el primer signo de enfermedad, el más frecuentemente referido (51,4%), seguido de los síntomas nasales de epistaxis, rinorrea y obstrucción nasal (24,1%) y

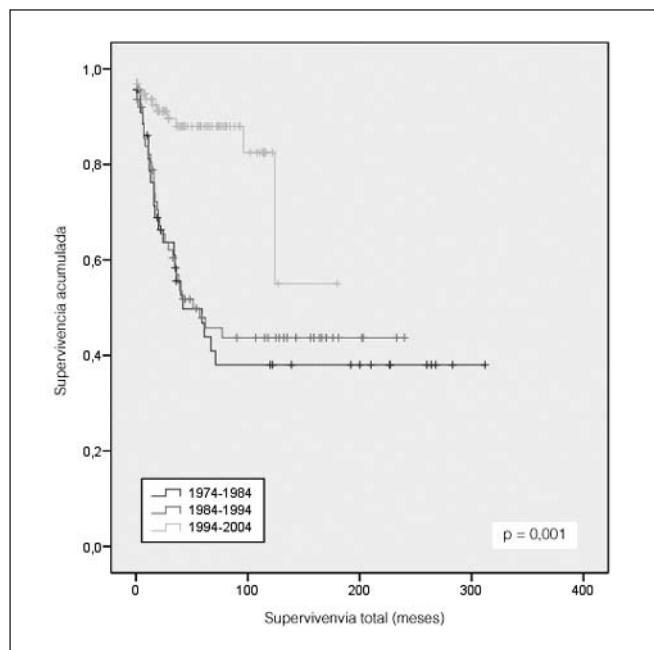


Figura 9. Supervivencia total por décadas.

Tabla II. Causa de muerte

	Local	Regional	Distancia	Combinado
Causa de muerte, n (%)	19 (32,2)	4 (6,8)	27 (45,8)	9 (15,2)

Tabla III. Metástasis respecto a tratamiento

	Radioterapia	Quimioterapia adyuvante
Metástasis, n (%)	23 (74,2)	8 (25,8)

síntomas otológicos de autofonía e hipoacusia (23,2%). Estos datos son indicativos de un cuadro clínico dominado por la metástasis regional, seguido de los síntomas derivados de la afección de las estructuras anatómicas vecinas, que podemos considerar consonantes con los referidos por Neel et al<sup>22</sup>. Los autores referían el cuadro clínico de presentación de la enfermedad sin preocuparse en referir la queja inicial: el 68% de los enfermos referían una tumefacción cervical; el 30%, disfunción nasal, y los restantes eran síntomas bastante menos frecuentes. Dickson<sup>23</sup> refiere tumefacción cervical en un 60-70% de los enfermos, un 32-46% con disfunción nasal y el 60% con hipoacusia.

Como se muestra en la figura 2, no se observaron diferencias estadísticamente significativas en las curvas de supervivencia a los 10 años en relación con el sexo del individuo. Esta constatación está de acuerdo con estudios recientemente publicados que indican que el sexo no es un factor preponderante de pronóstico<sup>4</sup>.

Los métodos de evaluación de la extensión local, regional y a distancia necesariamente fueron evolucionando con el tiempo considerablemente dilatado de este estudio. No cambiaron de forma significativa las personas afectadas en

el diagnóstico y el tratamiento, y se mantuvo un criterio de rigor en el análisis de los datos obtenidos. Se consiguió así un hilo conductor que homogenizó todo el proceso.

Nuestra base de datos se ha actualizado también durante el estudio, considerando las diferentes modalidades de clasificación de los estadios de la enfermedad que entretanto fueron aprobadas, lo que nos ha permitido realizar un análisis comparativo del valor pronóstico de cada una de ellas, particularmente evidente a los 10 años de seguimiento (figs. 3 y 4). Así, el presente estudio, por su longitud, permite un curioso y prudente análisis comparativo entre las clasificaciones de antaño más aceptadas por la comunidad científica: UICC-1979 ( $p = 0,001$ ), AJCC de 1987 ( $p = 0,004$ ) y AJCC de 2002 ( $p = 0,0002$ ). Cualquiera de ellas presenta diferencias estadísticamente significativas en la relación supervivencia-estadificación. Sin embargo, estas diferencias son más evidentes cuando se utiliza la clasificación de la AJCC 2002, y así se confirma la mayor relación entre esta clasificación y el pronóstico de los enfermos, como indican estudios anteriores<sup>24</sup>.

El abordaje terapéutico de este tipo de carcinomas ha variado en las últimas décadas. Inicialmente, estos enfermos apenas eran tratados con radioterapia externa, a la que se ha añadido quimioterapia adyuvante, neoadyuvante o concomitante en diversos esquemas de fármacos en ensayos constantes, con el objeto de optimizar el tratamiento<sup>13-17</sup>.

El análisis de los resultados demostró que los enfermos que efectuaron sólo radioterapia presentaron una tasa de supervivencia a los 3 años del 42,2%, lo que se encuentra en consonancia con el estudio efectuado por AOCOA<sup>18</sup>. Sin embargo, la tasa de supervivencia a los 3 años mejoró significativamente (69,1%) en los enfermos que efectuaron el tratamiento con quimioterapia adyuvante, independientemente de su esquema ( $p = 0,004$ ; resultados estimados y no publicados). Esta diferencia ha sido confirmada y aumentada al analizarse los resultados obtenidos tras mayor tiempo de seguimiento (fig. 6). Fue particularmente evidente en los enfermos que recibieron tratamientos de quimioterapia que incluyeron CDDP (fig. 6), con tasas de supervivencia del 85,9% a los 5 años y el 71,6% a los 10 años.

En el análisis de resultados de supervivencia, en este tipo de enfermedad, consideramos fundamental averiguar si el fallecimiento puede deberse a la extensión o la recidiva local, regional o a distancia, para así relacionar la causa de muerte con el tipo de tratamiento e identificar el lugar del presumible fallo terapéutico. Fue posible estudiar la causa de muerte en 59 de 69 enfermos muertos por cáncer. Consideramos este dato fundamental para una correcta evaluación de los objetivos terapéuticos, y sin embargo no está incluido en la mayoría de los estudios consultados. En el análisis de la causa de fallecimiento se demostró que la lesión a distancia es la principal causa de muerte, que ocurre en cerca de la mitad de los casos de forma aislada (45,8%) o asociada a falencia local o regional (52,6%) (tabla II).

Aunque la quimioterapia adyuvante reduzca la probabilidad de metástasis a distancia (tabla III), ésta sigue siendo la principal causa de muerte constatada en nuestro estudio,



lo que se corrobora en un estudio que simultáneamente indica que este problema no se ha resuelto con el uso de quimioterapia concomitante<sup>21</sup>. Esta terapéutica se viene utilizando en nuestra institución desde 2005, aunque no haya sido tratada en este estudio. La tasa de metástasis a distancia se mantiene así como un problema crucial y disminuir es una meta cada vez más próxima, pero un desafío para el futuro.

## BIBLIOGRAFÍA

- Jackson C. Primary carcinoma of the nasopharynx: a table of cases. *JAMA*. 1901;37:371-7.
- Chew CT. Nasopharynx (the postnasal space). En: Scott-Brown's Otolaryngology. 5ª ed. p. 314.
- Mendenhall WM. Nasopharynx. En: Millio RR, Cassisi NJ editores. Management of head and neck cancer, a multidisciplinary approach. 2.a ed. Philadelphia: JB Lippincott; 1994. p. 599-626.
- Ferlay J, et al (2001) GLOBOCAN 2000; Cancer Incidence, Mortality and Prevalence Worldwide. IARC Cancer Base n.º 5, IARC base Lyon.
- Parkin DM, Whelan SL, Ferlay J, Raymond L, Young J. Cancer incidence in Five Continents. Vol. 7. Lyon: IARC Scientific Publications; 1997.
- Vikram B. Carcinoma of the nasopharynx. *Clin Oncol*. 1986;5:475-83.
- Shanmugaratnam K, Sobin LH. Hystologic typing of tumors of upper respiratory tract and ear. In: Shanmugaratnam K, Sobin LH, editores. International histological classification of tumors. 2.a ed. Geneva: WHO; 1991. p. 32-3.
- Lo KW, To KF, Huang DP. Focus on nasopharyngeal carcinoma [revisión]. *Cancer Cell*. 2004;5:423-8.
- Busson P, Keryer C, Ooka T, Corbex M. EBV-associated nasopharyngeal carcinomas: from epidemiology to virus-targeting strategies [revisión]. *Trends Microbiol*. 2004;12:356-60.
- Niedobitek G. Epstein-Barr virus infection in the pathogenesis of nasopharyngeal carcinoma [revisión]. *Mol Pathol*. 2000;53:248-54.
- Niedobitek G. The Epstein-Barr virus: a group 1 carcinogen? [revisión]. *Virchows Arch*. 1999;435:79-86.
- Pagano JS. Epstein-Barr virus: the first human tumor virus and its role in cancer [revisión]. *Proc Assoc Am Physicians*. 1999;111:573-80.
- Langendijk JA, Leemans CR, Buter J, Berkhof J, Slotman BJ. The additional value of chemotherapy to radiotherapy in locally advanced nasopharyngeal carcinoma: a meta-analysis of the published literature. *J Clin Oncol*. 2004;22:4604-12.
- Rivera S, Keryer C, Busson P, Maingon P. [Nasopharyngeal carcinomas: from biology to clinic] [revisión]. *Cancer Radiother*. 2005;9:55-68.
- Palazzi M, Guzzo M, Tomatis S, Cerrotta A, Potepan P, Quattrone P, et al. Improved outcome of nasopharyngeal carcinoma treated with conventional radiotherapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 2004;60:1451-8.
- Ma BB, Chan AT. Recent perspectives in the role of chemotherapy in the management of advanced nasopharyngeal carcinoma [revisión]. *Cancer*. 2005;103:22-31.
- Chua DT, Ma J, Sham JS, Mai HQ, Choy DT, Hong MH, et al. Long-term survival after cisplatin-based induction chemotherapy and radiotherapy for nasopharyngeal carcinoma: a pooled data analysis of two phase III trials. *J Clin Oncol*. 2005;23:1118-24.
- Disponibile en: <http://www-dep.iarc.fr/globocan/database.htm>
- Lee AW, Poon YF, Foo W, Law SC, Cheung FK, Chan DK, et al. Retrospective analysis of 5037 patients with nasopharyngeal carcinoma treated during 1976-1985: overall survival and patterns of failure. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 1992;23:261-70.
- Spano JP, Busson P, Atlan D, Bourhis J, Pignon JP et al. Nasopharyngeal Carcinoma: an update. *Eur J Cancer*. 2003;39:2121-35.
- 9th International Nasopharynx Cancer Study Group (INCSG) Preliminary results of a randomized trial comparing neoadjuvant chemotherapy plus radiotherapy versus radiotherapy alone in stage IV (N2-N3, M0) undifferentiated nasopharyngeal carcinoma: a positive effect on progression-free survival. VUMCA I trial. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 1996;35:463-9.
- Neel HB, Taylor WF. Clinical presentation and diagnosis of nasopharyngeal carcinoma: current status. En: Prasad U, Ablashi DV, Levine PH, et al, editores. Nasopharyngeal carcinoma: current concepts. 1983. p. 10.
- Dickson RI. Nasopharyngeal carcinoma: an evaluation of 209 patients. *Laryngoscope*. 1981;91:333-53.
- Chua DT, Sham JS, Wei WI, Ho WK, Au GK. The predictive value of the 1997 American Joint Committee on cancer stage classification in determining failure patterns in nasopharyngeal carcinoma. *Cancer*. 2001;92:2845-55.

# Nasopharyngeal carcinoma in a south European population: epidemiological data and clinical aspects in Portugal

Breda Eduardo · Catarino Raquel · Medeiros Rui

Received: 2 November 2009 / Accepted: 15 April 2010  
© Springer-Verlag 2010

**Abstract** The incidence of nasopharyngeal carcinoma (NPC) varies worldwide, with higher rates in southern Asia, intermediate rates in Mediterranean basin countries as well as in Greenland and Alaska populations, and low rates in most of the western countries. The percentage of NPC types seems to vary according to the WHO classification. Portugal is also a Mediterranean basin country. The NPC patterns in Portuguese population is comparatively analyzed with a review of the related literature, concerning the overall incidence, male/female ratio, age of incidence, WHO type frequency, Epstein–Barr virus relationship and genetic susceptibility. The particular findings in the Portuguese population can be discussed in the light of genetic background and close relationships with potential exogenous oncogenic factors.

**Keywords** Nasopharyngeal carcinoma · Epstein–Barr virus · Epidemiological studies · Genetic polymorphisms

## Introduction

Nasopharyngeal carcinoma (NPC) is a patchy worldwide malignant disease, characterized by remarkable difference in incidences among populations of diverse geographic regions and races. It is very common in southern Asia (20–30/1,00,000 inhabitants/year) [1] and quite rare in western countries (<1/1,00,000) [2]. Intermediate incidence (8–12/1,00,000) occurs in certain African and Mediterranean populations [3], and also in the Inuits from Greenland and Alaska and Malays from Singapore and Malaysia.

Considering all tumors in this location, the probability of being originated in the epithelial lining of the nasopharynx varies from 75 to 95% in low-risk populations, and all of them are virtually cancers in high-risk populations [4].

The WHO classifies NPC into histologic types: keratinizing squamous carcinoma (type I); nonkeratinizing carcinoma, which is characterized as differentiated (type II) and undifferentiated (type III).

There is clinical, histopathologic and immunologic evidence that nasopharyngeal carcinomas constitute two distinct diseases: WHO type I NPC on one side and nonkeratinizing carcinomas (WHO type II and III) on the other [5], which are linked to previous infection by Epstein–Barr virus (EBV) [2]. Although the early events of EBV infection and the mechanisms of cellular transformation are not completely understood, it is now generally accepted that at least high-grade dysplastic lesions already carry EBV monoclonal viral genome. However, infection with EBV is a worldwide phenomenon and it is now clear that other endogenous and exogenous factors must be associated with NPC development.

It has been suggested that the individual genetic background may influence the onset of NPC. Familial clustering of the disease has been widely documented in the Chinese

---

B. Eduardo (✉)  
Otorhinolaryngology Department,  
Portuguese Institute of Oncology,  
R. Dr. Ant. Bernardino Almeida, Porto 4200-072, Portugal  
e-mail: erbreda@gmail.com

C. Raquel · M. Rui  
Molecular Oncology/Virology Unit,  
Portuguese Institute of Oncology, Porto, Portugal

C. Raquel  
ICBAS, Portuguese Institute of Biomedical  
Sciences Abel Salazar, Porto, Portugal

M. Rui  
Faculty of Health Sciences of Fernando Pessoa University,  
Porto, Portugal

population [6], and polymorphisms of nitrosamine metabolizing genes cytochrome P450 2A6 (CYP2A6) [7], P450 2E1 (CYP2E1) [8] and P450 2F1 (CYP2F1) [9], glutathione S-transferase M1 (GSTM1) [10], XRCC1 (codons 194 arg-trp) [11], p53 [12, 13] and cyclin D1 [14] have been suggested to influence the susceptibility to NPC.

Environmental and dietary exogenous factors have also been associated with NPC. One of the most important environmental factors identified is the consumption of salted dried fish [15], containing nitrosamine precursors and other EBV-activating substances [16, 17]. Occupational inhalation exposures, namely to wood dusts [18, 19], are also referred to be associated with increased risk of NPC, probably related to inhalation of chlorophenols used as softwood preservatives [20]. Hildesheim et al. [21], in a case-control study involving 375 cases of NPC and 375 controls, demonstrated a strong association between wood dust exposure and risk of NPC, which was stronger for individuals exposed before the age of 25 years and those positive for anti-EBV antibodies.

Portugal is a small country with an area of 92,391 km<sup>2</sup> and, according to the National Statistic Institute (INE), about 10 million registered inhabitants in the year 2005. It is located in southern Europe, as Spain, Italy and Greece, and is considered a Mediterranean basin country [22]. Its population, consisting of a great majority of Caucasians, is mainly composed of people of Iberian and Celtic descent, who lived in the Iberian Peninsula since the seventh century before Christ, as well as Visigoths (fourth century after Christ until the seventh) and a minority of Sephardic Jews [23] (first century before Christ until the fifteenth century). It is also linked with the populations of northern Africa, which is genetically confirmed [24, 25] and probably derived from its occupation of this territory in the seventh century after Christ that lasted for 500 years [26].

Little is known about nasopharyngeal cancer in non-endemic regions, as most studies are performed in high-incidence areas, specifically in southeast Asian countries. There is a need for a more extensive knowledge about the clinical features of this disease, the molecular events that occur during nasopharyngeal carcinogenesis and its possible correlation with environmental and host (genetic) factors influencing the disease.

## Objective

The main objectives of this review were to contribute to the better understanding of the epidemiologic and clinical characteristics of NPC in Portugal, and to compare the Portuguese findings with that found in similar populations of Mediterranean countries, Asia and the USA. We present the

results achieved in a Portuguese population and compare them with other Caucasian populations, studying the similarities, divergences and singularities.

## NPC in Portugal: materials and methods

In this review, we considered the data consulted in the Globocan 2002 [27]. An electronic search of the literature was performed to identify published studies concerning nasopharyngeal cancer. The MEDLINE database was searched (until December 2008) using combinations of the words: nasopharynx; nasopharyngeal cancer; Portugal; and Epstein-Barr virus. Comparative analysis was made between the Portuguese findings and the published studies concerning typical populations of Asia, USA and Mediterranean countries.

NPC age-adjusted incidence (world standard population) in Portugal is 0.9/1,00,000 inhabitants/year; in the year of 2002, 85 cases were registered in males and 34 cases in females, accounting for a ratio of 2.5/1 [28].

The analysis of NPC characteristics in Portugal is mostly based on the registrations of specialized cancer research and treatment hospital centers of Portugal, namely the Porto's Portuguese Oncology Institute (IPO), since August 1974 until August 2005 (31 years), accounting for 320 patients with NPC. These data were previously published by our group [29]. Similar results have been recently reported by another Portuguese group [30].

The country's global incidence of each WHO NPC type (I, II and III) is not nationally studied in Portugal, as in most countries. However, this series of 320 patients with NPC sequentially attained at the Porto's Portuguese Oncology Institute reveals that 300 patients (95.75%) presented with non-keratinizing or undifferentiated carcinomas (WHO subtype II and III) and only 20 had keratinizing carcinomas (I) [29] distributed as: 77.19% undifferentiated carcinoma, 18.56% non-keratinizing carcinoma and 4.25% keratinizing carcinoma. The male/female ratio was 2/1 and the mean age of patients at the time of diagnosis was 49 years, in a unimodal fashion showing a decreasing incidence after the 60th decade of life.

In this series, cervical lymphadenopathy was the most common presentation symptom present in 51.4% of cases, followed by nasal complaints in 24.1% (nasal obstruction and/or rhinorrhea, epistaxis) and aural symptoms of hearing loss or otalgia in 23.2% (Table 1). The mean interval from onset of symptoms until initial patient diagnosis of NPC was 7 months.

Staging of disease, according to AJCC 2002, was possible in 213 of 320 patients as follows: 4 (1.9%) patients with stage I; 36 (16.9%) with stage II; 79 (37.1%) with stage III; and 94 (44.1%) had stage IV carcinoma (Table 2).

**Table 1** First symptom or manifestation

Symptom	Adenopathy	Nose complaints	Ear complaints	Other
Patients: <i>N</i> (%)	115 (51.4)	54 (24.1)	52 (23.2)	3 (1.3)

**Table 2** AJCC staging (2002)

Stage	I	II	III	IV
Patients: <i>N</i> (%)	4 (1.9)	36 (16.9)	79 (37.1)	94 (44.1)

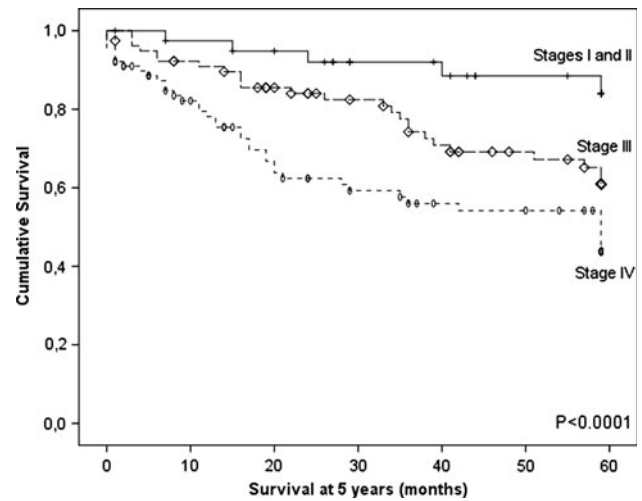
All the treated patients (213) underwent radiotherapy, performed on the primary tumor at a mean dose of 70 Gy, as well as on the neck and supraclavicular regions at doses between 50 and 70 Gy.

Adjuvant chemotherapy was administered to 134 patients with the following protocols:

- in 37 patients: bleomycin 25 mg/m<sup>2</sup> iv; methotrexate 30 mg/m<sup>2</sup> iv, in weekly cycles up to a total of five cycles, then switching to methotrexate alone until reaching a toxic dose;
- in 26 patients: doxorubicin 25 mg/m<sup>2</sup> iv; bleomycin 10 mg/m<sup>2</sup> iv; vinblastine 6 g/m<sup>2</sup> iv; dacarbazine 375 mg/m<sup>2</sup> iv every 15 days for 3 months;
- in 71 patients: cisplatin (CDDP) 100 mg/m<sup>2</sup> iv day 1; continuous perfusion of fluorouracil 1,000 mg/m<sup>2</sup> iv from the 1st to the 5th day, three cycles every 21 days;
- neck surgery was carried out in all cases in which clinical persistence of adenopathies was verified after completion of radiotherapy alone or in combination with chemotherapy.

The mean time of survival at 5 years for stage I–II was 55.7 months, and 48.1 and 39.1 months for stages III and IV, respectively. The survival curves at 5 years for stages I–II, III and IV are statistically different ( $P < 0.0001$ ; Fig. 1).

In the same population, another study was performed to find out the relationship between the EBV virus and the undifferentiated NPC [31] cases, using formalin-fixed paraffin-embedded tissues of NPC. The final results demonstrated that EBV-DNA was found in 84.2% of cases, thus confirming the association of EBV with the undifferentiated NPC in the northern Portuguese population. Furthermore, the genetic susceptibility to NPC was also studied within this population, and two major studies suggest that polymorphisms of cyclin D1 gene (*CCND1*) and *TP53* are associated with increased individual risk of NPC development. Regarding the key regulator of cell cycle cyclin D1, the study by Catarino et al. analyzed A870G *CCND1* polymorphism in 281 individuals, including 94 patients with NPC and 187 healthy individuals. Results demonstrate that

**Fig. 1** Survival analysis at 5 years according to the AJCC 2002 staging system

individuals carrying two G alleles had a 2.17-fold increased risk for the development of NPC, and the proportion of cases that were attributable to the GG *CCND1* genotype was 14.76% [14]. Moreover, a recently published study [32] indicates that cyclin D1 variants influence the age of onset of oncogenic virus-associated cancers, namely nasopharyngeal carcinoma. The results of this study demonstrate that the waiting time for onset of oncogenic virus-associated neoplasia in patients carrying the cyclin D1 variant was 12 years earlier in comparison with the other patients. Another study by Sousa et al. focus on the linkage of the polymorphic variants (Arg/Pro) on *TP53* codon 72 with nasopharyngeal cancer development, evaluated in a case-control study with 392 individuals from a northern Portuguese population. This study revealed a threefold risk for carriers of Pro/Pro genotype, suggesting that Pro/Pro genotype represents a stable risk factor for nasopharyngeal carcinoma [12].

## Discussion

The NPC-adjusted age incidence in Portugal according to world standard population is close to the other southern European countries, visibly less than in east Asian populations and undoubtedly less than in the northern African populations, but clearly more than USA incidence.

The male/female ratio obtained was similar to that classically referred to [33] and close to the recent numbers obtained in a review of 2,640 patients with NPC in the USA [34], as well as to another recent study referring to a southern Portuguese population [30]. However, near the Portuguese border, in Cantabria-Spain, a review of 84 patients during 20 years revealed a ratio of 4/1 [35].

The unimodal age-specific incidence rate of NPC in Portuguese population is similar to that of endemic countries [33] and close to Spanish [35–37] reports, but differs not only from that of northern Africa [38] and Middle East Mediterranean [39, 40] countries, which tend to demonstrate bimodal incidence, but also from most low-risk populations of western countries in which the incidence rises monotonically with age [41], as most of the other malignancies of head and neck. These findings were evident when comparing USA non-melanocytic individuals and Hong Kong inhabitants, showing similarity with this Asian region.

Portugal, similar to most cancer registries, only presents incidence data for nasopharyngeal cancer as a whole [41]. But this series of 320 patients with NPC sequentially attained at the Porto's Portuguese Oncology Institute reveals that 77.19% had undifferentiated carcinoma (WHO type III), 18.56% non-keratinizing carcinoma (WHO type II) and 4.25% keratinizing carcinoma (WHO type I).

These findings in Portugal seemed unexpected, because it is commonly established that the histological distribution varies along with incidence rates, with high-risk populations having a larger proportion of more poorly differentiated carcinomas [42]. Nevertheless, these results are confirmed by Amaro et al. [30]. Accordingly, type II and III comprise more than 95% of NPC in high-risk areas [43], while type I is predominant in low-incidence regions [44]. This is in accordance with its geographical distribution and incidence [45], with the probable exception of US-born non-Hispanic white populations, as published by Marks et al. [46] in 1998, reporting 75% of keratinizing carcinomas.

Furthermore, the WHO type II and III tumors occur at an earlier age, have longer disease-free periods and better survival after treatment, and more often show early and advanced neck metastasis. In addition, primary WHO type II and III tumors in the nasopharynx are more often small, submucosal and sometimes difficult to detect because of being clinically occult. These tumors seem to be more radiation sensitive than the WHO type I carcinomas, which are more likely to recur or persist in the nasopharynx after treatment. Owing to the lack of clear presenting symptoms or signs in the earliest stages of disease development, the diagnosis of NPC often occurs late in the course of the illness (72–81% of patients in stage III–IV), notwithstanding the nationality, race, gender or age, accounting for poorer survivals of about 60% [47].

These findings can explain the clinical patterns of the Portuguese population [29] in which the presenting complaints at the time of diagnosis are very similar to those described all over the world [35, 36, 40, 48–50].

Some authors claim clear evidences supporting that survival shows isolated dependency not only from staging and WHO classification, but also from Chinese ethnicity, with

better survival for early stages, WHO types II and III and Chinese ethnicity even with WHO type I [34]. After treatment, the 5-year global survival rate referred to in the Portuguese review was 64.5%, which seems to be better than that classically referred to in literature, but in agreement with recent studies [30, 51].

Unlike most other head and neck carcinomas, the major failure patterns of NPC are distant metastases and local recurrence, as emphasized by Chua et al. [52] in 2001 and which is analogous to the findings recently obtained in Portugal with 45.8% of deaths being attributable to distant metastases and 32.2% to local failure.

Known factors that predispose to NPC include genetic background, EBV exposure, persistent contact with formaldehyde and consumption of volatile nitrosamine-containing foods.

The relative percentage of more than 95% of II and III WHO NPC types in Portugal are comparable to those of countries where the incidence of NPC is higher (Asia, Singapore, Malaysia, Greenland), and diverse from that in Caucasian individuals of western countries [34, 46, 53]. The relationship between these histological types and EBV seems to be confirmed in Portugal [31]. Genetic variations associated with increased susceptibility to NPC in Asians [9–11, 13] are not completely studied in the Portuguese population. However, a strong association between GG *CCND1* genotype and Pro/Pro genotype on *TP53* codon 72 and NPC risk has been demonstrated. These similarities are even more interesting when we consider the historical links of the Portuguese with the NPC high-incidence regions of southern Asia for more than 500 years [54].

Several environmental and dietary exogenous factors have also been associated with NPC, namely the consumption of salted dried fish [15] containing nitrosamine precursors and other EBV-activating substances [16, 17], as well as other conserved foods such as the Tunisian harissa, qadid and toukha. Diets with low intake of fresh fruits and vegetables seem also to be associated with increased risk of NPC, notwithstanding the difficulty in disentangling these two sets of food, because high consumers of fruits and vegetables tend to be low consumers of conserved foods [41].

Portuguese food consumption is historically mainly based on Mediterranean diet, composed of generous amounts of fresh fruits, vegetables, grain, olive oil fats and fish on a regular basis, with small amounts of red meat. Nevertheless, some authors claim a recent change in dietary supplies in Portugal as in other Mediterranean basin countries [55, 56]. The Portuguese population also frequently consumes considerable amounts of salted dried codfish, with about 18% of NaCl and 50% of fish humidity, fished from the cold waters of the Arctic Ocean in the coast of Greenland and Norway [57]. Portugal imported 42,161 tones of salted codfish in 2006. Indeed, Portugal is the

foremost consumer of this kind of food all over the world, consuming 32 kg “per capita”/year [58]. Beyond that, Portuguese people also use in their common diet smoked ham and a great variety of sausages, frequently salted and conserved in an uncontrolled traditional way. In addition, the relative influence of industries using formaldehyde and other solvents with oncogenic potential is traditionally very important in Portugal. Until 1993, most of the productive capacity was traditionally related to the furniture and footwear industries, as well as textile and clothing, each accounting for about 6% of the national employment [59] and most of it in the northern regions.

## Conclusions

Portugal is an old southern European country, close to the Mediterranean basin, with a population of almost completely Caucasians, historically resulting from mixed northern Europe, Jews and Berber people, the latter with a higher incidence of NPC. Nevertheless, Portugal has an incidence of NPC similar to that of most western countries (0.9/1,00,000) and quite different from other countries of the region, such as southern Italy, Greece, Turkey and Israel [60, 61], as well as Tunisia (3–4/1,00,000) [38], Algeria and Morocco.

The relative percentage of more than 95% of II and III WHO NPC types in Portugal is comparable to those of countries where the incidence of NPC is higher (Asia, Singapore, Malaysia, Greenland), and diverse from that in Caucasian individuals of western countries [34, 46, 53]. The relationship between these histological types and EBV seems to be confirmed in Portugal, as well as some genetic variants contributing to the genetic profile for NPC development [9–11, 13].

To the best of our knowledge, the present report is the first comparative revision of NPC patterns in Portugal, with regard to the relationship between NPC and EBV, histological characterization, incidence, survival and other clinic behaviors, as well as some associated molecular genetic variants. The number of patients considered and the range of included matters may help to understand an overview of the common presentation of the disease in Portugal, thus confirming the relationship between EBV and NPC WHO types II and III in the Portuguese population. The study also presents the apparent idiosyncrasy of the combination of a high percentage of non-keratinizing or undifferentiated carcinomas when compared with other European countries, the low incidence when compared with other Mediterranean countries, and the particularity of unimodal pattern of age incidence declining after the 60th decade, as in endemic regions.

## References

- Vasef MA, Ferlito A, Weiss LM (1997) Nasopharyngeal carcinoma, with emphasis on its relationship to Epstein–Barr virus. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 106:348–356
- Liebowitz D (1994) Nasopharyngeal carcinoma: the Epstein–Barr virus association. *Semin Oncol* 21:376–381
- Cvitkovic E, Bachouchi M, Armand JP (1991) Nasopharyngeal carcinoma biology, natural history, and therapeutic implications. *Hematol Oncol Clin North Am* 5:821–838
- Parkin D, Whelan S, Ferlay J, Raymond L, Young J (1997) Cancer incidence in five continents. IARC Scientific Publications no 143 7
- Neel HB 3rd (1985) Nasopharyngeal carcinoma clinical presentation, diagnosis, treatment, and prognosis. *Otolaryngol Clin North Am* 18:479–490
- Zeng YX, Jia WH (2002) Familial nasopharyngeal carcinoma. *Semin Cancer Biol* 12:443–450
- Tiwawech D, Srivatanakul P, Karalak A, Ishida T (2006) Cytochrome P450 2A6 polymorphism in nasopharyngeal carcinoma. *Cancer Lett* 241:135–141
- Hildesheim A, Levine PH (1993) Etiology of nasopharyngeal carcinoma: a review. *Epidemiol Rev* 15:466–485
- Jiang JH, Li Z, Su G, Jia WH, Zhang RH, Yu XJ et al (2006) Study on genetic polymorphisms of CYP2F1 gene in Guangdong population of China. *Zhonghua Yi Xue Yi Chuan Xue Za Zhi* 23:383–387
- Nazar-Stewart V, Vaughan TL, Burt RD, Chen C, Berwick M, Swanson GM (1999) Glutathione S-transferase M1 and susceptibility to nasopharyngeal carcinoma. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 8:547–551
- Cao Y, Miao XP, Huang MY, Deng L, Hu LF, Ernberg I et al (2006) Polymorphisms of XRCC1 genes and risk of nasopharyngeal carcinoma in the Cantonese population. *BMC Cancer* 6:167
- Sousa H, Santos AM, Catarino R, Pinto D, Vasconcelos A, Lopes C et al (2006) Linkage of TP53 codon 72 pro/pro genotype as predictive factor for nasopharyngeal carcinoma development. *Eur J Cancer Prev* 15:362–366
- Tsai MH, Lin CD, Hsieh YY, Chang FC, Tsai FJ, Chen WC et al (2002) Prognostic significance of the proline form of p53 codon 72 polymorphism in nasopharyngeal carcinoma. *Laryngoscope* 112:116–119
- Catarino RJ, Breda E, Coelho V, Pinto D, Sousa H, Lopes C et al (2006) Association of the A870G cyclin D1 gene polymorphism with genetic susceptibility to nasopharyngeal carcinoma. *Head Neck* 28:603–608
- Yu MC, Ho JH, Lai SH, Henderson BE (1986) Cantonese-style salted fish as a cause of nasopharyngeal carcinoma: report of a case–control study in Hong Kong. *Cancer Res* 46:956–961
- Shao YM, Poirier S, Ohshima H, Malaveille C, Zeng Y, de The G et al (1988) Epstein–Barr virus activation in Raji cells by extracts of preserved food from high risk areas for nasopharyngeal carcinoma. *Carcinogenesis* 9:1455–1457
- Poirier S, Bouvier G, Malaveille C, Ohshima H, Shao YM, Hubert A et al (1989) Volatile nitrosamine levels and genotoxicity of food samples from high-risk areas for nasopharyngeal carcinoma before and after nitrosation. *Int J Cancer* 44:1088–1094
- Armstrong RW, Imrey PB, Lye MS, Armstrong MJ, Yu MC, Sani S (2000) Nasopharyngeal carcinoma in Malaysian Chinese: occupational exposures to particles, formaldehyde and heat. *Int J Epidemiol* 29:991–998
- Demers PA, Boffetta P, Kogevinas M, Blair A, Miller BA, Robinson CF et al (1995) Pooled reanalysis of cancer mortality among five cohorts of workers in wood-related industries. *Scand J Work Environ Health* 21:179–190

20. Mirabelli MC, Hoppin JA, Tolbert PE, Herrick RF, Gnepp DR, Brann EA (2000) Occupational exposure to chlorophenol and the risk of nasal and nasopharyngeal cancers among US men aged 30 to 60. *Am J Ind Med* 37:532–541
21. Hildesheim A, Dosemeci M, Chan CC, Chen CJ, Cheng YJ, Hsu MM et al (2001) Occupational exposure to wood, formaldehyde, and solvents and risk of nasopharyngeal carcinoma. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 10:1145–1153
22. (2007) [http://en.wikipedia.org/wiki/Mediterranean\\_Basin](http://en.wikipedia.org/wiki/Mediterranean_Basin). Mediterranean\_Basin.
23. Goncalves R, Freitas A, Branco M, Rosa A, Fernandes AT, Zhivotovsky LA et al (2005) Y-chromosome lineages from Portugal, Madeira and Acores record elements of Sephardim and Berber ancestry. *Ann Hum Genet* 69:443–454
24. Lucotte G, Gerard N, Mercier G (2001) North African genes in Iberia studied by Y-chromosome DNA haplotype 5. *Hum Biol* 73:763–769
25. Gerard N, Berriche S, Aouizerate A, Dieterlen F, Lucotte G (2006) North African Berber and Arab influences in the western Mediterranean revealed by Y-chromosome DNA haplotypes. *Hum Biol* 78:307–316
26. Ribeiro A, Saraiva J (2004) História de Portugal-a formação do território-da Lusitânia ao alargamento do País. QuidNovi
27. Parkin DM, Bray F, Ferlay J, Pisani P (2005) Global cancer statistics, 2002. *CA Cancer J Clin* 55:74–108
28. Parkin DM, Bray F, Ferlay J, Pisani P (2002) Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin* 55(2):74–108
29. Breda E, Catarino R, Azevedo I, Fernandes T, Barreira da Costa C, Medeiros R (2007) Characterization of the clinical evolution of nasopharyngeal carcinoma in a Portuguese population. *Acta Otorrinolaringol Esp* 58:191–197
30. d’Espiney Amaro C, Montalvaio P, Henriques P, Magalhaes M, Olias J (2009) Nasopharyngeal carcinoma: our experience. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 266:833–838
31. Breda E, Queirós A, Moniz C, Ferreira V, Palmeira C, Pinto D et al (2001) Detecção do vírus Epstein-Barr no carcinoma indiferenciado da nasofaringe em Portugal-zona norte. *Rev Port ORL* 39:363–368
32. Catarino R, Pereira D, Breda E, Coelho A, Matos A, Lopes C et al (2008) Oncogenic virus-associated neoplasia: a role for cyclin D1 genotypes influencing the age of onset of disease? *Biochem Biophys Res Commun* 370:118–122
33. Hirayama T (1978) Descriptive and analytical epidemiology of nasopharyngeal cancer. *IARC Sci Publ*, pp 167–189
34. Ou SH, Zell JA, Ziogas A, Anton-Culver H (2007) Epidemiology of nasopharyngeal carcinoma in the United States: improved survival of Chinese patients within the keratinizing squamous cell carcinoma histology. *Ann Oncol* 18:29–35
35. Morales-Angulo C, Megia Lopez R, Rubio Suarez A, Rivera Herrero F, Rama J (1999) Carcinoma of the nasopharynx in Cantabria. *Acta Otorrinolaringol Esp* 50:381–386
36. Esteller More E, Quer M, Fabra JM, Garcia P, Leon X, Viladot J et al (1990) Nasopharyngeal carcinoma. An epidemiological and clinical study. *An Otorrinolaringol Ibero Am* 17:473–494
37. Abad Iglesias R (1989) Descriptive study of cancer of the cavum, particularly epidermoid carcinoma (1). *Acta Otorrinolaringol Esp* 40:81–99
38. Boussen H, Bouaouina N, Mokni-Baizig N, Gamoudi A, Chouchane L, Benna F et al (2005) Nasopharyngeal carcinoma. Recent data. *Pathol Biol (Paris)* 53:45–51
39. Andejani AA, Kundapur V, Malaker K (2004) Age distribution of nasopharyngeal cancer in Saudi Arabia. *Saudi Med J* 25:1579–1582
40. Kamal MF, Samarrai SM (1999) Presentation and epidemiology of nasopharyngeal carcinoma in Jordan. *J Laryngol Otol* 113:422–426
41. Yu MC, Yuan JM (2002) Epidemiology of nasopharyngeal carcinoma. *Semin Cancer Biol* 12:421–429
42. Burt RD, Vaughan TL, McKnight B (1992) Descriptive epidemiology and survival analysis of nasopharyngeal carcinoma in the United States. *Int J Cancer* 52:549–556
43. Zong YS, Zhang RF, He SY, Qiu H (1983) Histopathologic types and incidence of malignant nasopharyngeal tumors in Zhongshan County. *Chin Med J (Engl)* 96:511–516
44. Vaughan TL, Shapiro JA, Burt RD, Swanson GM, Berwick M, Lynch CF et al (1996) Nasopharyngeal cancer in a low-risk population: defining risk factors by histological type. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 5:587–593
45. Wenig BM (1999) Nasopharyngeal carcinoma. *Ann Diagn Pathol* 3:374–385
46. Marks JE, Phillips JL, Menck HR (1998) The national cancer database report on the relationship of race and national origin to the histology of nasopharyngeal carcinoma. *Cancer* 83:582–588
47. Huang DPJP (2002) Introduction: nasopharyngeal cancer. *Semin Cancer Biol* 12:419
48. Geara FB, Nasr E, Tucker SL, Brihi E, Zaytoun G, Hadi U et al (2005) Nasopharyngeal cancer in the Middle East: experience of the American university of Beirut Medical Center. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 61:1408–1415
49. Van Hasselt CA, Skinner DW (1990) Nasopharyngeal carcinoma. An analysis of 100 Chinese patients. *S Afr J Surg* 28:92–94
50. Suzina SA, Hamzah M (2003) Clinical presentation of patients with nasopharyngeal carcinoma. *Med J Malays* 58:539–545
51. Baujat B, Audry H, Bourhis J, Chan AT, Onat H, Chua DT et al (2006) Chemotherapy in locally advanced nasopharyngeal carcinoma: an individual patient data meta-analysis of eight randomized trials and 1,753 patients. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 64:47–56
52. Chua DT, Sham JS, Wei WI, Ho WK, Au GK (2001) The predictive value of the 1997 American Joint Committee on Cancer stage classification in determining failure patterns in nasopharyngeal carcinoma. *Cancer* 92:2845–2855
53. Vokes EE, Liebowitz DN, Weichselbaum RR (1997) Nasopharyngeal carcinoma. *Lancet* 350:1087–1091
54. Coelho AB (ed) (1999) Tópicos para a história da civilização e das ideias no Gharb Al-Andalus. Instituto Camões, Lisboa
55. Garcia-Closas R, Berenguer A, Gonzalez CA (2006) Changes in food supply in Mediterranean countries from 1961 to 2001. *Public Health Nutr* 9:53–60
56. Guerra A, Feldl F, Koletzko B (2001) Fatty acid composition of plasma lipids in healthy Portuguese children: is the Mediterranean diet disappearing? *Ann Nutr Metab* 45:78–81
57. Dias J, Filipe J, Guia R, Menezes R, Guerreiro V (2001) Cod, the faithful friend: the Portuguese industry of codfish. *Econ Glob Gestão* 1:103–117
58. Dias J, Filipe JC, Guia R, Menezes R, Guerreiro V (2001) A Saga do “Fiel Amigo”: as Indústrias Portuguesas do Bacalhau. *Glob Econ Manag* 1:1–11
59. Costa E, Costa N (1996) Reflexos territoriais do processo da reestruturação industrial em Portugal Continental na década de oitenta. *Finisterra XXXI*:65–95
60. Fandi A, Altun M, Azli N, Armand JP, Cvitkovic E (1994) Nasopharyngeal cancer: epidemiology, staging, and treatment. *Semin Oncol* 21:382–397
61. Bar-Sela G, Kuten A, Minkov I, Gov-Ari E, Ben-Izhak O (2004) Prevalence and relevance of EBV latency in nasopharyngeal carcinoma in Israel. *J Clin Pathol* 57:290–293

## Epstein-barr virus detection in nasopharyngeal carcinoma - implications in a low-risk area

Eduardo Breda <sup>1</sup>, Raquel Jorge Ferreira Catarino <sup>2</sup>, Isabel Azevedo <sup>3</sup>, Marisa Lobão <sup>4</sup>, Eurico Monteiro <sup>5</sup>, Rui Medeiros <sup>6</sup>

### Keywords:

herpesvirus 4 human,  
epstein-barr virus  
infections,  
nasopharyngeal  
neoplasms.

### Abstract

Several studies have been published concerning Epstein-barr virus (EBV) infection and nasopharyngeal cancer (NPC) development. The incidences of histological types are different according to endemic or non-endemic regions. Latent EBV infection is found in almost all cases of NPC in endemic regions, but normally absent in type I carcinomas, more common in non-endemic regions.

**Aim:** The purpose of this hospital-based study was to analyze the presence of EBV in nasopharyngeal tumor tissues and in peripheral blood of nasopharyngeal cancer patients and healthy individuals, in a low risk, non-endemic area.

**Methods:** EBV detection in samples of nasopharyngeal cancer patients and healthy individuals.

**Results:** This study indicates that the frequency of EBV positive cases in peripheral blood is higher in advanced tumor stages.

**Conclusions:** The incidence rates of NPC have a distinct distribution. Since the prevalence of this disease is low in occidental countries, little is known about the biology of these tumors in non-endemic areas. We observed statistically significant differences in EBV detection between the NPC patient group and the control group. This study may help to understand the biological mechanisms of NPC and the correlation of EBV infection with this disease, in a low risk, non-endemic region.

<sup>1</sup> MD, ENT.

<sup>2</sup> MSc, Researcher, Microbiologist.

<sup>3</sup> MD, Oncologist.

<sup>4</sup> MD, Radiologist.

<sup>5</sup> MD, ENT.

<sup>6</sup> PhD, Researcher, Pharmacist.

Instituto Português de Oncologia Francisco Gentil do Porto, EPE.

Send correspondence to: Eduardo Breda - MD Instituto Português de Oncologia, Porto, Serviço de Otorrinolaringologia - R. Dr. Ant. Bernardino Almeida, 4200-072 Porto, Portugal.

Tel: 351-22 5084000 - E-mail: erbreda@gmail.com

Paper submitted to the BJORL-SGP (Publishing Management System – Brazilian Journal of Otorhinolaryngology) on March 25, 2009;  
and accepted on April 29, 2010, 2010. cod. 6324



---

## INTRODUCTION

---

The nasopharyngeal carcinoma (NPC) has different geographic and ethnic distribution when compared to other head and neck tumors. In 2000 there were 64,798 cases reported throughout the world and over 80% of these came from Asian countries, especially China and other southeastern Asian countries<sup>1</sup>. Globally speaking it is a rare disease, with an incidence below 1/100,000 in Caucasian individuals from North America and Western countries. The highest incidence is found in Southern China (25-30/100,000 individuals per year), especially in Canton.

NPC is a different type of head and neck cancer. The World Health Organization (WHO) considers three histological types of NPC based on differentiation grade. Type I concerns keratinizing epidermoid carcinomas; Type II are the non-keratinizing and Type III are the undifferentiated carcinomas, also called lymphoepitheliomas - characterized by a prominent lymphocytic infiltrate. This interaction between tumor cells and lymphocytes seems crucial for the continuous spread of the Type III<sup>2</sup> malignant carcinoma components. Of these, variants II and III are the most frequent and have common etiological characteristics, associated with the Epstein - Barr virus (EBV) infection. First described by Epstein and Barr in 1964<sup>3</sup>, the EBV is a Gamma Herpes virus of the lymphocryptovirus genus, taxonomically called Human Herpes Virus 4, and man is its natural and only host.

The primary infection is usually acquired during childhood and 95% of the adults have the virus in their latent form within the host's B cells. The virus is the agent responsible for infectious mononucleosis and its associations with the Burkitt Lymphoma and NPC are well known<sup>4</sup>. The endemicity rate for the Epstein-Barr virus varies according to the geographic region investigated, being very high in Northern Africa (Algeria and Tunisia) and China, and very low in Northern Europe (Denmark and Holland)<sup>5</sup>.

Nasopharyngeal tumors are made up of neoplastic cells derived from the non-keratinized epithelium with an inflammatory infiltrate in the stroma and have a bad prognosis among malignant head and neck tumors. Studies in the literature show that the EBV infection in nasopharyngeal epithelial cells happen before clonal expansion of the tumor cells population<sup>6</sup>. Studies in normal nasopharyngeal tissues and on biopsies of pre-malignant tissues show the presence of genetic alterations at an early stage of carcinogenesis, indicating that the stable infection of EBV epithelial cells requires a changed cell environment<sup>5</sup>.

Many studies have been published concerning the association between EBV infection and nasopharyngeal carcinogenesis development<sup>7</sup>. The prevalence of histology types are different comparing endemic and non-endemic

regions. In endemic areas, Type III represents over 97% of the cases, while the keratinizing type is more common in western countries (~75%)<sup>2</sup>. Beyond histological differences, the latent infection by the Epstein-Barr virus is present in almost all NPC cases in endemic regions, but it is usually not present in Type I carcinomas - more common in non-endemic regions<sup>8</sup>.

A hospital-based study previously published by our group showed that contrary to what has been published by other western countries, the prevalence of Types II and III in Northern Portugal was higher than in the other groups, with 93.75% of non-keratinizing carcinomas and only 6.25% of keratinizing carcinomas, in a total of 350 patients analyzed<sup>9</sup>.

The objective of the present study was to detect the Epstein-Barr virus in nasopharyngeal tumor tissue and peripheral blood from patients with nasopharyngeal carcinoma and healthy individuals coming from a non-endemic low-risk area.

---

## MATERIALS AND METHODS

---

### Patient selection

We reviewed the cases of nasopharyngeal carcinoma that came to the ENT Department of our Institute.

We studied 43 cases with fragments included in paraffin blocks, from which we found EBV in 19 cases of undifferentiated carcinoma of the nasopharynx (10 men and 9 women) (ages between 13 and 86 years). We also included in the study 17 nasopharyngeal tumor tissue biopsies and samples of the peripheral blood from 32 patients with undifferentiated carcinoma of the nasopharynx (ages between 20 and 71 years) and 45 samples from the blood donors without known oncologic disease with ages between 18 and 64 years).

### DNA extraction and purification

The viral DNA in the paraffin bloc samples was extracted by means of an enzymatic digestion using 200ml of digestion buffer (TrisHCL 10mM, KCl 50mM, MgCl2 2.5mM, 0.5% Tween 20). The tubes were incubated during the night at 37°C, and the lysis was interrupted by incubation at 95°C during 10 min. The DNA obtained was purified by the phenol-chloroform method and resuspended in 50ml of bi-distilled water. The samples were frozen at -20°C for later use.

In regards of the peripheral blood samples, we collected 5ml of peripheral blood from each patient into a tube with EDTA in order to isolate the plasma. The samples were centrifuged at 1600 x g and the plasma was carefully removed from the EDTA tubes and transferred to polypropylene tubes. They were stored at -20°C until

processed. The plasma DNA samples were extracted by means of the Qiagen Blood mini kit (Qiagen). The protocol utilized followed the steps recommended by the manufacturer. We used 200  $\mu$ L of plasma to extract the DNA through columns.

DNA extraction from nasopharyngeal biopsy samples was carried out from fresh tissue, using the QIAamp Tissue Kit (Qiagen), following the protocol recommended by the manufacturer.

EBV was analyzed in the tumoral tissue from samples in paraffin blocks. Viral DNA amplification was carried out through the PCR nested method using the following primers (DE 5' to 3'): E3-44mer: GCGGGTG-GAGGGAAAGG; E5-25mer: GTCAGCCAAGGGACGCG; E3-2PCR: GCCACCTGGCAGCCCTAAAG and E5-2PCR: AGGCTGCCACCCTGAGGAT. The E3-44mer and E5-25mer primers were utilized in the first PCR reaction, being followed by another PCR reaction with the E3-2PCR and E5-2PCR primers, and the final product weighed 184pb. The PCR reactions were used in a programmable thermocycler (Biometra), bringing to each PCR tube 2ml of DNA to the following mixture: buffer 1X, 1.5mM of MgCl<sub>2</sub>, 0.2mM of dNTPs, 0.5mM of each primer and 1U of Taq polymerase. The first PCR reaction conditions were as follows: initial denaturation at 94°C during 5min; 40 cycles of 30s at 94°C; 30s at 57°C and 1min at 72°C, and one step of final extension of 7min at 72°C. Two ml of the product from the first reaction were subjected to a second PCR. The second reaction parameters were identical to those of the first one, except for the annealing temperature, which went from 57°C to 50°C. We did an agarose gel electrophoresis at 3% (w/v) dyed in ethidium bromide and studied under ultraviolet light.

#### **EBV analysis in the tumoral tissue of biopsies and peripheral blood**

EBV detection in the fresh tissue and peripheral blood samples was carried out through the PCR technology in real time. The PCR primers were selected in a way as to pair them to the BALF5 region of the viral genome which codes the viral polymerase DNA. The forward and reverse primer sequences were, respectively: 5'- CGGAAGCCCTCTGGACTTC- 3' and 5'- CCCTGTTTATCCGATGGAATG - 3'. A fluorogenic probe was used (VIC5'- TGTACACGCACGAGAAATGCGCC - 3'TAMRA) with a sequence between the PCR primers, synthesized by PE Applied Biosystems (Foster city, Calif.). The PCR reaction was done using the PCR Taq-Man (PE Applied Biosystems) kit. In short: 2.5  $\mu$ L of DNA extraction solution from 200  $\mu$ L of plasma added to a PCR mixture with de plasma 10 mM of Tris (pH 8.3), 50 mM of KCl, 10 mM of EDTA, 5 mM of MgCl<sub>2</sub>, 100  $\mu$ M of dATP, dCTP, dGTP and dTTP, 0.2  $\mu$ M of each primer, 0.1  $\mu$ M of the probe

and 1.25 U of AmpliTaq Gold (PE Applied Biosystems). Amplification followed, starting with a 50°C cycle during 2min., AmpliTaq Gold activation during 10 min. at 95°C, 47 cycles of 15 sec. at 95°C and 1 minute at 62°C. The entire process was done by an ABIPRISM 7300 (PE Applied Biosystems) sequence detector.

#### **DNA Quality Control**

We did the PCR for the  $\beta$ -globin gene sequence aiming at confirming the presence of an amplifiable DNA. The target sequence was a 110pb segment and we used the following primers (from 5' to 3'): PCO3: ACACAAC-TGTGTTCACTAGC; PCO4: CAACTTCATCCACGTTTACC. The protocol included forty 20s cycles at 95°C, 45s at 55°C and 45s at 75°C.

#### **Statistical analysis**

The statistical analysis of the results was done using the SPSS (vs. 15.0) statistical software. Differences among mean values were calculated using the t-Student test. The Chi-Squared test was used to compare the frequencies of the categorical variables. A value of  $p < 0.05$  was considered statistically significant.

## **RESULTS**

The sample description in the group of cases with nasopharyngeal carcinoma (NPC) and in the control group is depicted on Table 1. In the group of cases with nasopharyngeal carcinoma we used the samples extracted from the nasopharyngeal tumoral tissue in paraffin blocks and the fresh tissue and peripheral blood of diseased individuals. In the control group, made up of individuals without known oncologic disease, we used samples from the peripheral blood. We studied a total of 68 individuals with NPC and 45 healthy controls. Among the cases, 19 samples came from tumoral tissue in paraffin blocks (mean age of 56.6 years, standard deviation of 11.4), 17 samples from fresh tissue (mean age of 51.8 years, 7.4 of standard deviation) and 32 samples from peripheral blood (mean age of 48.1 years, standard deviation of 11.3) from NPC patients. The mean age of control group individuals was 51.8 years (standard deviation of 7.4). The frequencies of males and females were: 73.5% and 26.5%, respectively in the group of individuals with NPC and 60.0% and 40.0%, respectively in the control group.

The frequency of positive EBV cases in the tumoral tissue samples in paraffin blocks was 84.2%. The results of EBV detection in the fresh tissue samples showed a 100% rate of positive cases, corroborating other studies published which show that all the nasopharyngeal tumor cells had viral DNA<sup>10, 11</sup>. In the cases of samples from the peripheral blood of NPC patients we found 53.1% of positive EBV cases. In the control group we did not find

**Table 1.** Sample description in the group of cases of nasopharyngeal carcinoma of the nasopharynx and in the control group.

	Patients with Nasopharyngeal Carcinoma			Control Group
	Type of sample			
	Paraffin blocs	Fresh tissue biopsy	Periphery blood	Peripheral blood
Number of cases		17	32	45
Mean age $\pm$ standard deviation	56.6 $\pm$ 11.4	51.8 $\pm$ 7.4	48.1 $\pm$ 11.3	51.8 $\pm$ 7.4
Gender				
Males	10 (52.6%)	13 (76.5 %)	27 (84.4%)	27 (60.0%)
Females	9 (27.4%)	4 (23.5 %)	5 (15.6%)	18 (40.0%)

**Table 2.** EBV detection result in the control group and in the group of patients with nasopharyngeal carcinoma according to the type of sample.

	EBV detection		p value*
	Positive (%)	Negative (%)	
Control group			
Peripheral blood (n=45)	0 (0.0)	45 (100.0)	-
Nasopharyngeal carcinoma cases			
Paraffin blocks (n=19)	16 (84.2)	3 (15.8)	<0.0001
Fresh tissue biopsy (n=17)	17 (100.0)	0 (0.0)	<0.0001
Peripheral blood (n=32)	17 (53.1)	15 (46.9)	<0.0001
Total (n=68)	50 (73.5)	18 (26.5)	<0.0001

\*Chi-squared test

**Table 3.** Comparison of the positive and negative EBV results frequencies concerning the gender of patients with nasopharyngeal carcinoma and control group.

	EBV Detection				p value*
	Males		Females		
	Positive (%)	Negative (%)	Positive (%)	Negative (%)	
Nasopharyngeal carcinoma cases					
Paraffin blocks (n=19)	9 (90.0)	1 (10.0)	7 (77.7)	2 (22.3)	0.466
Fresh tissue - biopsy (n=17)	13 (100.0)	0 (0.0)	4 (100.0)	0 (0.0)	-
Peripheral blood (n=32)	13 (48.1)	14 (51.9)	4 (80.0)	1 (20.0)	0.190
Total (n=68)	35 (70.0)	15 (30.0)	15 (83.3)	3 (16.7)	0.272
Control Group					
Peripheral blood (n=45)	0 (0.0)	27 (100.0)	0 (0.0)	18 (100.0)	-

\* Chi-square test

EBV DNA in the peripheral blood of healthy individuals (Table 2). We found statistically significant differences in the positive and negative EBV cases in the control group and in the group of patients with NPC ( $P < 0.001$ ) in all types of samples analyzed; Table 2).

Table 3 depicts the results from comparing the EBV positive and negative cases insofar as the gender of patients with NPC and controls were concerned. We did not

find statistically significant differences in the distribution of positive and negative EBV cases as to the gender of the groups analyzed. The analysis of EBV detection according to tumor stage (Table 4) indicates that the frequency of positive EBV cases is higher in more advanced tumors, despite the fact that such difference is in the very threshold of statistical significance ( $P = 0.069$ ).

**Table 4.** EBV detection analysis according to the NPC tumoral stage

Tumoral stage	EBV Detection		p value*
	EBV positive	EBV negative	
	N (%)	N (%)	
Stages I/II/III	6 (40.0)	9 (60.0)	0.069
Stage IV	9 (75.0)	3 (25.0)	

\* Chi-squared test

## DISCUSSION

The frequency of positive EBV cases in the tumor tissue samples in paraffin blocks was of 84.2%. Although the frequency of EBV positive cases is high, one could expect that all tissues would have EBV infected cells. This result is probably due to the DNA quality of the samples and efficacy of viral DNA extraction based on the samples of tumoral tissue fragments in paraffin blocks. Given the insufficient quality of the samples we used a nested PCR protocol, in an attempt to enhance the detection method sensitivity. In fact, the EBV detection results from the fresh tissue samples showed 100% of positive cases, corroborating other studies published which show that all the nasopharyngeal tumor cells had viral DNA<sup>10, 11</sup>. In the case of samples from the peripheral blood in patients with NPC we found 53.1% of positive EBV cases. In the control group we did not find EBV DNA in the peripheral blood of the healthy individuals.

These results indicate a higher frequency of positive EBV cases among patients with NPC and such difference was statistically significant, regardless of the type of sample analyzed ( $P < 0.001$  for the paraffin block samples, fresh tissue and peripheral blood).

Recent studies indicate that patients with nasopharyngeal carcinoma have EBV DNA circulating in their peripheral blood<sup>12-14</sup>. The EBV detection analysis matched tumor stage (Table 4), indicating that the frequency of EBV-positive cases is higher in more advanced stage tumors, although this difference is in the threshold of statistical significance ( $P = 0.069$ ). These results indicate that the most advanced tumors seem to release EBV DNA more easily or in greater quantity to the peripheral blood of diseased people.

EBV DNA was detected in all the samples from biopsies of nasopharyngeal fresh tumoral tissue, indicating that the PCR real-time protocol used is sensitive and indicated to detect EBV. The EBV detection analysis in the peripheral blood has been investigated in recent studies in order to assess the clinical implications of the EBV presence in the peripheral circulating blood from

patients with nasopharyngeal carcinoma. This study indicates that the frequency of EBV-positive cases detected in the peripheral blood is higher in advanced studies. These results can serve as basis for future studies designed to assess the test value as an additional tumoral marker for diagnostic purposes. On the other hand, with the support of quantitative tests aiming at quantifying the levels of EBV in the blood of NPC patients, we will be able to assess the virus levels value as a prognostic marker in these patients. These tests seem to have a high medical value given the sensitiveness of the method and the ease of sampling, in which the only thing that is needed is to collect peripheral blood, a non-invasive technique, with a potential for clinical applicability.

The rates of nasopharyngeal carcinoma have a distinct distribution in ethnical and geographic terms. Given its low incidence in western countries, very little is known about the biology of these tumors in non-endemic areas, knowing that most of the studies are based in high risk population, with their own characteristics, which may not necessarily be the same seen in other countries. The unequal prevalence of these tumors throughout the world suggests a complex etiology associated with genetic and environmental factors, and both risk factors seem to be different in their geographic distribution, both in terms of environmental distribution and genetic background. Prior studies indicate that EBV needs a changed genetic environment in order to promote cell proliferation<sup>7</sup>. The genetic profile can then alter the individual's susceptibility to cell immortalization by the virus, thus modulating the impact of the EBV effects on the carcinogenesis of these tumors.

## CONCLUSIONS

These results indicate that there are differences in the Epstein-Barr virus study in the group of patients with NPC and in the control group without tumor.

This study can help understand the biological mechanisms in the nasopharyngeal tumor and in the correlation of these tumors with the EBV infection in a non-endemic, low risk area.

## ACKNOWLEDGEMENT

This project was financed by the Ministry of Health of Portugal (CFICS - 261/1999).

## REFERENCES

1. Parkin D. Cancer Burden in the year 2000. The global Picture. *Eur J Cancer.* 2001;37:S4-S66.
2. Marks JE PJ, Menck HR. The National Cancer Data Base report on the relationship of race and national origin to the histology of nasopharyngeal carcinoma. *Cancer.* 1998;83:582-8.

- 
3. Epstein M, Barr Y. Virus particles in cultures lymphoblasts from Burkitt's lymphoma. *Lancet*. 1964;1:702-3.
  4. 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):307-22.
  5. Young LS RA. Epstein-Barr virus: 40 years on. *Nat Rev Cancer*. 2004;4:757-68.
  6. Raab-Traub N. Epstein-Barr virus and nasopharyngeal carcinoma. *Semin Cancer Biol*. 1992;3(5):297-307.
  7. Spano JP BP, Atlan D, Bourhis J, Pignon JP, Esteban C, Armand JP. Nasopharyngeal carcinomas: an update. *Eur J Cancer*. 2003;39:2121-35.
  8. Raab-Traub N. Epstein-Barr virus in the pathogenesis of NPC. *Semin Cancer Biol*. 2002;12(6):431-41.
  9. Breda E, Catarino R, Azevedo I, Fernandes T, Barreira da Costa C, Medeiros R. [Characterization of the clinical evolution of nasopharyngeal carcinoma in Portuguese population]. *Acta Otorrinolaringol Esp*. 2007;58(5):191-7.
  10. Thompson MP, Kurzrock R. Epstein-Barr virus and cancer. *Clin Cancer Res*. 2004;10(3):803-21.
  11. Vera-Sempere F, Burgos J, Botella MS, Morera C. Comparative analysis of Epstein-Barr virus (EBV) detection by nested-PCR and non-isotopic in situ hybridization in nasopharyngeal carcinoma (NPC). *Clin Chim Acta*. 1998;271(2):119-32.
  12. Leung SF, Zee B, Ma BB, Hui EP, Mo F, Lai M, et al. Plasma Epstein-Barr viral deoxyribonucleic acid quantitation complements tumor-node-metastasis staging prognostication in nasopharyngeal carcinoma. *J Clin Oncol*. 2006 1;24(34):5414-8.
  13. To EW, Chan KC, Leung SF, Chan LY, To KF, Chan AT, et al. Rapid clearance of plasma Epstein-Barr virus DNA after surgical treatment of nasopharyngeal carcinoma. *Clin Cancer Res*. 2003 15;9(9):3254-9.
  14. Chan KC, Lo YM. Circulating EBV DNA as a tumor marker for nasopharyngeal carcinoma. *Semin Cancer Biol*. 2002;12(6):489-96.



## Oncogenic virus-associated neoplasia: A role for cyclin D1 genotypes influencing the age of onset of disease?

R. Catarino<sup>a,b</sup>, D. Pereira<sup>c</sup>, E. Breda<sup>d</sup>, A. Coelho<sup>a</sup>, A. Matos<sup>a</sup>, C. Lopes<sup>a,b</sup>, R. Medeiros<sup>a,e,\*</sup>

<sup>a</sup> Molecular Oncology Group and Virology Laboratory, Portuguese Institute of Oncology, Porto, Portugal

<sup>b</sup> ICBAS, Abel Salazar Institute for the Biomedical Sciences, Porto, Portugal

<sup>c</sup> Medical Oncology Department, Portuguese Institute of Oncology, Porto, Portugal

<sup>d</sup> Otorrinolaryngology Department, Portuguese Institute of Oncology, Porto, Portugal

<sup>e</sup> Faculty of Health Sciences of Fernando Pessoa University, Porto, Portugal

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 2 March 2008

Available online 18 March 2008

#### Keywords:

Cyclin D1

Genetic polymorphism

Oncogenic virus-associated neoplasia

Age of onset

### ABSTRACT

Cyclin D1 (CCND1) is a key regulatory protein at the G1/S checkpoint of the cell cycle. The purpose of our study was to assess the role of CCND1 genotypes influencing the age of onset of oncogenic virus-associated neoplasia. We conducted a hospital-based case-control study of 581 individuals, including 247 controls and 334 cases (108 nasopharyngeal and 226 cervical cancer cases). The polymorphism analysis was performed in blood samples by PCR-RFLP methodology. Age-adjusted logistic regression analysis indicates that individuals carrying two G-alleles have an increased genetic susceptibility for the development of oncogenic virus-associated cancers (aOR = 2.02, 95% CI 1.30–3.14,  $P = 0.002$ ). Moreover, our results indicate that the waiting time for onset of oncogenic virus-associated neoplasia in patients homozygous (GG) for CCND1 genotypes (52 years) was 12 years earlier in comparison with patients carrying AG or AA genotypes (60 years) (log-rank test:  $P = 0.0003$ ). Our results may be important in contributing to a more extensive knowledge of the mechanisms involved in oncogenic virus-associated carcinogenesis, as CCND1 may be an important target for the development of new strategies for cancer treatment and prevention.

© 2008 Elsevier Inc. All rights reserved.

Oncogenic viruses are currently considered the second most important cause of cancer in humans and contribute to 15–20% of all cancers in the world, some of them being very common, like cervical carcinomas. Human recognized cancer viruses include Human Papillomavirus (HPV) and Epstein–Barr virus (EBV) and although each virus has unique features, it is becoming clearer that all these oncogenic agents target multiple cellular pathways to support malignant transformation and tumor development [1].

Oncogenes encoded by tumor viruses play integral roles in the viral conquest of the host cell by subverting crucial and relatively no-redundant regulatory circuits that regulate cellular proliferation, differentiation, apoptosis, and life span. Some viral oncoproteins subvert cellular safeguard mechanisms intended to eliminate cells that have acquired abnormalities that interfere with normal cell division. Viruses that encode such activities can contribute to initiation as well as progression of human cancers [2].

HPV and EBV are common infectious agents that persist after primary infection in a latent state with occasional shedding of

virus. Therefore, one of the fundamental questions in the etiology of cervical cancer (associated with high risk HPV infection) and nasopharyngeal cancer (associated with EBV infection) that are linked to infection with such ubiquitous viruses is why cancer develops in a few people when many are infected. These tumors share a DNA viral etiology and present similar histopathological findings. Moreover, there are several similar aspects of infection with HPV and EBV [3].

Although it is well known that HPV and EBV are directly involved in cervical and nasopharyngeal cancer development, respectively, some researchers acknowledge that viral infection is a necessary but not sufficient factor for cancer development. The progression from infection to cancer involves other environmental and host factors. Single-nucleotide polymorphism (SNP) markers should be considered in the determination of the combinations of genetic factors involved in precancerous changes to cancer development [4–8].

A frequent target in carcinogenesis is the deregulation of G1–S phase progression of the cell cycle. The transition through G1 to S phase is regulated by cyclins, cyclin-dependent kinases and their inhibitors [9]. Cyclin D1 (CCND1) is a key regulatory protein at the G1/S checkpoint of the cell cycle. It forms complexes with CDK4 or CDK6, and is responsible for the phosphorylation of the

\* Corresponding author. Address: Instituto Português de Oncologia, Porto, Laboratórios—Piso 4, Unit of Molecular Oncology, R. Dr. Ant. Bernardino Almeida, 4200-072 Porto, Portugal.

E-mail address: [ruimeidei@ipoporto.min-saude.pt](mailto:ruimeidei@ipoporto.min-saude.pt) (R. Medeiros).

retinoblastoma tumor suppressor protein, resulting in the release of E2F transcription factors that allow cells to enter into S-phase [10–12]. The G1/S checkpoint is frequently altered in many epithelial tumors and may confer growth advantage and enhance tumorigenesis [13]. Amplification of *CCND1* and altered expression of the protein have been reported in a variety of tumors [12,14].

It has been reported that *CCND1* mRNA is alternatively spliced to produce two transcripts (*a* and *b*), which are present simultaneously in a variety of normal tissues and cancer cells [15]. Betticher and colleagues [15] identified a single base pair polymorphism (A870G) in *CCND1*, and *CCND1* genotypes have been significantly associated with carcinogenesis and clinical outcome in a variety of cancers [16].

The purpose of our study was to assess the role of *CCND1* genotypes influencing the age of onset of oncogenic virus-associated neoplasia.

#### Patients and methods

We conducted a hospital-based case-control study of 581 individuals, including 247 controls and 334 cases (108 nasopharyngeal and 226 cervical cases) diagnosed at the Portuguese Oncology Institute-Porto, Portugal, during the period from 2000 to 2004. The median age at diagnosis of nasopharyngeal cancer patients was 49.0 years (mean age 47.5; standard deviation 14.5). Considering the cervical cases, the median age at diagnosis was 47.0 years (mean age 47.2; standard deviation 12.3). The control group consisted of 247 healthy individuals, with a median age of 55.5 years (mean age 51.1; standard deviation 16.8), without clinical history of cancer, from the same geographic area as the case group. All samples were taken after informed consent according to the declaration of Helsinki. For clinical and statistical purposes, we defined two groups of malignant cases, with a strong association with oncogenic virus: oncogenic virus-associated nasopharyngeal cases (OVNC), and oncogenic virus cervical cases (OVCC). In OVNC group, 84 undifferentiated nasopharyngeal cancers were included (24 were differentiated nasopharyngeal cancers, and thereby not associated with EBV). The OVCC group included 202 cervical malignant cases (50 High-Grade Squamous Intraepithelial Cervical Lesions of the cervix–HSIL–and 154 invasive epidermoid cervical cancers).

**Polymerase chain reaction/restriction fragment length polymorphism (PCR–RFLP) analysis.** DNA was extracted from peripheral blood leukocytes from each study subject using a salting out protocol [17]. The detection of the A870G polymorphism of *CCND1* was carried out essentially as previously described [15]. The PCR consisted of nearly 0.2 µg of genomic DNA, 30 pmol of each primer, 0.2 mM of each dNTP, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 1× Taq Buffer, and 1 U of Taq DNA polymerase to a final volume of 50 µl. Primers used in the analysis were CY26 (5′GTG AAG TTC ATT TCC AAT CCG C 3′) and CY27 (5′GGG ACA TCA CCC TCA CCC TCA CTT AC 3′). Thirty five cycles were performed, consisting of an initial heating at 95 °C for 10 min to activate the enzyme, followed by 35 cycles of denaturation at 94 °C for 1 min, annealing at 55 °C for 1 min and extension at 72 °C for 1 min, with a final extension step at 72 °C for 2 min.

PCR products (15 µl) were digested with 1 U *ScrF1* at 37 °C for 4 h, and visualized by electrophoresis on 3% agarose gels containing 0.5 µg/ml ethidium bromide. The 167 bp PCR product generated is not cut by *ScrF1* if the A allele is present, whereas the product from the G allele is cut to produce fragments of 145 and 22 bp.

**Statistical analysis.** Analysis of data was performed using the computer software SPSS for Windows (Version 12.0) and Epi Info (version 6.04). Chi-square analysis was used to compare categorical variables and a 5% level of significance was used in the analysis. The odds ratio (OR) and its 95% confidence interval (CI) were calculated as a measurement of the association between *CCND1* genotypes and ICC and NPC risk. Logistic regression analysis was used to calculate the adjusted OR (aOR) and 95% CI for the influence of the *CCND1* genotypes in the risk for cancer with adjustment for age. The Hardy–Weinberg equilibrium was tested by a Pearson goodness of fit test to compare the observed versus the expected genotype frequencies.

Finally, we considered a basic question: “For a newborn individual, what is the probability that he will experience onset of advanced disease before the age of X, supposing he survives that long?”, assuming that all cases were at an identical risk of cervical and nasopharyngeal cancers at birth [18]. To address this question, we hypothesized that *CCND1* genotypes may alter the onset of these cancers. To analyse the data, we defined age of onset for cancer as the outcome and *CCND1* genotype as an independent variable. We tested the association between age of onset and the A870G *CCND1* polymorphism by comparing Kaplan–Meier survival curves according to *CCND1* genotype. We therefore considered the waiting time for onset of disease (WTOD) as the interval between the time of initial exposure to the risk factor (*CCND1*) and the time of onset of disease. We estimated the cumulative probabilities for having cervical and nasopharyngeal cancers by the Kaplan–Meier methodology [19]. The primary analysis of time-to-event for WTOD was performed with the use of two-sided log-rank test at the 5% level of significance.

## Results

### *CCND1* genotyping

The frequencies of *CCND1* AA, AG and GG genotypes were 27.9, 55.9 and 16.2%, respectively, in normal controls, and 31.1, 54.9 and 14.0%, respectively, in the female only control group. The frequencies of the polymorphism in case groups were: 27.7% for the AA genotype, 45.5% for AG genotype and 26.7% for GG genotype in oncogenic virus-associated cervical cases (OVCC) group and 25.0, 47.6 and 27.4% for AA, AG and GG genotypes, respectively, in the oncogenic virus-associated nasopharyngeal cases (OVNC) group. The genotype distribution of both groups was in the Hardy–Weinberg equilibrium ( $P = 0.679$  in the case group and  $P = 0.341$  in the control group).

Age-adjusted logistic regression analysis indicates that individuals carrying two G-alleles have a 2.44-fold increase in the risk for the development OVCC (aOR = 2.44, 95% CI 1.38–4.30,  $P = 0.002$ ) and a 2.09-fold increased risk for the development of OVNC (aOR = 2.09, 95% CI 1.15–3.79,  $P = 0.016$ ). For all cases, the presence of the GG *CCND1* genotype was also associated with an increased genetic susceptibility for the development of oncogenic virus-associated cancers (aOR = 2.02, 95% CI 1.30–3.14,  $P = 0.002$ ) (Table 1).

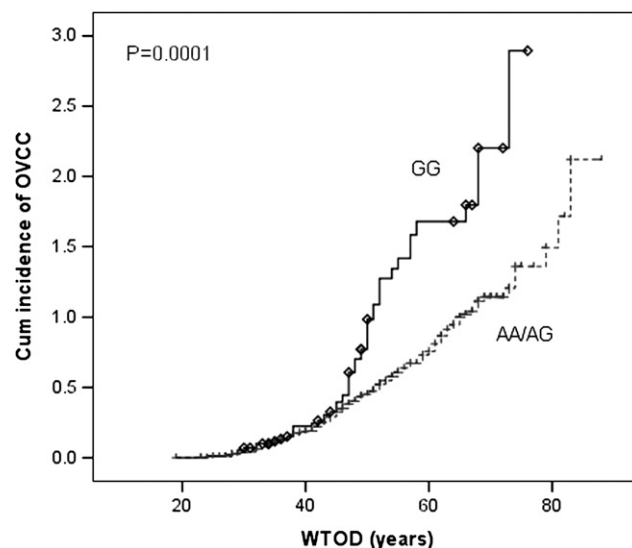
### WTOD and *CCND1* genotype

The waiting time for onset of disease, the cumulative probabilities of having disease, according to *CCND1* genotypes for the OVCC group are shown in Fig. 1. The mean WTOD was 60 years for carri-

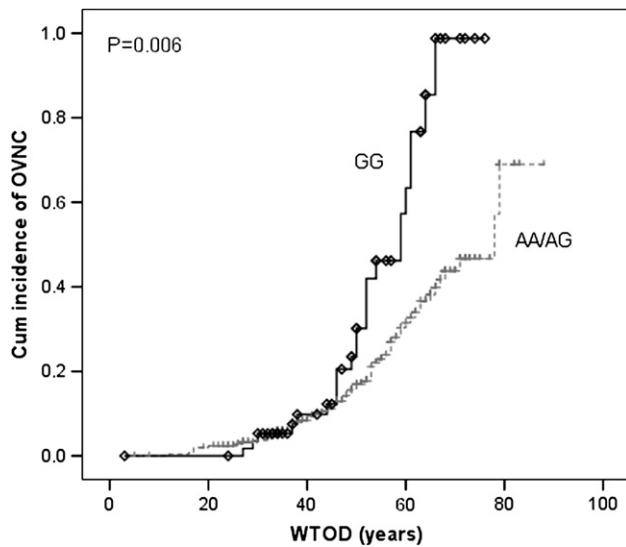
**Table 1**

Age-adjusted logistic regression analysis of the GG *CCND1* genotype regarding the genetic susceptibility to oncogenic virus-associated cancers

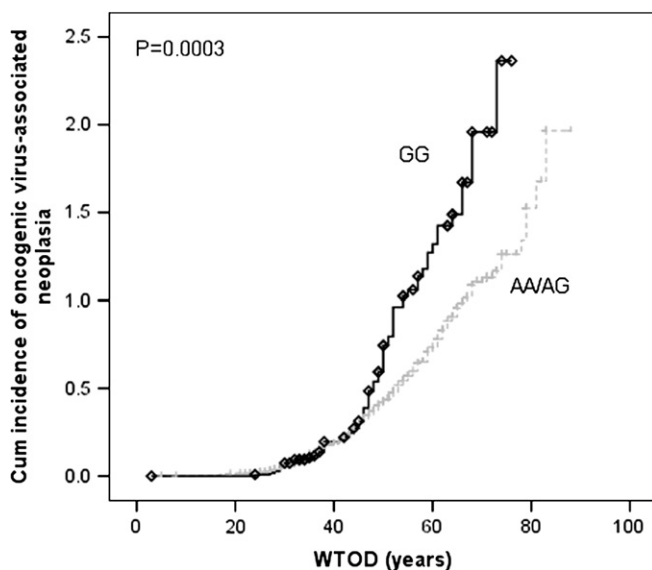
	<i>P</i>	aOR	95% CI
<i>Oncogenic virus-associated cases</i>			
Cervical	0.002	2.44	1.38–4.30
Nasopharyngeal	0.016	2.09	1.15–3.79
All cases	0.002	2.02	1.30–3.14



**Fig. 1.** Association between GG *CCND1* genotype and the waiting time to onset of disease (WTOD) for the OVCC (oncogenic virus-associated cervical cases) group. Cumulative hazard function plots by the Kaplan–Meier methodology and log-rank test ( $P = 0.0001$ ).



**Fig. 2.** Association between GG *CCND1* genotype and the waiting time to onset of disease (WTOD) for the OVNC (oncogenic virus-associated nasopharyngeal cases) group. Cumulative hazard function plots by the Kaplan–Meier methodology and log-rank test ( $P = 0.006$ ).



**Fig. 3.** Association between GG *CCND1* genotype and the waiting time to onset of oncogenic virus-associated cancers. Cumulative hazard function plots by the Kaplan–Meier methodology and log-rank test ( $P = 0.0003$ ). WTOD, waiting time to onset of disease.

ers of the AA or AG genotypes and 50 years for carriers of the GG *CCND1* genotype (log-rank test:  $P = 0.0001$ ). Regarding the OVNC group, the mean WTOD for patients carrying AA or AG genotypes was 73 years and 61 years for patients carrying the GG genotype (log-rank test:  $P = 0.006$ ) (Fig. 2). Considering all oncogenic virus cases, Kaplan–Meier analysis (Fig. 3) showed that the WTOD in patients homozygous (GG) for *CCND1* genotypes (52 years) was 12 years earlier in comparison with patients carrying AG or GG genotypes (60 years) (log-rank test:  $P = 0.0003$ ).

## Discussion

Oncogenic viruses trigger persistent infections, which can stimulate uncontrolled cell growth by inducing cell transformation.

Most oncogenic DNA viruses integrate transforming sets of genes into the host chromosome and encode proteins that bind and inactivate cell growth regulatory proteins. Tumor viruses play an important role for the development of a substantial fraction of human malignancies, including common cancers, such as carcinomas of the cervix uteri, nasopharyngeal cancers, hepatocellular carcinomas, or lymphomas [20]. Malignant transformation typically requires additional genetic alterations of the host cell, to which tumor viruses can contribute by destabilizing the cellular genome [21].

Several genetic polymorphisms contributing to individual's susceptibility to cancer have been studied regarding their association with cancer risk [22–24]. In this study, a single-nucleotide polymorphism in *CCND1* was analysed in order to evaluate its importance in the development and disease onset of cervical and nasopharyngeal cancers. The A870G polymorphism at codon 242 within the conserved splice donor site of exon 4 of the gene appears to modulate the splicing of *CCND1* mRNA, originating two transcripts (*a* and *b*), which are present in a variety of tissues [15,25]. The transcript *a* is identical to the reported *CCND1* cDNA. However, transcript *b* fails to splice at the exon 4/intron 4 boundary, does not contain exon 5, and terminates downstream of exon 4. The main difference in the cyclin D1 proteins encoded by the two transcripts (*a* and *b*) is in the C-terminal PEST-rich region (destruction box) encoded by exon 5 which is responsible for rapid intracellular degradation and turnover of the G1 cyclins [25,26].

Our results indicate that individuals carrying the *CCND1* GG genotype have increased genetic susceptibility for the development oncogenic virus-associated neoplasia (aOR = 2.02). In this study, we also demonstrate that the GG genotype is associated with an earlier age of onset of oncogenic virus-associated cancers, compared to *CCND1* AG and AA genotypes. These results are consistent with previous findings suggesting that *CCND1* GG genotype is associated with cancer development [16,27–36].

It has been suggested that the variant A allele is a major source of variant transcript *b* in several types of cancer cells. The AA genotype increases the products of transcript *b* in tumor tissue cells, resulting in an increase of an altered protein that lacks the PEST-region with increased half-life [15,25]. The presence of the A allele has been reported to be positively associated with increased risk for several cancers [12,37,38]. However, a recent study reported, surprisingly, that cyclin D1b protein does not inappropriately accumulate in cells and exhibits stability comparable to cyclin D1a. This study also suggests that cyclin D1a is a better catalyst of RB (retinoblastoma protein) phosphorylation/inactivation [39]. These data support the emerging view that *CCND1* alternate transcripts encode proteins with differing independent biological functions.

The direction of the biological impact of cyclin D1 expression depends on the state of the cell in accordance with its checkpoint function. While cyclin D1 is best known for its proliferating effect [40,41], experimental evidence suggests that under conditions such as oxidative stress [42–45] or senescence [46,47], cyclin D1 can exhibit S-phase entry and DNA replication and promote growth arrest, as well as apoptosis. The context-dependent dual role of cyclin D1 in cell proliferation and growth arrest may explain the inconsistent associations observed between *CCND1* genotype and cancer risk.

Oxidative stress, primarily due to increased generation of reactive oxygen species (ROS) and reactive nitrogen species (RNS), is a feature of many viral infections, including HPV and EBV infections [48–51]. ROS and RNS modulate the permissiveness of cells to viral replication, regulate host inflammatory and immune responses, and cause oxidative damage to both host tissue and progeny virus [48]. *In vitro* experiments of breast tumor and other tumor cells exposed to oxidative stressors demonstrate that cyclin D1 activation and overexpression is also able to activate molecular pathways



resulting in cell-cycle arrest and apoptosis [45,52]. Turner and co-workers [44] provided *in vivo* evidence of cyclin D1 as a caretaker gene offering downstream protection against oxidative damage. Our findings extend this evidence to situations of more moderate oxidative burden and suggest that modulation of the biological function of cyclin D1 by tumor viruses may lead to differential impact of the *CCND1* polymorphism on oncogenic virus-associated malignant lesions.

It is possible that these conflicting results in part reflect the many different mechanisms through which deregulated expression of *CCND1* can occur in cancer, and the direction and magnitude of the *CCND1* effect in cancer development. Functional studies in the future may help to elucidate the conflicting experimental findings and influence of *CCND1* genotypes on tumor behaviour in different cell types.

In conclusion, our results may be important in contributing to a more extensive knowledge of the mechanisms involved in oncogenic virus-associated carcinogenesis, as *CCND1* may be an important target for the development of chemoprevention or therapeutic strategies.

### Acknowledgment

We gratefully acknowledge funding of this work by the Ministry of Health of Portugal (FCICS–261/1999). We also gratefully acknowledge for financial support of individual grant for Doctoral degree of the first author to Minister to Science, Technology and Superior Education-FCT (Fundação para a Ciência e Tecnologia: SFRH/BD/29898/2006).

### References

- [1] J.S. Butel, Viral carcinogenesis: revelation of molecular mechanisms and etiology of human disease, *Carcinogenesis* 21 (2000) 405–426.
- [2] K. Munger, H. Hayakawa, C.L. Nguyen, N.V. Melquiot, A. Duensing, S. Duensing, Viral carcinogenesis and genomic instability, *Exs* (2006) 179–199.
- [3] N. Raab-Traub, The human DNA tumor viruses: human papilloma virus and Epstein–Barr virus, *Cancer Treat. Res.* 47 (1989) 285–302.
- [4] R.J. Catarino, E. Breda, V. Coelho, D. Pinto, H. Sousa, C. Lopes, R. Medeiros, Association of the A870G cyclin D1 gene polymorphism with genetic susceptibility to nasopharyngeal carcinoma, *Head Neck* 28 (2006) 603–608.
- [5] A. Coelho, A. Matos, R. Catarino, D. Pinto, D. Pereira, C. Lopes, R. Medeiros, Protective role of the polymorphism CCR2-64I in the progression from squamous intraepithelial lesions to invasive cervical carcinoma, *Gynecol. Oncol.* 96 (2005) 760–764.
- [6] H. Sousa, A.M. Santos, R. Catarino, D. Pinto, A. Vasconcelos, C. Lopes, E. Breda, R. Medeiros, Linkage of TP53 codon 72 pro/pro genotype as predictive factor for nasopharyngeal carcinoma development, *Eur. J. Cancer Prev.* 15 (2006) 362–366.
- [7] J.P. Spano, P. Busson, D. Atlan, J. Bourhis, J.P. Pignon, C. Esteban, J.P. Armand, Nasopharyngeal carcinomas: an update, *Eur. J. Cancer* 39 (2003) 2121–2135.
- [8] J.M. Walboomers, M.V. Jacobs, M.M. Manos, F.X. Bosch, J.A. Kummer, K.V. Shah, P.J. Snijders, J. Peto, C.J. Meijer, N. Munoz, Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide, *J. Pathol.* 189 (1999) 12–19.
- [9] L.H. Hartwell, M.B. Kastan, Cell cycle control and cancer, *Science* 266 (1994) 1821–1828.
- [10] C. Sherr, D-type cyclins, *Trends Biochem. Sci.* 5 (1995) 187–190.
- [11] C. Sherr, Cancer cell cycles, *Science* 274 (1996) 1672–1677.
- [12] M. Fu, C. Wang, Z. Li, T. Sakamaki, R.G. Pestell, Minireview: Cyclin D1: normal and abnormal functions, *Endocrinology* 145 (2004) 5439–5447.
- [13] S. Bates, G. Peters, Cyclin D1 as a cellular proto-oncogene, *Semin. Cancer Biol.* 6 (1995) 73–82.
- [14] D.C. Betticher, J. Heighway, P.S. Hasleton, H.J. Altermatt, W.D. Ryder, T. Cerny, N. Thatcher, Prognostic significance of *CCND1* (cyclin D1) overexpression in primary resected non-small-cell lung cancer, *Br. J. Cancer* 73 (1996) 294–300.
- [15] D.C. Betticher, N. Thatcher, H.J. Altermatt, P. Hoban, W.D. Ryder, J. Heighway, Alternate splicing produces a novel cyclin D1 transcript, *Oncogene* 11 (1995) 1005–1011.
- [16] K.E. Knudsen, J.A. Diehl, C.A. Haiman, E.S. Knudsen, Cyclin D1: polymorphism, aberrant splicing and cancer risk, *Oncogene* 25 (2006) 1620–1628.
- [17] R. Mullenbach, P.J. Lagoda, C. Welter, An efficient salt-chloroform extraction of DNA from blood and tissues, *Trends Gene.* 5 (1989) 391.
- [18] R. Elandt-Johnson, Norman L. Johnson, in: R. Elandt-Johnson, Norman L. Johnson (Eds.), *Survival models and data analysis*, John Wiley, New York, pp. 392–413.
- [19] E.L. Kaplan, P. Meier, Non-parametric estimation from incomplete observations, *J. Am. Stat. Assoc.* 53 (1958) 457–481.
- [20] F. Hoppe-Seyler, K. Butz, Human tumor viruses, *Anticancer Res.* 19 (1999) 4747–4758.
- [21] R. Medeiros, H. Prazeres, D. Pinto, I. Macedo-Pinto, M. Lacerda, C. Lopes, E. Cruz, Characterization of HPV genotype profile in squamous cervical lesions in Portugal, a southern European population at high risk of cervical cancer, *Eur. J. Cancer Prev.* 14 (2005) 467–471.
- [22] R. Medeiros, A. Morais, A. Vasconcelos, S. Costa, D. Pinto, J. Oliveira, R. Carvalho, C. Lopes, Linkage between polymorphisms in the prostate specific antigen *ARE1* gene region, prostate cancer risk, and circulating tumor cells, *The Prostate* 53 (2002) 88–94.
- [23] R. Medeiros, A. Morais, A. Vasconcelos, S. Costa, D. Pinto, J. Oliveira, C. Lopes, The role of vitamin D receptor gene polymorphisms in the susceptibility to prostate cancer of a southern European population, *J. Hum. Gene.* 47 (2002) 413–418.
- [24] R. Medeiros, R. Soares, A. Vasconcelos, F. Schmitt, C. Lopes, Glutathione S-transferase genotype *GSTM1* as a predictor of elevated angiogenic phenotype in patients with early onset breast cancer, *Angiogenesis* 7 (2004) 53–58.
- [25] H. Sawa, T.A. Ohshima, H. Ukita, H. Murakami, Y. Chiba, H. Kamada, M. Hara, I. Saito, Alternatively spliced forms of cyclin D1 modulate entry into cell cycle in an inverse manner, *Oncogene* 16 (1998) 1701–1712.
- [26] S. Rogers, R. Wells, M. Rechsteiner, Amino acid sequences common to rapidly degraded proteins: the PEST hypothesis, *Science* 234 (1986) 364–368.
- [27] C. Matthias, V. Jahne, P.W. Jones, P.R. Hoban, J.E. Alldersea, S.F. Worrall, A.A. Fryer, R.C. Strange, Cyclin D1, glutathione S-transferase, and cytochrome P450 genotypes and outcome in patients with upper aerodigestive tract cancers: assessment of the importance of individual genes using multivariate analysis, *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 8 (1999) 815–823.
- [28] C. Matthias, K. Branigan, V. Jahnke, K. Leder, J. Haas, J. Heighway, P.W. Jones, R.C. Strange, A.A. Fryer, P.R. Hoban, Polymorphism within the cyclin D1 gene is associated with prognosis in patients with squamous cell carcinoma of the head and neck, *Clin. Cancer Res.* 4 (1998) 2411–2418.
- [29] S.L. Holley, G. Parkes, C. Matthias, U. Bockmuhl, V. Jahnke, K. Leder, R.C. Strange, A.A. Fryer, P.R. Hoban, Cyclin D1 polymorphism and expression in patients with squamous cell carcinoma of the head and neck, *Am. J. Pathol.* 159 (2001) 1917–1924.
- [30] E. Monteiro, G. Varzim, A.M. Pires, M. Teixeira, C. Lopes, Cyclin D1 A870G polymorphism and amplification in laryngeal squamous cell carcinoma: implications of tumor localization and tobacco exposure, *Cancer Detect. Prev.* 28 (2004) 237–243.
- [31] J.M. Gijtenbeek, S.H. Boots-Sprenger, B. Franke, P. Wesseling, J.W. Jeuken, Cyclin D1 genotype and expression in sporadic hemangioblastomas, *J. Neurooncol.* 74 (2005) 261–266.
- [32] Y.J. Zhang, S.Y. Chen, C.J. Chen, R.M. Santella, Polymorphisms in cyclin D1 gene and hepatocellular carcinoma, *Mol. Carcinog.* 33 (2002) 125–129.
- [33] M. Ceschi, C.L. Sun, D. Van Den Berg, W.P. Koh, M.C. Yu, N. Probst-Hensch, The effect of cyclin D1 (*CCND1*) G870A-polymorphism on breast cancer risk is modified by oxidative stress among Chinese women in Singapore, *Carcinogenesis* 26 (2005) 1457–1464.
- [34] U. Langsenlehner, G. Hofmann, H. Samonigg, P. Krippel, W. Renner, H. Clar, Cyclin D1 genotype and breast cancer metastasis, *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 14 (2005) 1844–1845.
- [35] X.O. Shu, D.B. Moore, Q. Cai, J. Cheng, W. Wen, L. Pierce, H. Cai, Y.T. Gao, W. Zheng, Association of cyclin D1 genotype with breast cancer risk and survival, *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 14 (2005) 91–97.
- [36] N.M. Probst-Hensch, C.L. Sun, D. Van Den Berg, M. Ceschi, W.P. Koh, M.C. Yu, The effect of the cyclin D1 (*CCND1*) A870G polymorphism on colorectal cancer risk is modified by glutathione-S-transferase polymorphisms and isothiocyanate intake in the Singapore Chinese Health Study, *Carcinogenesis* (2006).
- [37] J.A. McKay, J.J. Douglas, V.G. Ross, S. Curran, G.I. Murray, J. Cassidy, H.L. McLeod, Cyclin D1 protein expression and gene polymorphism in colorectal cancer. Aberdeen colorectal initiative, *Int. J. Cancer* 88 (2000) 77–81.
- [38] L. Wang, H. Tokuda, T. Takahashi, K. Mitsumori, T. Kamoto, Y. Kakehi, H. Kakinuma, K. Sato, A. Nakamura, O. Ogawa, T. Kato, Cyclin D1 gene polymorphism is associated with an increased risk of urinary bladder cancer, *Carcinogenesis* 23 (2002) 257–264.
- [39] D.A. Solomon, Y. Wang, S.R. Fox, T.C. Lambeck, S. Giesting, Z. Lan, A.M. Senderowicz, C.J. Conti, E.S. Knudsen, Cyclin D1 splice variants: Differential effects on localization, RB phosphorylation, and cellular transformation, *J. Biol. Chem.* 32 (2003) 30339–30347.
- [40] T. Hunter, J. Pines, Cyclins and cancer II: cyclin D and CDK inhibitors come and of age, *Cell* 79 (1994) 573–582.
- [41] J. Pines, Cyclins, CDKs and cancer, *Semin. Cancer Biol.* 6 (1995) 63–72.
- [42] M. Pagano, A.M. Theodoras, S.W. Tam, G.F. Draetta, Cyclin D1-mediated inhibition of repair and replicative DNA synthesis in human fibroblasts, *Genes Dev.* 8 (1994) 1627–1639.
- [43] A. Kinoshita, H. Wanibuchi, S. Imaoka, M. Ogawa, C. Masuda, K. Morimura, Y. Funae, S. Fukushima, Formation of 8-hydroxydeoxyguanosine and cell-cycle arrest in the rat liver via generation of oxidative stress by phenobarbital: association with expression profiles of p21(WAF1/Cip1), cyclin D1 and Ogg1, *Carcinogenesis* 23 (2002) 341–349.

- [44] B.C. Turner, A.A. Gumbs, D. Carter, P.M. Glazer, B.G. Haffty, Cyclin D1 expression and early breast cancer recurrence following lumpectomy and radiation, *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 47 (2000) 1169–1176.
- [45] F.S. Pardo, M. Su, C. Borek, Cyclin D1 induced apoptosis maintains the integrity of the G1/S checkpoint following ionizing radiation irradiation, *Somat. Cell. Mol. Genet.* 22 (1996) 135–144.
- [46] P. Atadja, H. Wong, C. Veillete, K. Riabowol, Overexpression of cyclin D1 blocks proliferation of normal diploid fibroblasts, *Exp. Cell. Res.* 217 (1995) 205–216.
- [47] R.S. Freeman, S. Estus, E.M. Johnson Jr., Analysis of cell cycle-related gene expression in postmitotic neurons: selective induction of Cyclin D1 during programmed cell death, *Neuron* 12 (1994) 343–355.
- [48] T. Valyi-Nagy, T.S. Dermody, Role of oxidative damage in the pathogenesis of viral infections of the nervous system, *Histol. Histopathol.* 20 (2005) 957–967.
- [49] J.S. Yu, H.C. Tsai, C.C. Wu, L.P. Weng, H.P. Li, P.J. Chung, Y.S. Chang, Induction of inducible nitric oxide synthase by Epstein-Barr virus B95-8-derived LMP1 in Balb/3T3 cells promotes stress-induced cell death and impairs LMP1-mediated transformation, *Oncogene* 21 (2002) 8047–8061.
- [50] A.H. Dalpke, R. Thomssen, K. Ritter, Oxidative injury to endothelial cells due to Epstein-Barr virus-induced autoantibodies against manganese superoxide dismutase, *J. Med. Virol.* 71 (2003) 408–416.
- [51] O. Rey, S. Lee, N.H. Park, Impaired nucleotide excision repair in UV-irradiated human oral keratinocytes immortalized with type 16 human papillomavirus genome, *Oncogene* 18 (1999) 6997–7001.
- [52] B.A. Coco, J.M. Martin, T. Verschoor, F. Lallemand, R. Michalides, Cyclin D1 overexpression enhances radiation-induced apoptosis and radiosensitivity in a breast tumor cell line, *Cancer Res.* 5 (1999) 1134–1140.

## ASSOCIATION OF THE A870G CYCLIN D1 GENE POLYMORPHISM WITH GENETIC SUSCEPTIBILITY TO NASOPHARYNGEAL CARCINOMA

Raquel J. Catarino, ScD,<sup>1</sup> Eduardo Breda, MD,<sup>2</sup> Vânia Coelho, ScD,<sup>1</sup> Daniela Pinto, MSc,<sup>1</sup> Hugo Sousa, ScD,<sup>1</sup> Carlos Lopes, PhD,<sup>1</sup> Rui Medeiros, PhD<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup> Molecular Oncology Unit, Instituto Português de Oncologia, Porto, Laboratórios, Piso 4, Unit of Molecular Oncology, R. Dr. Ant. Bernardino Almeida, 4200-072 Porto, Portugal. E-mail: ruimedei@ipoporto.min-saude.pt

<sup>2</sup> Otorrinolaringology Department, Portuguese Institute of Oncology, Porto, Portugal

<sup>3</sup> ICBAS, Abel Salazar Institute for the Biomedical Sciences, Porto, Portugal

Accepted 20 October 2005

Published online 11 May 2006 in Wiley InterScience (www.interscience.wiley.com). DOI: 10.1002/hed.20377

**Abstract:** *Background.* Nasopharyngeal cancer (NPC) is multifactorial, and the genetic background may be a crucial etiologic factor. Cyclin D1 (CCND1) is a key regulator of the cell cycle, and its altered activity is associated with the development of cancer.

*Methods.* We analyzed the A870G CCND1 polymorphism by polymerase chain reaction/restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) in 281 individuals, including 94 patients with NPC and 187 healthy individuals.

*Results.* Our results indicate that individuals carrying two G alleles have a 2.17-fold increase in the risk for the development of NPC (odds ratio [OR], 2.17; 95% confidence interval [CI], 1.19–3.98;  $p = .016$ ). Age-adjusted logistic regression analysis confirmed this association (adjusted odds ratio [aOR], 2.14; 95% CI, 1.14–4.04;  $p = .018$ ). Multivariate analysis demonstrates an independent association between GG CCND1 genotype (aOR, 2.06), male sex (aOR, 2.66), and age at diagnosis (aOR, 2.02) regarding the development of undifferentiated NPC. The proportion of NPC cases attributable to the GG CCND1 genotype was 14.76%.

Correspondence to: R. Medeiros

Contract grant sponsor: This work was funded by the Ministry of Health of Portugal (CFICS—261/1999).

\*Current address: Medizinische Klinik III, Hämatologie, Onkologie und Transfusionsmedizin Charité-Universitätsmedizin Berlin, Campus Benjamin Franklin, Germany

© 2006 Wiley Periodicals, Inc.

*Conclusions.* Our results may be important in the definition of a biologic predictive profile for the development of NPC within our population. © 2006 Wiley Periodicals, Inc. *Head Neck* 28: 603–608, 2006

**Keywords:** cyclin D1; genetic polymorphism; nasopharyngeal cancer; head and neck; cancer risk

**N**asopharyngeal cancer (NPC) has a remarkably distinctive geographic and ethnic distribution with particularly high rates among Southern China and Southeast Asia. NPC is a rare malignant disease, with an incidence less than 1 per 100,000 persons per year in Caucasians from North America and other Western countries. Independent of race/ethnicity, men are twofold to threefold more frequently affected than women. The dramatic difference in the incidence among populations and geographic areas suggests a strong association of NPC with genetic and environmental factors.<sup>1</sup> In contrast to other head and neck cancers, a unique feature of NPC is its strong association with Epstein-Barr virus (EBV).<sup>2</sup> However, NPC oncogenesis is not simply a conse-

quence of EBV infection. It probably results from a viral reactivation in combination with other events, such as cellular genetic lesions caused by environmental carcinogens and/or some immune defects. The contribution of other pathogenic factors, especially genetic and environmental factors, should be considered.<sup>2</sup> In addition to EBV, numerous other environmental factors have been shown to be associated with the development of NPC. In particular, long-term cigarette smoking, consumption of salted fish and foods containing nitrosamine or nitrosamine precursors at an early age, and occupational exposure to wood dust have been shown to be consistently associated with this disease.<sup>1</sup> Host factors previously shown to be associated with NPC development include human leukocyte antigen (*HLA*) class I and II alleles<sup>3</sup> and polymorphisms of genes responsible for carcinogen metabolism (*CYP2E1*), detoxification (*GSTM1*), and DNA repair (*XRCC1* and *hOGG1*).<sup>4-6</sup>

A frequent target in carcinogenesis is the deregulation of G1 to S phase progression of the cell cycle. The transition through G1 to S phase is regulated by cyclins, cyclin-dependent kinases, and their inhibitors.<sup>7</sup> Cyclin D1 (*CCND1*) is a key regulatory protein at the G1/S checkpoint of the cell cycle. It forms complexes with CDK4 or CDK6 and is responsible for the phosphorylation of the retinoblastoma tumor suppressor protein, resulting in the release of E2F transcription factors that allow cells to enter into S-phase.<sup>8-10</sup> The G1/S checkpoint is frequently altered in many epithelial tumors and may confer growth advantage and enhance tumorigenesis. Amplification of *CCND1* and altered expression of the protein have been reported in a variety of tumors, including esophagus, colon, breast, head and neck, and lung.<sup>11-16</sup>

Recently, it has been reported that *CCND1* mRNA is alternatively spliced to produce two transcripts (*a* and *b*), which are present simultaneously in a variety of normal tissues and cancer cells.<sup>17,18</sup> Betticher and colleagues<sup>18</sup> identified a single base pair polymorphism (A870G) in *CCND1*, and *CCND1* genotypes have been significantly associated with carcinogenesis and clinical outcome in a variety of cancers.<sup>19-23</sup>

The aim of our study was to investigate the influence of *CCND1* genotypes on the genetic susceptibility to NPC.

## PATIENTS AND METHODS

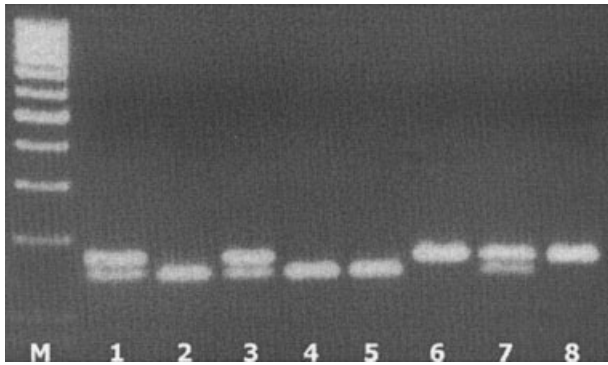
**Patients.** We tested the association between the *CCND1* A870G polymorphism and risk of NPC

with a case-control study. Ninety-four patients with histologically confirmed NPC were selected for this study. Patients were admitted to the Portuguese Oncology Institute-Porto, Portugal, during the period from 1997 to 2003. The median age at diagnosis was 50 years (SD, 14.5). The control group consisted of 187 healthy individuals, with a median age of 55 years (SD, 16.8), without clinical history of cancer, from the same geographic area as the case group. All samples were taken after informed consent according to the declaration of Helsinki.

**Polymerase Chain Reaction/Restriction Fragment Length Polymorphism Analysis.** DNA was extracted from peripheral blood leukocytes from each study subject using a salting out protocol.<sup>24</sup> The detection of the A870G polymorphism of *CCND1* was carried out essentially as previously described.<sup>18</sup> The polymerase chain reactions consisted of nearly 0.2 µg of genomic DNA, 30 pmol of each primer, 0.2 mM of each dNTP, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 × *Taq* buffer, and 1 U of *Taq* DNA polymerase to a final volume of 50 µL. Primers used in the analysis were CY26 (5'-GTG AAG TTC ATT TCC AAT CCG C-3') and CY27 (5'-GGG ACA TCA CCC TCA CCC TCA CTTAC-3'). Thirty-five cycles were performed, consisting of an initial heating at 95°C for 10 minutes to activate the enzyme, followed by 35 cycles of denaturation at 94°C for 1 minute, annealing at 55°C for 1 minute, and extension at 72°C for 1 minute, with a final extension step at 72°C for 2 minutes.

PCR products (15 µL) were digested with 1 U *ScrF1* at 37°C for 4 hours and visualized by electrophoresis on 3% agarose gels containing 0.5 µg/mL ethidium bromide. The 167-bp PCR product generated is not cut by *ScrF1* if the A allele is present, whereas the product from the G allele is cut to produce fragments of 145 and 22 bp (Figure 1).

**Statistical Analysis.** Analysis of data was performed using the computer software SPSS for Windows (version 12.0) and Epi Info (version 6.04). Chi-square analysis was used to compare categorical variables, and a 5% level of significance was used in the analysis. The odds ratio (OR) and its 95% confidence interval (CI) were calculated as a measurement of the association between *CCND1* genotypes and NPC risk. Multivariate logistic regression analysis was used to calculate the adjusted OR (aOR) and 95% CI for the influence of the *CCND1* genotypes in the risk for NPC with adjustment for age and sex. The



**FIGURE 1.** Analysis of the *CCND1* genotypes—restriction fragment length polymorphism of the polymerase chain reaction products. M, 100-bp ladder; cases 1, 3, and 7, *CCND1* heterozygous (G/A); cases 2, 4, and 5, homozygous GG; cases 6 and 8, homozygous AA.

Hardy–Weinberg equilibrium was tested by a Pearson goodness of fit test to compare the observed versus the expected genotype frequencies. We calculated the attributable proportion (AP) using the following formula:  $AP = PRF \times (1 - 1/OR)$ , where AP is the fraction of disease attributable to the risk factor and PRF is the percentage of the risk factor in case subjects and OR is the odds ratio.

## RESULTS

The distribution of *CCND1* genotypes among patients and controls and the risk of NPC caused by the influence of *CCND1* polymorphism are shown in Table 1.

The frequencies of AA, AG, and GG genotypes were 28.9%, 56.1%, and 15.0%, respectively, in normal controls, and 27.7%, 44.6%, and 27.7%, respectively, in the patient group. The genotype distribution of both groups was in the Hardy–

**Table 1.** Prevalence and odds ratio of *CCND1* genotypes among control group and patients with nasopharyngeal carcinoma.

	Patients (n = 94)		Controls (n = 187)		aOR	95%CI	p value
	n	%	n	%			
<b>Genotypes</b>							
AA	26	27.7	54	28.9			
AG	42	44.6	105	56.1			
GG	26	27.7	28	15.0			
<b>Recessive model</b>							
AA/AG	68	72.3	159	85.0	1.00	Reference	
GG	26	27.7	28	15.0	2.17*	1.19–3.98*	.016*

\* $p = .016$ , aOR = 2.14 and 95% confidence interval (CI) = 1.14–4.04 using logistic regression analysis adjusted by age.

Weinberg equilibrium ( $p = .80$  in the patient group and .36 in the control group). The analysis of the frequencies of *CCND1* genotypes indicates that individuals carrying two G-alleles have a 2.17-fold increase in the risk for the development of NPC (OR, 2.17; 95% CI, 1.19–3.98;  $p = .016$ ). Age-adjusted logistic regression analysis confirmed the association between the presence of the GG *CCND1* genotype and increased genetic susceptibility for the development of NPC (aOR, 2.14; 95% CI, 1.14–4.04;  $p = .018$ ).

The characteristics of patients with NPC and controls are shown in Table 2.

Multivariate logistic regression analysis indicated the association of the GG *CCND1* genotype (aOR, 2.06; 95% CI, 1.04–4.09;  $p = .039$ ), male sex (aOR, 2.66; 95% CI, 1.45–4.86;  $p = .002$ ), and age at diagnosis older than 50 years (aOR, 2.02; 95% CI, 1.12–3.62;  $p = .019$ ) with undifferentiated histologic type of NPC (undifferentiated carcinoma of nasopharyngeal type, UCNT) risk, demonstrating the independent association between the *CCND1*

**Table 2.** Characteristics of patients with nasopharyngeal carcinoma and controls.

Characteristic	No. (%)	
	Patients (n = 94)	Controls (n = 187)
<b>Sex</b>		
Female	25 (26.6)	103 (55.1)
Male	69 (73.4)	84 (44.9)
Total	94 (100.0)	187 (100.0)
<b>Age, y</b>		
Median $\pm$ SD	50 $\pm$ 14.5	55 $\pm$ 16.8
<b>Histology</b>		
Well differentiated	1 (1.1)	
Moderately differentiated	11 (11.7)	
Undifferentiated	69 (73.4)	
Not stated	13 (13.8)	
Total	94 (100.0)	
<b>Staging</b>		
I	2 (2.1)	
II	11 (11.7)	
III	21 (22.4)	
IV	41 (43.6)	
Not stated	19 (20.2)	
Total	94 (100.0)	
<b>Nodular metastasis</b>		
Yes	58 (61.7)	
No	24 (25.5)	
Not stated	12 (12.8)	
Total	94 (100.0)	
<b>Distant metastasis</b>		
Yes	2 (2.1)	
No	80 (85.1)	
Not stated	12 (12.8)	
Total	94 (100.0)	

**Table 3.** Multivariate analysis of the *GG CCND1* genotype, sex, and age at diagnosis regarding the susceptibility to undifferentiated histologic type of nasopharyngeal carcinoma.

	<i>p</i> value*	aOR*	95% CI*
GG genotype	.039	2.06	1.04–4.09
Age ≥50 y	.019	2.02	1.12–3.62
Male sex	.002	2.66	1.45–4.86

Abbreviations: aOR, ; CI, confidence interval.

\**P*, aOR, and 95% CI using logistic regression analysis.

GG genotype and the development of UCNT, as shown in Table 3. For patients with NPC, the proportion of NPC cases attributable to the GG *CCND1* genotype was 14.76%.

## DISCUSSION

NPC is a human malignancy consistently associated with EBV. However, the etiology of NPC is complex and multifactorial, and exposure to non-viral carcinogens and genetic predisposition are other crucial etiologic factors.

Several genetic polymorphisms contributing to an individual's susceptibility to cancer have been studied regarding their association with NPC risk.<sup>3–6</sup> In this study, a single-nucleotide polymorphism in *CCND1* was analyzed to evaluate its importance in the development of NPC. The A870G polymorphism at codon 242 within the conserved splice donor site of exon 4 of the gene seems to modulate the splicing of *CCND1* mRNA, originating in two transcripts (*a* and *b*), which are present in a variety of tissues.<sup>18,25,26</sup> The transcript *a* is identical to the reported *CCND1* cDNA. However, transcript *b* fails to splice at the exon 4/intron 4 boundary, does not contain exon 5, and terminates downstream of exon 4. The main difference in the cyclin D1 proteins encoded by the two transcripts (*a* and *b*) is in the C-terminal PEST-rich region (destruction box) encoded by exon 5, which is responsible for rapid intracellular degradation and turnover of the G1 cyclins.<sup>18,25,27</sup>

It has been suggested that the variant A allele is a major source of variant transcript *b* in several types of cancer cells. The AA genotype increases the products of transcript *b* in tumor tissue cells, resulting in an increase of an altered protein that lacks the PEST-region with increased half-life.<sup>18,26,28</sup> However, a recent study reported, surprisingly, that cyclin D1b protein does not inappropriately accumulate in cells and exhibits stability comparable to cyclin D1a. This study also

suggests that cyclin D1a is a better catalyst of RB phosphorylation/inactivation.<sup>29</sup>

Our results indicate that individuals carrying the *CCND1* GG genotype have increased risk for the development of NPC (aOR, 2.14) and suggest a predictive biologic profile for the development of UCNT, indicating that individuals older than 50 years (aOR, 2.02), of male sex (aOR, 2.66), and carriers of the GG *CCND1* genotype (aOR, 2.06) have an increased susceptibility for the development of UCNT. These results are consistent with previous findings suggesting that *CCND1* GG genotype is associated with cancer development.<sup>19,20,23,30–33</sup> Matthias et al<sup>19,20</sup> reported that the *CCND1* GG genotype was associated with poorly differentiated tumors of the head and neck and reduced the disease-free interval in laryngeal and pharyngeal carcinomas, independently from tumor differentiation, providing a link between *CCND1* A870G alleles with *CCND1* expression and clinical outcome in squamous cell carcinoma of the head and neck. Monteiro et al<sup>23</sup> reported a correlation between GG genotype and increased susceptibility for laryngeal tumor development. Another recently published study demonstrated that EBV-LMP1 could regulate cell growth by activation of cyclin D1 expression by means of the nuclear factor kappa B (NF-κB) pathway in NPC and suggested that A870G polymorphism was associated with susceptibility to NPC.<sup>31</sup> However, controversial results have been reported regarding the role of *CCND1* genotypes in cancer development.<sup>22,28,34,35</sup> The mechanism for this association is unknown, although because the G allele splices less of transcript *b* than the A allele, individuals with *CCND1* GG may have different cellular levels of *CCND1* than individuals with *CCND1* AA.

Furthermore, these results suggest that the effect of genotype on tumor behavior may exhibit some degree of tissue specificity.<sup>19</sup> It is possible that these conflicting results in part reflect the many different mechanisms through which deregulated expression of *CCND1* can occur in cancer. Functional studies in the future may help to explain the conflicting experimental findings and influence of *CCND1* genotypes on tumor behavior in different cell types.

The contribution of genetic polymorphisms to the risk for cancer may be dependent on the studied population, as well as on several environmental and other factors that influence that population. Geographic or ethnic differences have been reported regarding the genotype frequency of several polymorphisms. Our results within the Por-

tuguese population are consistent with a recently published study in our population.<sup>23</sup> Further studies may include the analysis of other genetic polymorphisms that have been already associated with cancer risk to characterize the genetic profile of NPC susceptibility.<sup>36–42</sup>

In conclusion, our results may be important in the definition of a biologic predictive profile for the development of NPC within our population. Furthermore, the knowledge of the mechanisms involved in NPC carcinogenesis may help to identify targets for the development of chemoprevention or therapeutic strategies.

**Acknowledgments.** The authors thank the Liga Portuguesa Contra o Cancro (Portuguese League against Cancer), Centro Regional do Norte for their support.

## REFERENCES

- Lo KW, Huang DP. Focus on nasopharyngeal carcinoma. *Cancer Cell* 2004;5:423–428.
- Spano JP, et al. Nasopharyngeal carcinomas: an update. *Eur J Cancer* 2003;39:2121–2135.
- Hildesheim A, et al. Association of HLA class I and II alleles and extended haplotypes with nasopharyngeal carcinoma in Taiwan. *J Natl Cancer Inst* 2002;94:1780–1789.
- Hildesheim A, et al. CYP2E1 genetic polymorphisms and risk of nasopharyngeal carcinoma in Taiwan. *J Natl Cancer Inst* 1997;89:1207–1212.
- 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;8:547–551.
- Cho EY, et al. Nasopharyngeal carcinoma and genetic polymorphisms of DNA repair enzymes XRCC1 and hOGG1. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2003;12:1100–1104.
- Hartwell LH, Kastan MB. Cell cycle control and cancer. *Science* 1994;266:1821–1828.
- Sherr CJ. D-type cyclins. *Trends Biochem Sci* 1995;5:187–190.
- Sherr CJ. Cancer cell cycles. *Science* 1996;274:1672–1677.
- Fu M, Wang C, Li Z, Sakamaki T, Pestell RG. Minireview: Cyclin D1: normal and abnormal functions. *Endocrinology* 2004;145:5439–5447.
- Callender T, el-Naggar AK, Lee MS, Frankenthaler R, Luna MA, Batsakis JG. PRAD-1 (CCND1)/cyclin D1 oncogene amplification in primary head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer* 1994;74:152–158.
- Betticher DC, et al. Prognostic significance of CCND1 (cyclin D1) overexpression in primary resected non-small cell lung cancer. *Br J Cancer* 1996;73:294–300.
- Chen Y, Martinez LA, LaCava M, Coghlan L, Conti CJ. Increased cell growth and tumorigenicity in human prostate LNCaP cells by overexpression to cyclin D1. *Oncogene* 1998;16:1913–1920.
- Marsh KL, Varley JM. Frequent alterations of cell cycle regulators in early-stage breast lesions as detected by immunohistochemistry. *Br J Cancer* 1998;77:1460–1468.
- Palmqvist R, Stenling R, Oberg A, Landberg G. Expression of cyclin D1 and retinoblastoma protein in colorectal cancer. *Eur J Cancer* 1998;34:1575–1581.
- Sgambato A, et al. Cyclin D1 expression in papillary superficial bladder cancer: its association with other cell cycle-associated proteins, cell proliferation and clinical outcome. *Int J Cancer* 2002;97:671–678.
- Hunter T, Pines J. Cyclins and cancer II: cyclin D and CDK inhibitors come and of age. *Cell* 1994;79:573–582.
- Betticher DC, Thatcher N, Altermatt HJ, Hoban P, Ryder WD, Heighway J. Alternate splicing produces a novel cyclin D1 transcript. *Oncogene* 1995;11:1005–1011.
- Matthias C, et al. Polymorphism within the cyclin D1 gene is associated with prognosis in patients with squamous cell carcinoma of the head and neck. *Clin Cancer Res* 1998;4:2411–2418.
- Matthias C, et al. Cyclin D1, glutathione S-transferase, and cytochrome P450 genotypes and outcome in patients with upper aerodigestive tract cancers: assessment of the importance of individual genes using multivariate analysis. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 1999;8:815–823.
- McKay JA, et al. Cyclin D1 protein expression and gene polymorphism in colorectal cancer. *Aberdeen Colorectal Initiative. Int J Cancer* 2000;88:77–81.
- Wang L, et al. Increased risk of prostate cancer associated with AA genotype of cyclin D1 gene A870G polymorphism. *Int J Cancer* 2003;103:116–120.
- Monteiro E, Varzim G, Pires AM, Teixeira M, Lopes C. Cyclin D1 A870G polymorphism and amplification in laryngeal squamous cell carcinoma: implications of tumor localization and tobacco exposure. *Cancer Detect Prev* 2004;28:237–243.
- Mullenbach R, Lagoda PJ, Welter C. An efficient salt-chloroform extraction of DNA from blood and tissues. *Trends Gene* 1989;5:391.
- Hosokawa Y, Gadd M, Smith AP, Koerner FC, Schidt EV, Arnold A. Cyclin D1 (PRAD1) alternative transcript b: fulllength cDNA cloning and expression in breast cancers. *Cancer Lett* 1997;113:123–130.
- Sawa H, et al. Alternatively spliced forms of cyclin D1 modulate entry into cell cycle in an inverse manner. *Oncogene* 1998;16:1701–1712.
- Rogers S, Wells R, Rechsteiner M. Amino acid sequences common to rapidly degraded proteins: the PEST hypothesis. *Science* 1986;234:364–368.
- Wang L, et al. Cyclin D1 gene polymorphism is associated with an increased risk of urinary bladder cancer. *Carcinogenesis* 2002;23:257–264.
- Solomon DA, et al. Cyclin D1 splice variants. Differential effects on localization, RB phosphorylation, and cellular transformation. *J Biol Chem* 2003;328:30339–30347.
- Holley SL, et al. Cyclin D1 polymorphism and expression in patients with squamous cell carcinoma of the head and neck. *Am J Pathol* 2001;159:1917–1924.
- Holley SL, Matthias C, Jahnke V, Fryer AA, Strange RC, Hoban PR. Association of cyclin D1 polymorphism with increased susceptibility to oral squamous cell carcinoma. *Oral Oncol* 2005;41:156–160.
- Deng L, et al. Cyclin D1 polymorphism and the susceptibility to NPC using DHPLC. *Sheng Wu Hua Xue Yu Sheng Wu Wu Li Xue Bao (Shanghai)* 2002;1:16–20.
- Catarino R, et al. Increased risk of cervical cancer associated with cyclin D1 gene A870G polymorphism. *Cancer Genet Cytogenet* 2005;160:49–54.
- Kong S, Amos CI, Luthra R, Lynch PM, Levin B, Frazier ML. Effects of cyclin D1 polymorphism on age of onset of hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *Cancer Res* 2000;60:249–252.
- Zheng Y, et al. Cyclin D1 polymorphism and risk for squamous cell carcinoma of the head and neck: a case-control study. *Carcinogenesis* 2001;22:1195–1199.

36. Ferreira P, et al. Association between CYP2E1 polymorphisms and susceptibility to prostate cancer. *Eur J Cancer Prev* 2003;12:205–211.
37. Medeiros R, et al. Endothelial nitric oxide synthase gene polymorphisms and the shedding of circulating tumour cells in the blood of prostate cancer patients. *Cancer Lett* 2003;1:85–90.
38. Medeiros R, et al. Metabolic susceptibility genes and prostate cancer risk in a southern European population: the role of glutathione S-transferases GSTM1, GSTM3, and GSTT1 genetic polymorphisms. *Prostate* 2004;58:414–420.
39. Craveiro R, et al. TP53 alterations in cervical carcinoma. *Cancer Genet Cytogenet* 2004;150:116–121.
40. Coelho A, et al. Protective role of the polymorphism CCR2-64I in the progression from squamous intraepithelial lesions to invasive cervical carcinoma. *Cancer Lett* 2005;96:760–764.
41. Santos AM, et al. TP53 codon 72 polymorphism and risk for cervical cancer in Portugal. *Cancer Genet Cytogenet* 2005;99:143–147.
42. Duarte I, et al. G-308A TNF-alpha polymorphism is associated with an increased risk of invasive cervical cancer. *Biochem Biophys Res Commun* 2005;334:588–592.



# Linkage of *TP53* codon 72 pro/pro genotype as predictive factor for nasopharyngeal carcinoma development

Hugo Sousa<sup>a,\*</sup>, Alexandra M. Santos<sup>a,\*</sup>, Raquel Catarino<sup>a</sup>, Daniela Pinto<sup>a</sup>, André Vasconcelos<sup>a</sup>, Carlos Lopes<sup>a</sup>, Eduardo Breda<sup>b</sup> and Rui Medeiros<sup>c</sup>

Genetic predisposition has been suggested as a cofactor for cancer aetiology and a polymorphism in *TP53* codon 72 has been associated as a susceptibility factor for several cancers. Nasopharyngeal carcinoma is a rare neoplasia in western civilizations and genetic predisposition might play an important role in its development. We evaluated the linkage of the polymorphic variants (Arg/Pro) on *TP53* codon 72 with nasopharyngeal cancer development in a case-control study with 392 individuals from a northern Portuguese population, including 107 patients with nasopharyngeal carcinoma and 285 healthy controls. This study revealed a three-fold risk for carriers of Pro/Pro genotype either against carriers of Arg/Arg (OR=2.62; 95% CI=1.10–6.30;  $P=0.016$ ) or total Arg carriers (OR=2.67; 95% CI=1.21–5.90;  $P=0.012$ ). Moreover, step-wise logistic regression analysis identified Pro/Pro genotype (OR=3.1; 95% CI=1.3–7.3;  $P=0.009$ ), age >49 at diagnosis (OR=2.5; 95% CI=1.6–4.0;  $P<0.001$ ) and male gender (OR=2.7; 95% CI=1.6–4.4;  $P<0.001$ ) as predictive factors for the development of nasopharyngeal carcinoma. These results confirm the data from Asiatic populations suggesting that Pro/Pro genotype represents a stable risk factor for nasopharyngeal carcinoma

## Introduction

Nasopharyngeal carcinoma (NPC) is a rare malignancy in western countries but extremely common in south-east Asia, particularly in China, with an incidence of 20–30/100 000 (Murray and Young, 2001; Yu and Yuan, 2002). The latest official data from 1995 points to an incidence of 0.5/100 000 cases of NPC in the northern region of Portugal (Bento, 1995).

The major causal factor of NPC is the infection by a group I carcinogenic agent, the Epstein-Barr virus (EBV), one of the most common human viruses that occur worldwide (Liebowitz, 1994; Klein, 1998). Several studies suggest that EBV infection is necessary but not sufficient for NPC development (Yu, 1991; Raab-Traub, 2002). Genetic predisposition and environmental carcinogen factors are thought to be important in the aetiology of NPC (Yu, 1991; Zheng *et al.*, 1994; Yu and Yuan, 2002).

development in Portugal and that *TP53* codon 72 polymorphism can contribute as a genetic susceptibility marker, providing additional information to improve the knowledge about nasopharyngeal carcinoma aetiology. *European Journal of Cancer Prevention* 15:362–366 © 2006 Lippincott Williams & Wilkins.

*European Journal of Cancer Prevention* 2006, 15:362–366

**Keywords:** allele-specific-polymerase chain reaction, Epstein-Barr virus, nasopharyngeal carcinoma, *TP53* codon 72 polymorphism

<sup>a</sup>Molecular Oncology Unit, <sup>b</sup>Otorrinolaryngology Service, Portuguese Institute of Oncology – Oporto, Rua Dr António Bernardino Almeida, Porto, Portugal and <sup>c</sup>Abel Salazar Institute for the Biomedical Sciences, Porto, Portugal

Correspondence to Professor Rui Medeiros, Grupo de Oncologia e Patologia Molecular, Laboratórios 4 Piso, Instituto Português de Oncologia Francisco Gentil – CROP, Rua Dr António Bernardino Almeida, 4200-072 Porto, Portugal Tel: +351 22 508 4000 (ext 5414); fax: +351 22 508 4001; e-mail: ruimedei@ipoporto.min-saude.pt

We gratefully acknowledge funding of this work by the Minister of Health of Portugal (CFICS-261/99). The authors would like to thank Liga Portuguesa Contra o Cancro-Norte (Portuguese League Against Cancer) for their support.

Received 24 May 2005 Accepted 16 August 2005

The *TP53* tumour suppressor gene encodes the p53 protein, which has been described as modified in 50–55% of cancer cases (Hollstein *et al.*, 1991). p53 has a critical function in cell cycle regulation, and in case of mutation this regulation can be lost, leading to cell proliferation without control and to the development of cancer (Vogelstein and Kinzler, 1992). The literature suggests that viral proteins can inactivate p53 through the ubiquitin pathway and also that polymorphisms on *TP53* can explain individual differences in cancer development, as well as different susceptibilities to viral infections and related carcinogenesis (Nuber *et al.*, 1998; Cooper *et al.*, 2003; Scheffner and Whitaker, 2003).

A polymorphism on codon 72 within *TP53* has been reported, which encodes two distinct functional allelic forms arginine (Arg) and proline (Pro) because of a transversion G→C (Matlashewski *et al.*, 1987; Ara *et al.*, 1990). This polymorphism has been proposed as a genetic susceptibility factor in the development of several cancers (Birgander *et al.*, 1995 1996; Sjalander *et al.*, 1995a, 1996; Storey *et al.*, 1998; Yu *et al.*, 1999; Kawaguchi

\*These authors participated equally in the study.

*et al.*, 2000; Sourvinos *et al.*, 2001; Soultzizis *et al.*, 2002). It was demonstrated that the Arg p53 form has increased susceptibility to proteolysis leading to a decreased regulation of the cell cycle, and thus to its uncontrolled proliferation (Scheffner and Whitaker, 2003; Tommasino *et al.*, 2003).

Controversial studies regarding the role of p53 on NPC development have been reported (Effert *et al.*, 1992; Spruck III *et al.*, 1992; Niedobitek *et al.*, 1993; Porter *et al.*, 1994; Sheu *et al.*, 1995; Van Tornout *et al.*, 1997; Burgos, 2003). Although it is known that some EBV proteins can interact with p53, its mechanism remains unknown (Nasrin *et al.*, 1994; Chen and Cooper, 1996; Fries *et al.*, 1996). The Pro variant of *TP53* polymorphism has been described as associated with a higher susceptibility of development of NPC in Asian and European populations (Birgander *et al.*, 1996; Golovleva *et al.*, 1997; Tsai *et al.*, 2002; Tiwawech *et al.*, 2003).

The aim of our study was to investigate the role of this *TP53* polymorphism in the development of NPC cases from Portugal, a low-risk southern European population.

## Materials and methods

### Study participants

We evaluated the allelic distribution of the *TP53* codon 72 polymorphism in a case-control study with 392 peripheral blood samples. Samples were collected from 107 patients with NPC (median age  $49 \pm 14$ ), 72 of which were from men (median age  $49 \pm 14$ ) and 35 from women (median age  $46 \pm 15$ ), and 285 healthy controls (median age  $56 \pm 15$ ), 140 of which were from men (median age  $60 \pm 16$ ) and 145 from women (median age  $52 \pm 15$ ).

The samples from patients with NPC were stratified according to the histological and clinical grade of the patients. From the 107 samples, 94 were classified according to the histological grade, on which one was differentiated NPC (DNPC), 11 were moderated DNPC (MDNPC) and 82 were undifferentiated NPC (UNPC). According to the clinical grade and taking into consideration the TNM staging, 93 samples were stratified as follows: stage I ( $n = 2$ ), II ( $n = 12$ ), III ( $n = 26$ ) and IV ( $n = 53$ ). All samples were collected at the Portuguese Institute of Oncology-Porto, from Caucasian individuals from the northern region of Portugal.

### DNA extraction

Genomic DNA was extracted from the white blood cell fraction of each case, using the salting out method described by Mullenbach *et al.* (1989).

### Analysis of *TP53* codon 72 polymorphism

All samples were submitted for analysis of the presence of the Arg (CGC) and Pro (CCC) alleles on *TP53* codon 72,

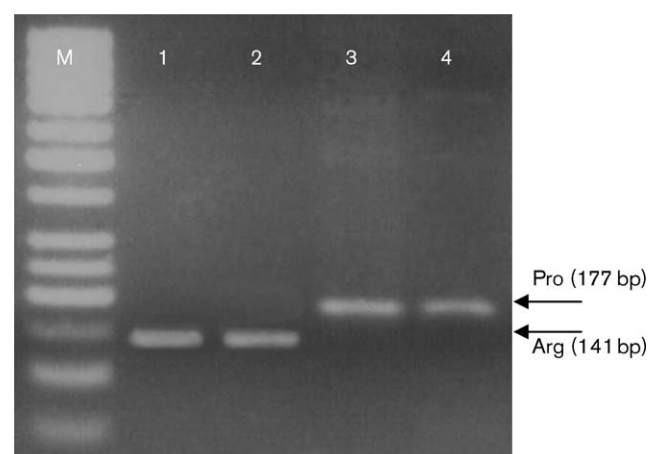
using allele-specific-polymerase chain reaction (AS-PCR) as described by Storey *et al.* (1998). The primer sequences used in the PCR reaction for each allele were as follows: ARG (5'-CTGGTGCAGGGGCCACGC-3') and TP53+ (5'-TCCCCCTTGCCGTCCCAA-3') for the Arg allele and PRO+ (5'-GCCAGAGGCTGCTCCC-3') and TP53- (5'-CGTGCAAGTCACAGACTT-3') for the Pro allele.

AS-PCR reactions were performed in a 50  $\mu$ l total volume containing  $1 \times$  *Taq* buffer, 1.5 mmol/l of  $MgCl_2$ , 0.2 mmol/l of dNTPs, 0.25  $\mu$ mol/l from each primer and 1 U *Taq* DNA polymerase. Amplifications were performed using the following cycling parameters: 95°C for 5 min for *Taq* DNA polymerase activation, followed by 45 cycles of denaturation for 60 s at 94°C, annealing at 60/55°C (Arg or Pro allele, respectively) for 45 s, extension for 60 s at 72°C and a final extension step at 72°C for 5 min. The PCR products obtained generate a 141 base pair (bp) fragment for the Arg allele and a 177 bp fragment for the Pro allele, which were analysed by electrophoresis in a 1.5% agarose gel stained with ethidium bromide (Fig. 1).

### Statistical analysis

Statistical analysis methods were used in order to evaluate the associated risk for NPC development with the frequency of the three genotypes on *TP53* codon 72 polymorphism. Data analysis was performed with computer software SPSS for Windows (version 11.5). A 5% level of significance was used in the  $\chi^2$  analysis to compare the categorical variables. The association between the *TP53* genotypes was correlated with gender, age of onset, histological data and clinical stage. The risk of NPC development was measured by calculating the respective odds ratio (OR) and its 95% confidence

Fig. 1



Analysis of the *TP53* codon 72 polymorphism of the allele-specific-polymerase chain reaction products: M – 50 bp DNA ladder; 1 and 2 – *TP53* Arg allele (141 bp); 3 and 4 – *TP53* Pro allele (177 bp).

interval (CI) for the association with *TP53* codon 72 polymorphism.

## Results

The analyses of the distribution of the three genotypes on *TP53* codon 72 revealed that in the 107 cases, 57.9% were Arg/Arg, 30.0% were Arg/Pro and 12.1% Pro/Pro, and among the 285 controls we found 62.5, 32.6 and 4.9%, respectively (Table 1).

Statistical differences were found when considering the association between Pro/Pro genotype and risk of development of NPC. This study revealed a three-fold increased risk for carriers of Pro/Pro genotype, when compared with either carriers of Arg/Arg genotype (OR = 2.62; 95% CI = 1.1–6.3;  $P = 0.016$ ) or total Arg carriers (OR = 2.67; 95% CI = 1.21–5.90;  $P = 0.012$ ) (Table 1). No significant associations were found between Pro/Pro genotype and age of onset (median age of cases), gender, histological data and clinical stage (Table 2).

**Table 1 Association of *TP53* codon 72 genotypes with NPC**

	Cases		Controls		<i>P</i>	OR	95% CI
	<i>N</i>	%	<i>n</i>	%			
Genotypes	107		285				
AA	62	57.9	178	62.5	0.910	1.00	Reference
AP	32	30.0	93	32.6		0.97	0.58–1.64
PP	13	12.1	14	4.9	0.016	2.62	1.10–6.30
AA/AP	94	87.9	271	95.1		1.00	Reference
PP	13	12.1	14	4.9	0.012	2.67	1.21–5.90

AA, Arg/Arg genotype; AP, Arg/Pro genotype; P/P, Pro/Pro genotype; AA/AP, Arg Carriers; *P*, Pearson's  $\chi^2$ ; OR, odds ratio; CI, confidence interval; NPC, nasopharyngeal carcinoma.

**Table 2 Association of *TP53* codon 72 genotypes with clinicopathological parameters in NPC patients**

	<i>N</i>	AA/AP		PP		<i>P</i>
		<i>n</i>	%	<i>n</i>	%	
Age of onset <sup>a</sup>	107					
≤ 49	58	50	86.2	8	13.8	0.571
> 49	49	44	89.8	5	10.2	
Gender	107					
Women	35	31	88.6	4	11.4	0.558
Men	72	63	87.5	9	12.5	
Histological data	94					
DNPC+MDNPC	12	10	83.3	2	16.7	0.468
UNPC	82	74	90.2	8	9.8	
Clinical stage	93					
I+II	14	14	100.0	0	0.0	0.184
III+IV	79	70	88.6	9	11.4	

AA/AP, Arg carriers; P/P, Pro/Pro genotype; DNPC, differentiated nasopharyngeal cancer; MDNPC, moderated DNPC; UNPC, undifferentiated nasopharyngeal cancer; *P*, Pearson's  $\chi^2$ ; NPC, nasopharyngeal carcinoma.

<sup>a</sup>Median age of cases.

**Table 3 Multivariate logistic regression analyses to identify predictive factors of nasopharyngeal cancer (NPC) development**

	<i>P</i> <sup>a</sup>	OR	95% CI
Pro/Pro genotype (reference Arg carrier)	0.009	3.1	1.3–7.3
Age > 49	< 0.001	2.5	1.6–4.0
Male gender	< 0.001	2.7	1.6–4.4

*P*–*P*, Pearson's  $\chi^2$ ; OR, odds ratio; CI, confidence interval.

<sup>a</sup>Forward step-wise routine including Pro/Pro genotype, age at diagnosis and male gender.

We used step-wise logistic regression analyses to identify predictive factors of nasopharyngeal cancer development, including Pro/Pro genotype, age at diagnosis and gender (Table 3). These data suggest that all three factors represent increased susceptibility to NPC development: OR = 3.1 for Pro/Pro genotype ( $P = 0.009$ ; 95% CI = 1.3–7.3); OR = 2.5 for age > 49 ( $P < 0.001$ ; 95% CI = 1.6–4.0); OR = 2.7 for male gender ( $P < 0.001$ ; 95% CI = 1.6–4.4).

## Discussion

Globally, NPC is quite a rare neoplasia on a world scale (65 000 new cases per year) (Stewart and Kleihues, 2003), but has a very distinctive geographical location as it occurs at higher rates among Chinese populations than among Caucasians (Yu and Yuan, 2002; Spano *et al.*, 2003). Some risk factors have been associated with the development of NPC, such as EBV infection, tobacco smoking and alcohol intake, occupational exposure to wood dust or formaldehyde and consumption of salted foods (Yu, 1991; Zheng *et al.*, 1994). Moreover, individual genetic polymorphisms have also been studied and described as an associated risk factor for the development of NPC (Tiwawech *et al.*, 2003) and other human cancers (Costa *et al.*, 2002; Medeiros *et al.*, 2004a,b). Although NPC incidence rates have been increasing in several countries all around the world, including Portugal, there is a lack of information and significant results on the susceptibility to NPC development.

As p53 is highly important to cell cycle regulation, its study has a fundamental role, because altered function could lead to the development of cancer as a consequence of uncontrolled cell proliferation (Hollstein *et al.*, 1991; Pim and Banks, 2004). Two distinct forms described on *TP53* codon 72 encoded by a single modification from CGC (Arg) to CCC (Pro) exist, which reveal different biochemical and biological protein features (Thomas *et al.*, 1999; Pim and Banks, 2004).

Previous work investigating the significance of *TP53* codon 72 genotypes in nasopharyngeal carcinogenesis is less. In other types of neoplasia, homozygosity for the arginine form is described as associated with increased susceptibility to cancer development (Hildesheim *et al.*, 1998; Storey *et al.*, 1998; Zehbe *et al.*, 1999; Soultziz *et al.*,

2002). Subsequent reports, however, are becoming controversial (Rosenthal *et al.*, 1998; Sousa *et al.*, 2005), and more reports are needed to support knowledge of the role of TP53 codon 72 genotypes and cancer development worldwide, or on the same geographical area. Sjalander *et al.* (1995b) reported that TP53 alleles were correlated with latitude, showing distinct ethnic heterogeneity among populations, namely Caucasians (Swedes). In the northern region of Portugal, however, this polymorphism does not seem to be related to higher susceptibility in cervical cancer (Sousa *et al.*, 2005) and, up to now, the TP53 codon 72 polymorphism was not studied on NPC carcinogenesis in a Portuguese population.

The present study indicates that besides having a higher percentage of the Arg/Arg genotype among cases and controls, Pro/Pro genotype was found to have increased risk for the development of NPC either against carriers of Arg/Arg genotype (OR = 2.62; 95% CI = 1.10–6.30;  $P = 0.016$ ) or total Arg carriers (OR = 2.67; 95% CI = 1.21–5.90;  $P = 0.012$ ) (Table 1). The complete analysis of clinicopathological parameters revealed no association with TP53 codon 72 Pro/Pro genotype (Table 2). These data suggest that this polymorphism represents a risk factor for the development of NPC.

Age is a common risk factor of cancer development, and in this case the logistic regression analysis revealed that age > 49 years at diagnosis represents an increased risk of 2.5 fold (95% CI = 1.6–4.0;  $P < 0.001$ ) when associated with TP53 codon 72 Pro homozygous. Moreover, as NPC occurs more frequently in men (Spano *et al.*, 2003), our data correlate with results from previous studies as male gender represents a risk factor of NPC development (OR = 2.7; 95% CI = 1.6–4.4;  $P < 0.001$ ) (Table 3). Clearly, as the men-to-women ratio occurrence is described as 5 to 1 (Birgander *et al.*, 1996), this was the reason why our study considered men and women patients with NPC differently. Nonetheless, this study would require a larger number of samples to support the differences between genders on this TP53 polymorphism.

Functionally, the two allelic variants of this polymorphism are different and the Pro variant is described as inducing apoptosis with lower kinetics than the Arg variant, suppressing transformation of primary cells with less efficiency (Brooks *et al.*, 2000; Pim and Banks, 2004). This is probably the reason why the Pro/Pro genotype seems to be more prone to develop NPC (Tsai *et al.*, 2002; Tiwawech *et al.*, 2003). Additionally, this variant is reported as a susceptibility factor for the development of bladder cancer (Chen and Tsai, 2000), colorectal cancer (Lung *et al.*, 2004) and lung adenocarcinoma (Fan *et al.*, 2000). Furthermore, as studies emphasize that the Arg/Arg genotype seems to confer higher risk for the development of cervical (Hildesheim *et al.*, 1998; Storey *et al.*, 1998; Tommasino *et al.*, 2003; Koushik *et al.*, 2004),

bladder (Soulitzis *et al.*, 2002) and breast cancers (Papadakis *et al.*, 2000), the role of this polymorphism in the different neoplasias is still controversial.

The present study reveals the first data about the role of this polymorphism in NPC development within western civilizations. These results also corroborate the previous studies in Asiatic populations (Tsai *et al.*, 2002; Tiwawech *et al.*, 2003), confirming that Pro/Pro genotype on TP53 codon 72 remains stable as an increased risk factor independently of being an Asiatic or Caucasian population. Furthermore, our results suggest that this TP53 polymorphism may be important in the definition of the genetic susceptibility profile for NPC and also that age of onset of > 49 and male gender represent a cumulative risk for NPC development. The clinicopathological data analysis points out that this polymorphism does not seem to be related with tumour progression. This study revealed to be extremely important within the Portuguese population, but further studies may help to understand the role of this polymorphism in the behaviour and prognosis of this neoplasia.

## References

- Ara S, Lee PS, Hansen MF, Saya H (1990). Codon 72 polymorphism of the TP53 gene. *Nucleic Acids Res* **18**:4961.
- Bento MJ (1995). Roreno-Registo Oncológico Regional do Norte. IPO Centro do Porto, 13.
- Birgander R, Sjalander A, Rannug A, Alexandrie AK, Sundberg MI, Seidegard J, *et al.* (1995). P53 polymorphisms and haplotypes in lung cancer. *Carcinogenesis* **16**:2233–2236.
- Birgander R, Sjalander A, Zhou Z, Fan C, Beckman L, Beckman G (1996). p53 polymorphisms and haplotypes in nasopharyngeal cancer. *Hum Hered* **46**:49–54.
- Brooks LA, Tidy JA, Gusterson B, Hiller L, O'Nions J, Gasco M, *et al.* (2000). Preferential retention of codon 72 arginine p53 in squamous cell carcinomas of the vulva occurs in cancers positive and negative for human papillomavirus. *Cancer Res* **60**:6875–6877.
- Burgos JS (2003). Absence of p53 alterations in nasopharyngeal carcinoma Spanish patients with Epstein–Barr virus infection. *Virus Genes* **27**: 263–268.
- Chen W, Cooper NR (1996). Epstein–Barr virus nuclear antigen 2 and latent membrane protein independently transactivate p53 through induction of NF-kappaB activity. *J Virol* **70**:4849–4853.
- Chen WC, Tsai FJ, Wu JY, Wu HC, Lu HF, Li CW (2000). Distributions of p53 codon 72 polymorphism in bladder cancer: proline form is prominent in invasive tumor. *Urol Res* **28**:293–296.
- Cooper B, Schneider S, Bohl J, Jiang Y, Beudet A, Vande PS (2003). Requirement of E6AP and the features of human papillomavirus E6 necessary to support degradation of p53. *Virology* **306**:87–99.
- Costa S, Medeiros R, Vasconcelos A, Pinto D, Lopes C (2002). A slow acetylator genotype associated with an increased risk of advanced cervical cancer. *J Cancer Res Clin Oncol* **128**:678–682.
- Effert P, McCoy R, bdel-Hamid M, Flynn K, Zhang Q, Busson P, *et al.* (1992). Alterations of the p53 gene in nasopharyngeal carcinoma. *J Virol* **66**: 3768–3775.
- Fan R, Wu MT, Miller D, Wain JC, Kelsey KT, Wiencke JK, Christiani DC (2000). The p53 codon 72 polymorphism and lung cancer risk. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* **9**:1037–1042.
- Fries KL, Miller WE, Raab-Traub N (1996). Epstein–Barr virus latent membrane protein 1 blocks p53-mediated apoptosis through the induction of the A20 gene. *J Virol* **70**:8653–8659.
- Golovleva I, Birgander R, Sjalander A, Lundgren E, Beckman L (1997). Interferon-alpha and p53 alleles involved in nasopharyngeal carcinoma. *Carcinogenesis* **18**:645–647.
- Hildesheim A, Schiffman M, Brinton LA, Fraumeni JF Jr, Herrero R, Bratti MC, *et al.* (1998). p53 polymorphism and risk of cervical cancer. *Nature* **396**:531–532.

- Hollstein M, Sidransky D, Vogelstein B, Harris CC (1991). p53 mutations in human cancers. *Science* **253**:49–53.
- Kawaguchi H, Ohno S, Araki K, Miyazaki M, Saeki H, Watanabe M, et al. (2000). p53 polymorphism in human papillomavirus-associated esophageal cancer. *Cancer Res* **60**:2753–2755.
- Klein E (1998). The complexity of the Epstein–Barr virus infection in humans. *Pathol Oncol Res* **4**:3–7.
- Koushik A, Platt RW, Franco EL (2004). p53 codon 72 polymorphism and cervical neoplasia: a meta-analysis review. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* **13**:11–22.
- Liebowitz D (1994). Nasopharyngeal carcinoma: the Epstein–Barr virus association. *Semin Oncol* **21**:376–381.
- Lung FW, Lee TM, Shu BC, Chang FH (2004). p53 codon 72 polymorphism and susceptibility malignancy of colorectal cancer in Taiwan. *J Cancer Res Clin Oncol* **130**:728–732.
- Matlashewski GJ, Tuck S, Pim D, Lamb P, Schneider J, Crawford LV (1987). Primary structure polymorphism at amino acid residue 72 of human p53. *Mol Cell Biol* **7**:961–963.
- Medeiros R, Soares R, Vasconcelos A, Schmitt F, Lopes C (2004a). Glutathione S-transferase genotype GSTM1 as a predictor of elevated angiogenic phenotype in patients with early onset breast cancer. *Angiogenesis* **7**:53–58.
- Medeiros R, Vasconcelos A, Costa S, Pinto D, Ferreira P, Lobo F, et al. (2004b). Metabolic susceptibility genes and prostate cancer risk in a southern European population: the role of glutathione S-transferases GSTM1, GSTM3, and GSTT1 genetic polymorphisms. *Prostate* **58**:414–420.
- Mullenbach R, Lagoda PJ, Welter C (1989). An efficient salt-chloroform extraction of DNA from blood and tissues. *Trends Genet* **5**:391.
- Murray PG, Young LS (2001). Epstein–Barr virus infection: basis of malignancy and potential for therapy. *Expert Rev Mol Med* **2001**:1–20.
- Nasrin N, Taiba K, Hannan N, Hannan M, Al-Sedairy S (1994). A molecular study of EBV DNA and p53 mutations in nasopharyngeal carcinoma of Saudi Arab patients. *Cancer Lett* **82**:189–198.
- Niedobitek G, Agathangelou A, Barber P, Smallman LA, Jones EL, Young LS (1993). P53 overexpression and Epstein–Barr virus infection in undifferentiated and squamous cell nasopharyngeal carcinomas. *J Pathol* **170**:457–461.
- Nuber U, Schwarz SE, Scheffner M (1998). The ubiquitin-protein ligase E6-associated protein (E6-AP) serves as its own substrate. *Eur J Biochem* **254**:643–649.
- Papadakis EN, Dokianakis DN, Spandidos DA (2000). p53 codon 72 polymorphism as a risk factor in the development of breast cancer. *Mol Cell Biol Res Commun* **3**:389–392.
- Pim D, Banks L (2004). p53 polymorphic variants at codon 72 exert different effects on cell cycle progression. *Int J Cancer* **108**:196–199.
- Porter MJ, Field JK, Lee JC, Leung SF, Lo D, Van Hasselt CA (1994). Detection of the tumour suppressor gene p53 in nasopharyngeal carcinoma in Hong Kong Chinese. *Anticancer Res* **14**:1357–1360.
- Raab-Traub N (2002). Epstein–Barr virus in the pathogenesis of NPC. *Semin Cancer Biol* **12**:431–441.
- Rosenthal AN, Ryan A, Al-Jehani RM, Storey A, Harwood CA, Jacobs IJ (1998). p53 codon 72 polymorphism and risk of cervical cancer in UK. *Lancet* **352**:871–872.
- Scheffner M, Whitaker NJ (2003). Human papillomavirus-induced carcinogenesis and the ubiquitin-proteasome system. *Semin Cancer Biol* **13**:59–67.
- Sheu LF, Chen A, Tseng HH, Leu FJ, Lin JK, Ho KC, Meng CL (1995). Assessment of p53 expression in nasopharyngeal carcinoma. *Hum Pathol* **26**:380–386.
- Sjalander A, Birgander R, Athlin L, Stenling R, Rutegard J, Beckman L, Beckman G (1995a). p53 germ line haplotypes associated with increased risk for colorectal cancer. *Carcinogenesis* **16**:1461–1464.
- Sjalander A, Birgander R, Hallmans G, Cajander S, Lenner P, Athlin L, et al. (1996). p53 polymorphisms and haplotypes in breast cancer. *Carcinogenesis* **17**:1313–1316.
- Sjalander A, Birgander R, Kivela A, Beckman G (1995b). p53 polymorphisms and haplotypes in different ethnic groups. *Hum Hered* **45**:144–149.
- Soultz N, Sourvinos G, Dokianakis DN, Spandidos DA (2002). p53 codon 72 polymorphism and its association with bladder cancer. *Cancer Lett* **179**:175–183.
- Sourvinos G, Rizos E, Spandidos DA (2001). p53 Codon 72 polymorphism is linked to the development and not the progression of benign and malignant laryngeal tumours. *Oral Oncol* **37**:572–578.
- Sousa H, Santos AM, Catarino R, Pinto D, Pereira D, Vasconcelos A, et al. (2005). TP53 codon 72 polymorphism and risk for cervical cancer in Portugal. *Cancer Genet Cytogenet* **159**:143–147.
- Spano JP, Busson P, Atlan D, Bourhis J, Pignon JP, Esteban C, Armand JP (2003). Nasopharyngeal carcinomas: an update. *Eur J Cancer* **39**:2121–2135.
- Spruck CH III, Tsai YC, Huang DP, Yang AS, Rideout WM III, Gonzalez-Zulueta M, et al. (1992). Absence of p53 gene mutations in primary nasopharyngeal carcinomas. *Cancer Res* **52**:4787–4790.
- Stewart BW, Kleihues P (2003). *World Cancer Report*. Lyon: IARC Press.
- Storey A, Thomas M, Kalita A, Harwood C, Gardiol D, Mantovani F, et al. (1998). Role of a p53 polymorphism in the development of human papillomavirus-associated cancer. *Nature* **393**:229–234.
- Thomas M, Kalita A, Labrecque S, Pim D, Banks L, Matlashewski G (1999). Two polymorphic variants of wild-type p53 differ biochemically and biologically. *Mol Cell Biol* **19**:1092–1100.
- Tiwawech D, Srivatanakul P, Karaluk A, Ishida T (2003). The p53 codon 72 polymorphism in Thai nasopharyngeal carcinoma. *Cancer Lett* **198**:69–75.
- Tommasino M, Accardi R, Caldeira S, Dong W, Malanchi I, Smet A, Zehbe I (2003). The role of TP53 in Cervical carcinogenesis. *Hum Mutat* **21**:307–312.
- Tsai MH, Lin CD, Hsieh YY, Chang FC, Tsai FJ, Chen WC, Tsai CH (2002). Prognostic significance of the proline form of p53 codon 72 polymorphism in nasopharyngeal carcinoma. *Laryngoscope* **112**:116–119.
- Van Tornout JM, Spruck CH III, Shibata A, Schmutte C, Gonzalez-Zulueta M, Nichols PW, et al. (1997). Presence of p53 mutations in primary nasopharyngeal carcinoma (NPC) in non-Asians of Los Angeles, California, a low-risk population for NPC. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* **6**:493–497.
- Vogelstein B, Kinzler KW (1992). p53 function and dysfunction. *Cell* **70**:523–526.
- Yu MC (1991). Nasopharyngeal carcinoma: epidemiology and dietary factors. *IARC Sci Publ* **105**:39–47.
- Yu MC, Yuan JM (2002). Epidemiology of nasopharyngeal carcinoma. *Semin Cancer Biol* **12**:421–429.
- Yu MW, Yang SY, Chiu YH, Chiang YC, Liaw YF, Chen CJ (1999). A p53 genetic polymorphism as a modulator of hepatocellular carcinoma risk in relation to chronic liver disease, familial tendency, and cigarette smoking in hepatitis B carriers. *Hepatology* **29**:697–702.
- Zehbe I, Voglino G, Wilander E, Genta F, Tommasino M (1999). Codon 72 polymorphism of p53 and its association with cervical cancer. *Lancet* **354**:218–219.
- Zheng YM, Tuppin P, Hubert A, Jeannel D, Pan YJ, Zeng Y, de TG (1994). Environmental and dietary risk factors for nasopharyngeal carcinoma: a case-control study in Zangwu County, Guangxi, China. *Br J Cancer* **69**:508–514.



**ROLE OF IL-1RN VNTR POLYMORPHISM IN GENETIC SUSCEPTIBILITY TO VIRAL ASSOCIATED NEOPLASIAS**

Journal:	<i>Molecular Carcinogenesis</i>
Manuscript ID:	MC-10-0120
Wiley - Manuscript type:	Research Article
Date Submitted by the Author:	12-May-2010
Complete List of Authors:	Sousa, Hugo; IPO Porto FG EPE, Grupo de Oncologia Molecular, CI Breda, Eduardo; IPO Porto FG EPE Santos, Alexandra; IPO Porto FG EPE Catarino, Raquel; IPO Porto FG EPE Pinto, Daniela; IPO Porto FG EPE Moutinho, José; IPO Porto FG EPE Canedo, Paulo; IPATIMUP Machado, José Carlos; IPATIMUP Lopes, Carlos; ICBAS Medeiros, Rui; IPO Porto FG EPE; ICBAS
Keywords:	Viral Associated Neoplasia, Genetic Polymorphism, IL-1RN, Nasopharyngeal Carcinoma, Cervical Carcinoma



1  
2  
3 **ROLE OF IL-1RN VNTR POLYMORPHISM IN GENETIC SUSCEPTIBILITY**  
4  
5 **TO VIRAL ASSOCIATED NEOPLASIAS IN PORTUGAL**  
6  
7

8  
9  
10 Hugo Sousa<sup>1,2,3§</sup>, Eduardo Breda<sup>4</sup>, Alexandra M Santos<sup>1</sup>, Raquel Catarino<sup>1,3</sup>, Daniela  
11  
12 Pinto<sup>1,2</sup>, José Moutinho<sup>5</sup>, Paulo Canedo<sup>6,7</sup>, José Carlos Machado<sup>6,7</sup>, Carlos Lopes<sup>3</sup>, Rui  
13  
14 Medeiros<sup>1,2,3</sup>  
15

16  
17  
18  
19  
20 <sup>1</sup> Molecular Oncology Group, <sup>2</sup> Molecular Virology Laboratory of Virology Service, <sup>4</sup>  
21  
22 Otorrinolaryngology Service, <sup>5</sup> Gynaecological Service, Portuguese Institute of  
23  
24 Oncology of Porto, Porto, Portugal  
25

26  
27 <sup>3</sup> ICBAS, Abel Salazar Institute for the Biomedical Sciences, University of Porto, Porto,  
28  
29 Portugal  
30

31  
32 <sup>6</sup> Institute of Molecular Pathology and Immunology of University of Porto (IPATIMUP)  
33  
34 Porto, Portugal  
35

36  
37 <sup>7</sup> Faculty of Medicine of University of Porto, Porto, Portugal  
38

39 § Corresponding Author  
40  
41

42  
43 **Correspondence to:**  
44

45 Dr. Hugo Sousa  
46

47  
48 Grupo de Oncologia Molecular – CI, Laboratórios 4º Piso  
49

50 Instituto Português de Oncologia do Porto FG, EPE  
51

52 Rua Dr. António Bernardino Almeida  
53

54 4200-072 Porto, Portugal.  
55

56  
57 Phone: +351 22 508 4000 (ext 5410)  
58

59 Fax: +351 22 508 4001  
60

E-mail: [hugomls@gmail.com](mailto:hugomls@gmail.com)

**ABSTRACT (230 words)**

The balance between host immunity and viral infection is crucial for the prevention associated cancers. A common allele of the 86bp VNTR polymorphism within intron 2 of the IL-1 receptor antagonist (IL-1RN) gene seems to be responsible for shorter immune responses to viral infections, and therefore, oncogenic viruses can infect cells efficiently and transform them without an effective immune response.

A hospital based case-control study was developed to analyse the role of the 86bp VNTR within intron 2 of the IL-1RN gene on the development of cervical and nasopharyngeal carcinoma. The genetic analysis was performed in DNA extracted from peripheral blood samples from both healthy individuals (n=446), individuals with cervical lesions (n=346) and nasopharyngeal carcinoma (n=122) from the Northern Region of Portugal.

Our study revealed an increased frequency of the IL-1RN A2 allele in both patients with cervical and nasopharyngeal carcinoma. Statistical analysis revealed increased risk for both invasive cervical cancer ( $p=0.027$ ; OR=1.84) and undifferentiated type of nasopharyngeal carcinoma ( $p<0.001$ ; OR=3.73) with attributable proportions of 9.0% and 20.9% respectively.

The hypothesis that IL-1RN A2 allele is associated to increased predisposition to shorter immune responses that predispose the host to develop easily viral infections is corroborated in our Study. Moreover, this the first in Portugal to show that the IL-1RN A2 allele might have an important role in the development of viral associated neoplasias such as Nasopharyngeal Carcinoma and Cervical Carcinoma.



**ARTICLE (1865 words excluding references)****Introduction**

The role of immunologic factors is particularly evident in chronic infections with agents such as Human Papillomavirus (HPV) or Epstein-Barr Virus (EBV), where they can balance the equilibrium between host immunity and pathogenic infection. Moreover, recently it's been discussed that deficiencies in the immune response to the viral infection can play a role in the different individual susceptibility for the development of viral associated neoplasias [1-3]. Viral infections, normally, lead to severe reaction from the host immune system and recently several cytokines that modulate the immune response have been implicated in the development of cancer [3,4].

Upon viral infection, the major defense initiated by the host immune system is activation of inflammatory cytokines produced by monocytes, macrophages and epithelial cells, mainly the Interleukin 1 family (IL-1). IL-1 family combines potent proinflammatory cytokines, IL-1 alpha (IL-1 $\alpha$ ) and IL-1beta (IL-1 $\beta$ ), and its negative regulator with anti-inflammatory effect, the IL-1 receptor antagonist (IL-1RN) [4-8].

The IL-1RN competes with the IL-1 $\alpha$  and IL-1 $\beta$  for the IL1 cell receptor managing inflammatory signals [4,8-11]. When expressed this cytokine avoids the connection of IL1s to their cell receptor, stopping the transmission of pro-inflammatory signals, which in case of a severe and prolonged inflammatory response will avoid cellular damages [5-7,9-13]. IL-1RN levels can be used to follow the immune response, since its levels increase during the final steps of inflammatory response silencing it [14]. A few studies have suggested a polymorphism based on a 86bp Variable Number of Tandem Repeats (VNTR) within intron 2 of the *IL-1RN* gene, which varies from 2 to 6 copies [15-17]. IL-1RN alleles 1 and 2 are extremely more frequent than the other alleles which occur at a combined frequency of <5% [4] and IL-1RN 2 allele seems to be associated with

1  
2  
3 increased risk of several cancers, such as gastric [16,18-21], esophageal [22], colorectal  
4 [23,24], lung [25], gallbladder [26], bladder [27] and cervical carcinomas [4,28]. These  
5  
6 studies suggest that the circulating levels of IL-1RN are higher in the presence of the  
7  
8 short allele IL-1RN\*2 being responsible for a shorter immune response to viral  
9  
10 infections and thus might be associated with the development of viral associated  
11  
12 neoplasias [11,15,29].  
13  
14  
15

16  
17 Considering the influence of host immune resistance/response to viral infections as  
18  
19 extremely important in the prevention of viral associated neoplasia, we designed a  
20  
21 cross-sectional study to characterize the role IL1RN VNTR polymorphism in viral  
22  
23 associated neoplasias in Portugal.  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

## Materials and Methods

### *Type of Study, cases and specimens*

In this study, it was develop a hospital-based case control study considering patients with diagnosed cervical intraepithelial lesions or invasive cervical carcinoma, nasopharyngeal carcinoma and healthy individuals without evidence of neoplastic disease, collected from Caucasian individuals from the northern region of Portugal which gave their informed consent according to the Declaration of Helsinki.

### *Healthy controls*

The control group consisted of 446 healthy individuals, including 242 males and 204 females, with median age of 41 years old (mean age 42.2; standard deviation 15.2), collected at Institute of Molecular Pathology and Immunology of University of Porto (IPATIMUP).

### *Cervical lesions*

The patient group with cervical lesions including invasive cervical carcinoma consisted in a total of 346 women with median age of 46 years old (mean age 46.7; standard deviation 12.8) attended at the Gynaecologic Oncology Department from the Portuguese Institute of Oncology of Porto between 1996 and 2003. Patients were further classified according to histological data: 28 patients with histological confirmed Low Grade Squamous Intraepithelial Lesions (LSIL); 90 with High Grade SIL (HSIL); and 228 patients with invasive cervical cancer (ICC).

### *Nasopharyngeal carcinoma*

Patients with histological confirmed NPC consisted of 122 individuals (35 women and 87 men) with median age of 49 years old (mean age 48.0; standard deviation 14.3) attended at the Otorrinolaryngology Department from the Portuguese Institute of Oncology of Porto. Histological grade was determined according to the *World Health Organization* (WHO) classification: 13 Type I or II (Well or Moderate Differentiated NPC – MDNPC) and 109 Type III (Undifferentiated NPC – UNPC).

## **Procedures**

### ***Sample Collection and DNA extraction***

Peripheral blood samples were collected following standard venipuncture technique in EDTA-containing tubes, and the DNA was extracted from the white blood cell fraction using a Salting Out protocol [30].

### ***Analysis of IL-1RN VNTR polymorphism***

The analysis of the *IL-1RN* Variable Number Tandem Repeats (VNTR) polymorphism located within intron 2 was performed by Polymerase Chain Reaction (PCR) as previously described [16]. The reaction was performed with IL-1RN\_F (5'-CCCCTCAGCAACTCC-3') and IL-1RN\_R (5'-GGTCAGAAGGGCAGAG-3') primers in a 50µL volume PCR reaction including: 1x Taq Buffer, 2.0mM of MgCl<sub>2</sub>, 0.4mM of dNTPs, 0.30µM from each primer and 1U Taq DNA Polymerase. The cycling parameters were as follow: 94°C for 4min for Taq DNA Polymerase activation, followed by 35 cycles of denaturation for 30s at 94°C, annealing for 30s 57°C and extension for 60s at 72°C; and a final extension step at 72°C for 5min.

1  
2  
3 PCR amplification identifies the following products: 410bp (allele 1), 240bp (allele 2),  
4  
5 325bp (allele 3), 500bp (allele 4) and 595bp (allele 5) (Table I); which were analyzed by  
6  
7 electrophoresis in a 3% Agarose gel (Cambrex Bio Science Rockland Inc, USA) stained  
8  
9 with 5% ethidium bromide – Figure 1.  
10  
11

### 12 13 14 15 16 **Statistical Analysis**

17  
18 Statistical analysis was performed with the computer software Epi Info (version 6.04)  
19  
20 and SPSS (Statistical Package for Social Sciences version 16.0) for Windows. The Chi-  
21  
22 square ( $\chi^2$ ) analysis to compare the categorical variables with a 5% significance level,  
23  
24 using the odds ratio (OR) and its 95% Confidence Interval (CI) was used as a measure  
25  
26 of the association between the genotypes and the risk of developing of cancer. Fisher's  
27  
28 Exact Test was used for tables containing cells where values are less than 5 individuals.  
29  
30 We have also calculated the attributable proportion (AP) given by the following  
31  
32 formula:  $AP = PRF \times (1 - 1/OR)$  (PRF, percentage of risk factor; OR, odds ratio) which  
33  
34 represents the proportion of cases that can be imputed to the influence of a particular  
35  
36 factor.  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

## RESULTS

The analysis of both polymorphisms was carried without the knowledge of clinical information from both patients with cervical lesions or nasopharyngeal carcinoma. The distribution of the *IL-1RN* VNTR polymorphism genotypes among controls and patients is shown on Table II and III.

From the 340 cases with cervical lesions/cancer, 19.7% were homozygous for the Allele 2 (A2\*A2) and in controls the frequency of this genotype was only 11.9%. Ours study reveals an increased frequency of Allele 2 homozygous in patients group than in controls, which was proved by statistical analysis ( $p=0.018$ ). When stratifying the patients according to the histological data, we observed that there were no statistical significant differences between controls and patients with LSIL or HSIL. Nevertheless, it was possible to observe an almost 2-fold increased risk for the development of invasive cervical cancer ( $p=0.027$ ; OR=1.84), and the risk was the same if we taken together HSIL and ICC ( $p=0.018$ ; OR=1.84). The attributable proportion (AP) of cases due to the influence of this polymorphism was calculates as 10.8%, 9.0% and 9.1% for cervical lesions, cervical cancer and cases with lesion more severe than high-grade, respectively.

In NPC patients we observed that 31.0% were Allele 2 homozygous, compared with 9.7% observed in the control group, revealing an increased risk of over 4-folds for the development of NPC ( $p<0.001$ ) and an increased risk of almost 4-fold ( $p<0.001$ ) if we considered only the UNPC type. Moreover, the AP for the development of NPC and UNPC was of 23.6% and 20.9% respectively.

## DISCUSSION

The association of EBV with the development of NPC has been proved for the past years, and it is consistent through several studies. We know that genetic alterations are supposed to play important roles in the definition of host factors that may influence the susceptibility to a viral infection or to cancer development [31,32]. Moreover, there are several genetic polymorphism that reinforce the need of further studies to establish the role of genetic background on viral associated neoplasia development [33-35].

The genetic background of the host is thought to play an important role on the immune response, and it is even more important in the presence of persistent infections. Oncogenic viruses such as EBV and HPV have the ability to regulate the host immune response by silencing antigen presentation and by activating proliferation pathways that allow them to resist to effective immune responses.

The Interleukin 1 Receptor Antagonist (IL-1RN) is extremely important on the regulation of inflammatory signals of the host immunologic response [10,13]. Usually it avoids the binding of the different IL1s to their cell receptor, silencing the transmission of pro-inflammatory signals that in case of a severe and prolonged inflammatory response cause cellular damages contributing, therefore, for the protection of cells [9,12]. Although, it has also been suggested that when overexpressed IL-1RN might increase cellular vulnerability to viral infections, as it stops the immune response [9,12]. Several studies have suggested that a VNTR polymorphism within the *IL-1RN* gene is associated with increased circulating levels, shorter immune responses and therefore to increase risk of viral infections [13].

Upon the establishment of a viral infection, the host starts to produce pro-inflammatory signals to fight the infection, although, when the antigen presentation is reduced, these

1  
2  
3 signals start to shut down to avoid damaging cells. The shorter allele of the IL-1RN (IL-  
4 1RN\*2) has been associated a shorter immune response to viral infections [11,15]. Our  
5  
6 results are in agreement with these findings, reporting that the homozygosis for the IL-  
7  
8 1RN\*2 allele represents a significant risk marker for both cervical and nasopharyngeal  
9  
10 cancer development.  
11  
12

13  
14  
15 Regarding the role of this polymorphism on cervical cancer development, this study  
16  
17 reveals a significant increased frequency of IL-1RN\*2 allele homozygosis in all  
18  
19 patients, including patients with LSIL or HSIL. The fact that we have not found  
20  
21 statistical significant results in patients with LSIL or HSIL might be due to the reduced  
22  
23 number of samples when compared with the group of controls. Therefore, we think that  
24  
25 with higher number of patients with LSIL or HSIL, the results would be the same as for  
26  
27 ICC, as the infection by HPV is considered to be the key initiation process and  
28  
29 therefore, the host immune response is crucial in the early steps of this cancer. In the  
30  
31 case of NPC development, we observed in either all NPC cases or only UNPC an  
32  
33 extremely increased risk.  
34  
35  
36  
37

38  
39 Nevertheless, these results are important to confirm that the VNTR *IL-1RN*  
40  
41 polymorphism can be a genetic susceptibility risk marker for the development of viral  
42  
43 associated neoplasia. Moreover, it contributes for the clarification of the role of this  
44  
45 polymorphism on the establishment of a viral infection, and not only in the persistence  
46  
47 of the virus. Since EBV and HPV have frequent reactivations of lytic replications, the  
48  
49 genetic predisposition to shorter immune responses will predispose the host to develop  
50  
51 easily a viral infection. Therefore, oncogenic viruses can infect efficiently cells and will  
52  
53 be able to transform them without a efficient immune response from the host.  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60



### Acknowledgments

Authors are grateful to the Portuguese League Against Cancer (Liga Portuguesa Contra o Cancro – Núcleo Regional do Norte and also for the financial support of individual grant for Doctoral degree of the first author by the Minister of Science, Technology and Superior Education – FCT (Fundação para a Ciência e Tecnologia: SFRH/BD/40718/2007). We also gratefully acknowledge the support of this work by the Ministry of Health of Portugal (CFICS – 32/2007).

For Peer Review

## REFERENCES

1. Beck A, Pazolt D, Grabenbauer GG, Nicholls JM, Herbst H, Young LS *et al.*: Expression of cytokine and chemokine genes in Epstein-Barr virus-associated nasopharyngeal carcinoma: comparison with Hodgkin's disease. *J Pathol* 2001, 194: 145-151.
2. Cavallo MG, Baroni MG, Toto A, Gearing AJ, Forsey T, Andreani D *et al.*: Viral infection induces cytokine release by beta islet cells. *Immunology* 1992, 75: 664-668.
3. Cavallo R, Cavallo F, Cavallo G: [The role of cytokines in viral infections]. *G Bacteriol Virol Immunol* 1994, 86: 65-78.
4. Singh H, Sachan R, Goel H, Mittal B: Genetic variants of interleukin-1RN and interleukin-1beta genes and risk of cervical cancer. *BJOG* 2008, 115: 633-638.
5. Dinarello CA: The interleukin-1 family: 10 years of discovery. *FASEB J* 1994, 8: 1314-1325.
6. Dinarello CA: Interleukin-1 in disease. *Keio J Med* 1994, 43: 131-136.
7. Dinarello CA: Biologic basis for interleukin-1 in disease. *Blood* 1996, 87: 2095-2147.
8. Arend WP, Malyak M, Guthridge CJ, Gabay C: Interleukin-1 receptor antagonist: role in biology. *Annu Rev Immunol* 1998, 16: 27-55.
9. Granowitz EV, Clark BD, Mancilla J, Dinarello CA: Interleukin-1 receptor antagonist competitively inhibits the binding of interleukin-1 to the type II interleukin-1 receptor. *J Biol Chem* 1991, 266: 14147-14150.
10. Hurme M, Santtila S: IL-1 receptor antagonist (IL-1Ra) plasma levels are coordinately regulated by both IL-1Ra and IL-1beta genes. *Eur J Immunol* 1998, 28: 2598-2602.
11. Witkin SS, Linhares IM, Gerber S, Caetano ME, Segurado AC: Interleukin-1 receptor antagonist gene polymorphism and circulating levels of human immunodeficiency virus type 1 RNA in Brazilian women. *J Virol* 2001, 75: 6242-6244.
12. Dinarello CA: Interleukin-1 and interleukin-1 antagonism. *Blood* 1991, 77: 1627-1652.
13. Witkin SS, Gerber S, Ledger WJ: Influence of interleukin-1 receptor antagonist gene polymorphism on disease. *Clin Infect Dis* 2002, 34: 204-209.
14. McIntyre KW, Stepan GJ, Kolinsky KD, Benjamin WR, Plocinski JM, Kaffka KL *et al.*: Inhibition of interleukin 1 (IL-1) binding and bioactivity in vitro and modulation of acute inflammation in vivo by IL-1 receptor antagonist and anti-IL-1 receptor monoclonal antibody. *J Exp Med* 1991, 173: 931-939.

15. Tarlow JK, Blakemore AI, Lennard A, Solari R, Hughes HN, Steinkasserer A *et al.*: Polymorphism in human IL-1 receptor antagonist gene intron 2 is caused by variable numbers of an 86-bp tandem repeat. *Hum Genet* 1993, 91: 403-404.
16. El-Omar EM, Carrington M, Chow WH, McColl KE, Bream JH, Young HA *et al.*: Interleukin-1 polymorphisms associated with increased risk of gastric cancer. *Nature* 2000, 404: 398-402.
17. Sehouli J, Mustea A, Kongsen D, Katsares I, Lichtenegger W: Polymorphism of IL-1 receptor antagonist gene: role in cancer. *Anticancer Res* 2002, 22: 3421-3424.
18. El-Omar EM, Carrington M, Chow WH, McColl KE, Bream JH, Young HA *et al.*: The role of interleukin-1 polymorphisms in the pathogenesis of gastric cancer. *Nature* 2001, 412: 99.
19. Figueiredo C, Machado JC, Pharoah P, Seruca R, Sousa S, Carvalho R *et al.*: Helicobacter pylori and interleukin 1 genotyping: an opportunity to identify high-risk individuals for gastric carcinoma. *J Natl Cancer Inst* 2002, 94: 1680-1687.
20. Machado JC, Pharoah P, Sousa S, Carvalho R, Oliveira C, Figueiredo C *et al.*: Interleukin 1B and interleukin 1RN polymorphisms are associated with increased risk of gastric carcinoma. *Gastroenterology* 2001, 121: 823-829.
21. Machado JC, Figueiredo C, Canedo P, Pharoah P, Carvalho R, Nabais S *et al.*: A proinflammatory genetic profile increases the risk for chronic atrophic gastritis and gastric carcinoma. *Gastroenterology* 2003, 125: 364-371.
22. Upadhyay R, Jain M, Kumar S, Ghoshal UC, Mittal B: Potential influence of interleukin-1 haplotype IL-1 beta-511\*T-IL-1RN\*1 in conferring low risk to middle third location of esophageal cancer: a case-control study. *Hum Immunol* 2008, 69: 179-186.
23. Viet HT, Wagsater D, Hugander A, Dimberg J: Interleukin-1 receptor antagonist gene polymorphism in human colorectal cancer. *Oncol Rep* 2005, 14: 915-918.
24. Lurje G, Hendifar AE, Schultheis AM, Pohl A, Husain H, Yang D *et al.*: Polymorphisms in interleukin 1 beta and interleukin 1 receptor antagonist associated with tumor recurrence in stage II colon cancer. *Pharmacogenet Genomics* 2009, 19: 95-102.
25. Lind H, Zienolddiny S, Ryberg D, Skaug V, Phillips DH, Haugen A: Interleukin 1 receptor antagonist gene polymorphism and risk of lung cancer: a possible interaction with polymorphisms in the interleukin 1 beta gene. *Lung Cancer* 2005, 50: 285-290.
26. Vishnoi M, Pandey SN, Choudhuri G, Mittal B: IL-1 gene polymorphisms and genetic susceptibility of gallbladder cancer in a north Indian population. *Cancer Genet Cytogenet* 2008, 186: 63-68.

- 1  
2  
3 27. Ahirwar DK, Agrahari A, Mandhani A, Mittal RD: Cytokine gene  
4 polymorphisms are associated with risk of urinary bladder cancer and recurrence  
5 after BCG immunotherapy. *Biomarkers* 2009, 14: 213-218.  
6  
7
- 8 28. Mustea A, Sehouli J, Konsgen D, Stengel D, Sofroni D, Lichtenegger W:  
9 Interleukin 1 receptor antagonist (IL-1RA) polymorphism in women with  
10 cervical cancer. *Anticancer Res* 2003, 23: 1099-1102.  
11
- 12 29. Hirankarn N, Kimkong I, Kummee P, Tangkijvanich P, Poovorawan Y:  
13 Interleukin-1beta gene polymorphism associated with hepatocellular carcinoma  
14 in hepatitis B virus infection. *World J Gastroenterol* 2006, 12: 776-779.  
15
- 16 30. Mullenbach R, Lagoda PJ, Welter C: An efficient salt-chloroform extraction of  
17 DNA from blood and tissues. *Trends Genet* 1989, 5: 391.  
18
- 19 31. Cardoso CS, Araujo HC, Cruz E, Afonso A, Mascarenhas C, Almeida S *et al.*:  
20 Haemochromatosis gene (HFE) mutations in viral-associated neoplasia: Linkage  
21 to cervical cancer. *Biochem Biophys Res Commun* 2006, 341: 232-238.  
22
- 23 32. Duarte I, Santos A, Sousa H, Catarino R, Pinto D, Matos A *et al.*: G-308A TNF-  
24 alpha polymorphism is associated with an increased risk of invasive cervical  
25 cancer. *Biochem Biophys Res Commun* 2005, 334: 588-592.  
26
- 27 33. Catarino R, Pereira D, Breda E, Coelho A, Matos A, Lopes C *et al.*: Oncogenic  
28 virus-associated neoplasia: a role for cyclin D1 genotypes influencing the age of  
29 onset of disease? *Biochem Biophys Res Commun* 2008, 370: 118-122.  
30
- 31 34. Sousa H, Santos AM, Pinto D, Medeiros R: Is the p53 codon 72 polymorphism a  
32 key biomarker for cervical cancer development? A meta-analysis review within  
33 European populations. *Int J Mol Med* 2007, 20: 731-741.  
34
- 35 35. Sousa H, Santos AM, Catarino R, Pinto D, Vasconcelos A, Lopes C *et al.*:  
36 Linkage of TP53 codon 72 pro/pro genotype as predictive factor for  
37 nasopharyngeal carcinoma development. *Eur J Cancer Prev* 2006, 15: 362-366.  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

**Figure 1**– PCR-RFLP analysis of IL-1RN VNTR polymorphism

Agarose gel (3% w/v) stained with ethidium bromide: M – 100 bp DNA ladder; (-) negative control; Lanes: 1) A2 homozygous, 2) A1 homozygous, 3) A2\*A4, 4) A1\*A4, 5) A3\*A4.

**Table I** – Identification of the IL-1RN allele size and number of Tandem Repeats**Table II** – Distribution and statistical analysis of IL-1RN VNTR genotypes in cervical cancer

Chi-Square ( $\chi^2$ ); *P* – Pearson  $\chi^2$ ; OR – Odds Ratio; CI – Confidence Interval.

**Table III** – Distribution and statistical analysis of IL-1RN VNTR genotypes in nasopharyngeal carcinoma

Chi-Square ( $\chi^2$ ); *P* – Pearson  $\chi^2$ ; OR – Odds Ratio; CI – Confidence Interval.

**Table I** – Identification of the IL-1RN allele size and number of Tandem Repeats

<b>Allele</b>	<b>Number of Repeats (Size)</b>
1	4 Tandem Repeats (410 pb)
2	2 Tandem Repeats (240 pb)
3	3 Tandem Repeats (325 pb)
4	5 Tandem Repeats (500 pb)
5	6 Tandem Repeats (595 pb)

For Peer Review

**Table II** – Distribution and statistical analysis of II-1RN VNTR genotypes in cervical cancer

	<b>Non A2*A2</b>	<b>A2*A2</b>	<b>P</b>	<b>OR</b>	<b>95% CI</b>
	n (%)	n (%)			
Controls (n=202)	178 (88.1)	24 (11.9)		1.00	Reference
Cervical Lesions (n=340)	273 (80.3)	67 (19.7)	<b>0.018</b>	<b>1.82</b>	1.10 – 3.01
LSIL (n=28)	23 (82.1)	5 (17.9)	0.372	1.61	0.56 – 4.64
HSIL (n=84)	67 (79.8)	17 (20.2)	0.066	1.88	0.95 – 3.72
ICC (n=228)	183 (80.3)	45 (19.7)	<b>0.027</b>	<b>1.84</b>	1.07 – 3.12
>HSIL (n=312)	250 (80.1)	62 (19.9)	<b>0.018</b>	<b>1.84</b>	1.11 – 3.06

Chi-Square ( $\chi^2$ ); *P* – Pearson  $\chi^2$ ; OR – Odds Ratio; CI – Confidence Interval.

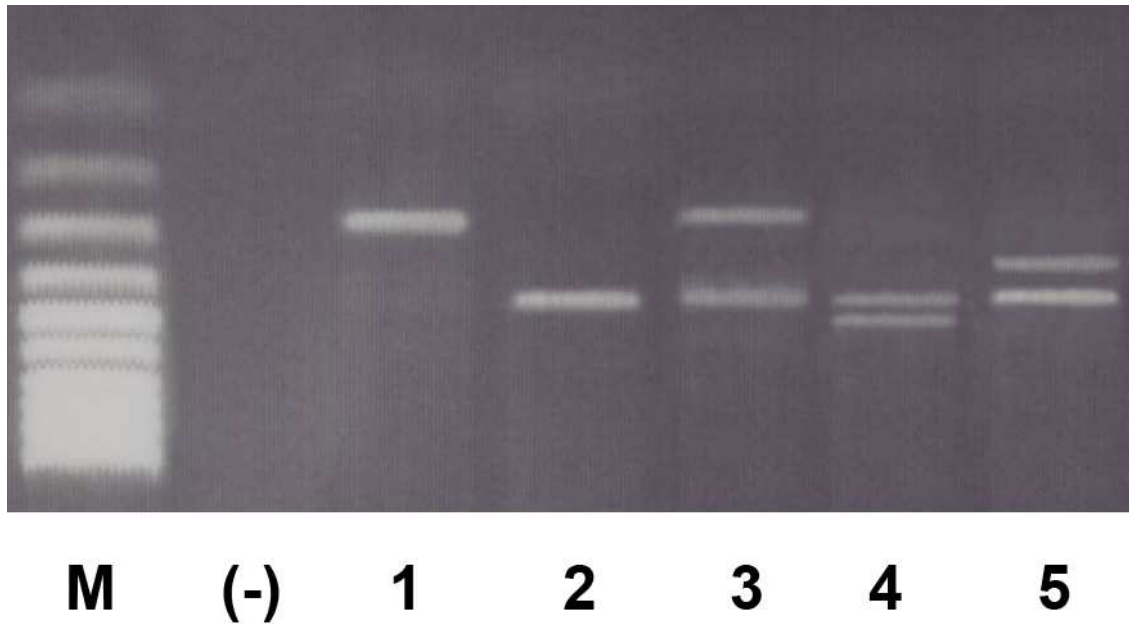
**Table III** – Distribution and statistical analysis of II-1RN VNTR genotypes in nasopharyngeal carcinoma

	<b>Non A2*A2</b>	<b>A2*A2</b>	<b><i>P</i></b>	<b>OR</b>	<b>95% CI</b>
	<b>n (%)</b>	<b>n (%)</b>			
Controls (n=444)	401 (90.3)	43 (9.7)		1.00	Reference
NPC (n=116)	80 (69.0)	36 (31.0)	<b>&lt;0.001</b>	<b>4.20</b>	2.54 – 6.94
UNPC (n=105)	75 (71.4)	30 (28.6)	<b>&lt;0.001</b>	<b>3.73</b>	2.20 – 6.32

Chi-Square ( $\chi^2$ ); *P* – Pearson  $\chi^2$ ; OR – Odds Ratio; CI – Confidence Interval.



**Figure 1**– PCR-RFLP analysis of IL-1RN VNTR polymorphism



Agarose gel (3% w/v) stained with ethidium bromide: M – 100 bp DNA ladder; (-) negative control; Lanes: 1) A2 homozygous, 2) A1 homozygous, 3) A2\*A4, 4) A1\*A4, 5) A3\*A4.

# Role<sup>Q1</sup> of the MDM2 SNP309 Polymorphism in the Initiation and Early Age of Onset of Nasopharyngeal Carcinoma

Hugo Sousa,<sup>1,2,3\*</sup> Mafalda Pando,<sup>1</sup> Eduardo Breda,<sup>4</sup> Raquel Catarino,<sup>1,3</sup> and Rui Medeiros<sup>1,2,3</sup>

<sup>1</sup>Molecular Oncology Group, Portuguese Institute of Oncology of Porto, Porto, Portugal

<sup>2</sup>Molecular Virology Laboratory of Virology Service, Portuguese Institute of Oncology of Porto, Porto, Portugal

<sup>3</sup>ICBAS, Abel Salazar Institute for the Biomedical Sciences, University of Porto, Porto, Portugal

<sup>4</sup>Otorrinolaryngology Service, Portuguese Institute of Oncology of Porto, Porto, Portugal

Recent studies refer that amplification/overexpression of the principal negative regulator of p53 (Mdm2) is frequently found in several malignancies. Several studies have associated a polymorphism (SNP309 T/G) in the promoter region of MDM2 with higher levels of this protein, which will favor p53-pathway abolishment, cell-cycle escape, and development of cancer. We aimed to study if MDM2 SNP309 T/G polymorphism contributes to the development of nasopharyngeal carcinoma (NPC). We have developed a case–control study with 124 patients with NPC and 509 healthy individuals from the north of Portugal to determine the genetic distribution of the MDM2 SNP309 polymorphism in DNA extracted from peripheral blood samples. Statistical analysis was performed to compare categorical variables adjusted for age and gender by multivariate logistic regression. Genotype-specific distributions according to age of onset were tested by Kaplan–Meier method and analyzed by Cox-regression proportional hazard model adjusted for gender. This study revealed that MDM2 SNP309 GG homozygous represent an increased risk adjusted for age and gender to develop NPC (OR=2.15), with particular effect in undifferentiated types (OR=2.46) and early clinical stages (OR=3.32). We also found that median age of onset of NPC was significantly different (55.2 vs. 61.6) with increased effect in undifferentiated types (55.2 vs. 61.9) and early clinical stages (55.3 vs. 65.3). Our study suggests that MDM2 SNP309 can be considered a risk marker for the development of NPC mainly in early ages probably as an initiation marker for potential cancer development. © 2010 Wiley-Liss, Inc.

**Key words:** MDM2; genetic polymorphism; nasopharyngeal carcinoma; viral associated neoplasias; Epstein–Barr virus (EBV)

## INTRODUCTION

Nasopharyngeal carcinoma (NPC) is a rare malignancy with distinctive geographic and ethnic distribution. It is reported as a high incidence malignancy in Southeast Asia, particularly in Southern China, however, in Caucasians from Western countries its incidence rates are below 1 per 100 000 [1,2].

NPC is a multifactorial disease where epidemiological evidences suggest that infection by the Epstein–Barr virus (EBV) is considered to be the main etiological factor, and several other environmental factors, such as tobacco smoking, alcohol consumption, exposure to wood dust and consumption of salted fish and foods containing nitrosamine or its precursors have also been shown to be associated with its development [3].

The EBV is well known for its ability to induce cell proliferation [4]. After primary infection, the viral DNA is maintained as an episome protected by histones, becoming a perfect template for replication when viral production is activated by the BZLF1-dependent EBV Lytic program [5–7], resulting in

thousand copies of EBV DNA per cell [8,9]. This induction of EBV lytic program activates DNA damage response elements by the MRN complex and the ataxia–telangiectasia mutated (ATM), which recognize the viral DNA as abnormal DNA structures due to its size [9,10].

In normal cases, ATM activates p53-dependent response: cell-cycle arrest, DNA repair, and apoptosis induction [11]. The role of p53 is extremely impor-

Abbreviations: NPC, nasopharyngeal carcinoma; EBV, Epstein–Barr virus; ATM, ataxia–telangiectasia mutated; UNPC, undifferentiated carcinoma; PCR, polymerase chain reaction; OR, odds ratio; CI, confidence interval; AP, attributable proportion.

All authors declare that there is no competing financial interest with the work described above in the article.

\*Correspondence to: Grupo de Oncologia Molecular, CI, Laboratórios 4º Piso, Instituto Português de Oncologia do Porto FG, EPE, Rua Dr. António Bernardino Almeida, 4200-072 Porto, Portugal.

Received 25 May 2010; Revised 15 August 2010; Accepted 8 September 2010

DOI 10.1002/mc.20689

Published online in Wiley Online Library (wileyonlinelibrary.com).

tant in cell homeostasis maintenance, and its inactivation either by mutations, oncogene activation or p53 suppression is considered to be crucial for cancer development [11]. Mdm2 is the principal negative regulator of p53 by inhibiting its transactivation domain, favoring the export of p53 from nuclei, and by acting as an E3 ubiquitin ligase, which will target p53 for degradation [12–14]. In normal cases, if a DNA response is activated, ATM phosphorylates p53 at Ser15 and therefore, the interaction with Mdm2 is lost, which results in the activation of p53 normal functions [9,11].

Recent studies have shown amplification/overexpression of Mdm2 in several malignancies including NPC [12,15–17]. Furthermore, Mdm2 is activated in EBV latent phase, either by oncogene activation, or by EBNA3C induced Mdm2 deubiquitination contributing to its mediated p53 degradation [18,19].

Bond et al. identified a naturally occurring T to G polymorphism at nucleotide 309 in the intronic p53-response promoter of *MDM2* (SNP309) which was found to increase the affinity for binding the stimulatory protein (Sp) 1, a transcriptional activator, resulting in higher levels of *MDM2* RNA and protein and the subsequent attenuation of the p53 pathway increasing the risk of cancer development [20,21]. Therefore, we hypothesize that this polymorphism may contribute to major risk of NPC development by adding increased activity of *MDM2*.

Several studies, including some from our group, have reported that there are genetic polymorphisms associated with higher risk of NPC development [22,23]. The aim of this study was to characterize the role of the *MDM2* SNP309 polymorphism in the development of NPC within a Western population.

## MATERIALS AND METHODS

### Study Subjects

We have developed a hospital-based case–control study considering patients with NPC ( $n = 124$ , 88 males and 36 females) and controls ( $n = 509$ , 297 males and 212 females) from the northern region of Portugal (Table 1). NPC patients were recruited consecutively between 2002 and 2007 at the Otorrhinolaryngology Department from the Portuguese Institute of Oncology of Porto and histologically confirmed by senior pathologist at the institution considering the tumor-node-metastasis classifications according to the *World Health Organization* (WHO) on: type I, keratinizing squamous cell carcinoma and type II, nonkeratinizing squamous cell carcinoma, which were combined as well or moderately differentiated NPC (WMDNPC,  $n = 13$ ), and type III, undifferentiated carcinoma (UNPC,  $n = 111$ ) [24]. Controls were recruited from Healthy Blood Donors Database community based from the Portuguese Institute of Oncology of Porto and the

**Table 1. Distribution of Clinical Data in Cases and Controls Included in the Study**

	Patients	Controls
Gender, no	124	509
Female, no (%)	36 (29.0)	212 (41.6)
Male, no (%)	88 (71.0)	297 (58.4)
Age, yr (mean $\pm$ SD)	47.7 $\pm$ 14.6	41.5 $\pm$ 11.4
Histological type, no.		
WMDNPC	13	
UNPC	111	
Clinical stage, no. <sup>a</sup>		
I, II, and III	69	
IV	49	

SD, standard deviation; WMDNPC, well or moderately differentiated NPC; UNPC, undifferentiated nasopharyngeal cancer.  
<sup>a</sup>Patients with missing data were not included.

selection criteria for controls included no individual history of cancer.

Informed consent according to the Declaration of Helsinki was obtained from all individuals included in the study.

### Genotyping

DNA was extracted from the white blood cell fraction of peripheral blood samples, collected following standard venipuncture technique in EDTA-containing tubes, using standard phenol/chloroform protocols.

*MDM2* SNP309 TG polymorphism was genotyped by polymerase chain reaction (PCR) as described previously [25] with the forward primer 5'-GAT TTC GGA CGG CTC TCG CGG C-3' and reverse primer 5'-CAT CCG GAC CTC CCG CGC TGG-3'. As the protocol refers, the reverse primer was developed to introduce a mismatched Adenine replacing a guanine to create a *Pst*I restriction site 2bp from the polymorphism position.

The PCR reaction was performed in a 50  $\mu$ l solution with 1 $\times$  *Taq* buffer, 1.0 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.2 mM DNTP's, 0.20  $\mu$ M each primer, 1 U de *Taq* DNA Polimerase, and 0.2  $\mu$ g of genomic DNA. The amplification conditions were as following: 95°C during 5 min for the initial denaturation, followed by 35 cycles of denaturation at 94°C (45 s), annealing at 60°C (45 s) and extension at 72°C (45 s), and a final extension step consisted 7 min at 72°C. Negative controls were used in all reactions by including a PCR mix without DNA sample to ensure contamination-free PCR products.

The PCR amplification yields a fragment of 121 bp, which was digested for 2 h by 5 U of *Pst*I restriction enzyme (New England Biolabs, Beverly, MA) at 37°C. The products of the digestion were then analyzed by electrophoresis in a 3% agarose gel (w/v) stained with ethidium bromide (Figure 1). The G allele is cleaved by the enzyme originating two fragments, one of 104 and another of 17bp, whereas the T allele is not cleaved by the enzyme.

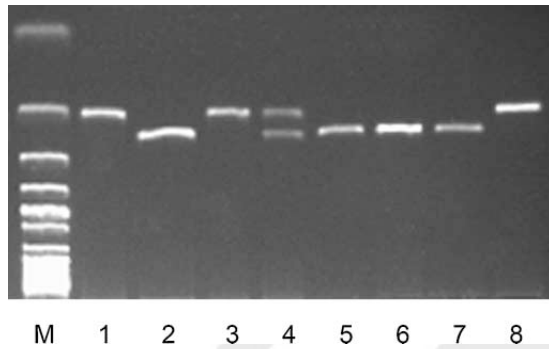


Figure 1. PCR-RFLP analysis of MDM2 SNP309 polymorphism. Agarose gel (3%, w/v) stained with ethidium bromide: M—50 bp DNA ladder; lanes 1, 3, and 8—MDM2 SNP309 G allele homozygous; lanes 2, 5, 6, and 7—T allele homozygous; and lane 4—heterozygous.

Cases and controls were indiscriminately genotyped and independently analyzed by two of the authors, and afterwards, 10% of all samples were randomly selected and resubmitted to a new PCR-RFLP analysis to confirm the genotypes. The concordance of genotypes was of 100% among duplicates.

#### Statistical Analysis

Genotypes were tested for the Hardy–Weinberg equilibrium with the public software available at <http://ihg.gsf.de/>. Chi-square ( $\chi^2$ ) analysis was used to calculate the odds ratio (OR) and its 95% confidence interval (CI) as a measure of the association between the MDM2 SNP309 genotypes and the categorical variables (mean age at diagnosis, gender, histological type of NPC and tumor-node-metastasis stage categorized as stage I–III vs. IV). This analysis was performed with inclusion of a dichotomous indicator for the covariate and genotypes: homozygous wild-type and heterozygous (Tcarrier) versus homozygous variant (GG) and multivariate regression analysis was performed to adjust the OR for age and gender. The genotype-specific distributions according to age of disease onset were tested by calculating the cumulative hazard function plots computed by the Kaplan–Meier methodology with Log-rank and Breslow test and adjusted for gender by Cox-regression proportional hazard. The statistical analysis was determined with computer software Statistical Package for Social Sciences—SPSS for Windows (version 16.0) using a 5% level of significance.

The power of the analysis was calculated with the PS Power and Sample Size Calculations software, version 3.0 available at <http://biostat.mc.vanderbilt.edu/twiki/bin/view/Main/PowerSampleSize> [26]. We have also used the attributable proportion (AP) given by the following formula:  $AP = PRF \times (1 - 1/OR)$  (PRF, percentage of risk factor; OR, odds ratio) to measure the proportion of cases that can be imputed to the influence of a particular factor [27].

## RESULTS

### Allelic Distribution of MDM2 SNP309 Polymorphism

The distribution of the MDM2 SNP309 genotypes was according to the Hardy–Weinberg equilibrium in controls, NPC, and UNPC cases ( $P > 0.050$ ). The frequency of the SNP309 TT, TG, and GG genotypes were 42.6%, 47.9%, and 9.5%, respectively, in controls, and 41.1%, 40.3%, and 18.6% in patients with NPC (Table 2). These results show a significant higher frequency of the MDM2 SNP309 GG homozygous among patients with NPC ( $P = 0.013$ ) even more evident in undifferentiated type of NPC ( $P = 0.002$ ) and in early stage cases ( $P < 0.001$ ).

### Risk Estimates for Nasopharyngeal Carcinoma

Statistical differences were found when considering the association between the MDM2 SNP309 polymorphism and the risk of developing NPC. This study revealed an increased risk of developing NPC for MDM2 SNP309 GG homozygous (OR = 2.19; 95% CI 1.27–3.76;  $P = 0.004$ ), and moreover, this effect is even stronger if we considered the undifferentiated types (OR = 2.51; 95% IC 1.45–4.34;  $P = 0.001$ ) and the early clinical stages (OR = 3.39; 95% IC 1.83–6.26;  $P < 0.001$ ) (Table 2). When adjusting the OR for age and gender by multivariate logistic regression, results were OR = 2.15 (95% IC 1.23–3.74;  $P = 0.007$ ), OR = 2.46 (95% IC 1.41–4.30;  $P = 0.002$ ), and OR = 3.32 (95% IC 1.78–6.17;  $P < 0.001$ ), respectively.

Furthermore, no significant associations were found by stratifying the NPC cases according to the clinicopathological data (gender, age of onset measured as the median age of cases at diagnosis, histological data and clinical stage) (Table 3).

### Age of Onset

Cox-regression proportional hazard adjusted for gender revealed increased risk for the MDM2 SNP309 GG homozygous to develop NPC (OR = 1.74; 95% CI 1.10–2.76;  $P = 0.018$ ), UNPC (OR = 1.84; 95% CI 1.16–2.94;  $P = 0.010$ ), and early clinical stages (OR = 2.81; 95% CI 1.61–4.88;  $P < 0.001$ ) (Figure 2).

We found a statistical significant result when comparing the median age of onset of the NPC cases according to the MDM2 SNP309 genotypes. The results show that the median age of onset of NPC cases in MDM2 SNP309 GG homozygous was of 55.2 yr old comparing to 61.5 in T allele carriers ( $P = 0.015$ ) (Figure 2). Moreover, these results are more relevant if we isolate the undifferentiated type of NPC (55.2 vs. 61.9;  $P = 0.008$ ), and early clinical stages (55.3 vs. 65.3;  $P < 0.001$ ).

### Attributable Proportion for Nasopharyngeal Carcinoma and Power of Analysis

In our study, the AP for NPC development is 9.75%, showing that almost 10% of NPC cases could

Table 2. Risk Association of the MDM2 SNP309 TG Polymorphism

	NPC cases			UNPC cases			NPC stage I–III		
	n (%)	P	OR (95% CI)	n (%)	P	OR (95% CI)	n (%)	P	OR (95% CI)
MDM2 SNP309									
TT	217 (42.6)		1.00	46 (41.4)		1.00	29 (42.0)		1.00
TG	244 (47.9)	0.653	0.91 (0.58–1.42)	42 (37.8)	0.371	0.81 (0.50–1.31)	22 (31.9)	0.184	0.67 (0.36–1.25)
GG	48 (9.5)	<b>0.015</b> <sup>a</sup>	<b>2.04 (1.09–3.80)</b>	23 (20.7)	<b>0.006</b>	<b>2.26 (1.20–4.24)</b>	18 (26.1)	<b>0.002</b>	<b>2.81 (1.37–5.74)</b>
TG+GG	292 (57.4)	0.653	0.91 (0.58–1.42)	65 (58.6)	0.818	1.05 (0.68–1.63)	40 (58.0)	0.924	1.03 (0.60–1.76)
TT+TG	461 (90.5)		1.00	88 (79.3)		1.00	51 (73.9)		1.00
GG	48 (9.5)	<b>0.004</b>	<b>2.19 (1.27–3.76)</b>	23 (20.7)	<b>0.001</b>	<b>2.51 (1.45–4.34)</b>	18 (26.1)	<b>&lt;0.001</b>	<b>3.39 (1.89–6.26)</b>
		<b>0.007</b> <sup>a</sup>	<b>2.15 (1.23–3.74)</b>		<b>0.002</b> <sup>a</sup>	<b>2.46 (1.41–4.30)</b>		<b>&lt;0.001</b> <sup>a</sup>	<b>3.32 (1.78–6.17)</b>

NPC, nasopharyngeal carcinoma; UNPC, undifferentiated nasopharyngeal cancer; P, Pearson  $\chi^2$  test; OR, odds ratio; CI, confidence interval.  
<sup>a</sup>Multivariate logistic regression adjusted for age and gender.

Author Proof

be attributed to the influence of the MDM2 SNP309 GG genotype. Moreover, these results are more relevant if we considered only the undifferentiated type of NPC (12.5%), and the early clinical stages (18.4%).

Our results are consistently strong since the power of the analysis was measure for NPC, UNPC, and NPC stage I–III with results of 80%, 88%, and 94.5%, respectively.

## DISCUSSION

Upon primary infection, the EBV leads to a latent infection with a minimum viral activity only that contributes for viral persistence in the host. Accordingly to several authors, despite the oncogenic potential of these viruses, not all infected individuals will develop cancer. Therefore it is suggested that host genetic factors are thought to contribute to viral associated cancers development [2,28]. There are several studies describing genetic factors responsible for a higher predisposition to NPC, which provides great improvements for the definition of individuals/groups at higher risk of developing NPC [22,23,29].

The ubiquitin-dependent proteasome pathway (UPS) is crucial for cellular homeostasis by regulating cell growth, proliferation, apoptosis, DNA repair, transcription and immune response [30]. The UPS is the natural occurring process for protein degradation promoting the adaptation of cells to the environment conditions according to their needs and involves sequential reactions catalyzed by E1 (ubiquitin activating), E2 (ubiquitin conjugating/carrier), and E3 (ubiquitin ligase) enzymes, which targets any marked protein to degradation through the 26S proteasome [31,32]. One of the proteins largely involved in UPS is the Mdm2, a product of the murine double minute 2 gene (*MDM2*) [33].

Mdm2 is a protein that exhibits E3 ubiquitin–protein ligase properties and is capable of regulating the ubiquitination of key cellular proteins as well as its own levels [34]. Mdm2 was identified as the key protein for both p53 mono- and poly-ubiquitination depending on its levels [35]. It has been shown that when p53 becomes mono-ubiquitinated it is targeted for nuclear export, nevertheless, the poly-ubiquitinated form of p53 promotes its destabilization and proteasomal degradation [34]. Thus, when Mdm2-dependent ubiquitination of p53 is deregulated, cells are more prone to be carcinogenic because they escape one of the key cell-cycle checkpoints.

In NPC development, the infection by the EBV is the crucial event for carcinogenesis. There are several EBV proteins that interact with key proteins in cell-cycle regulation and moreover, the maintenance of viral genome inside cells nuclei is crucial for EBV latency, where Mdm2 overexpression activated by EBNA3C contributes to p53 degradation [18,19]. When EBV latency is compromised, viral genome is recognized as an abnormal DNA structure due to its

Table 3. Analysis of Clinicopathological Parameters Among NPC Patients

	TT, n (%)	TG, n (%)	GG, n (%)	P
Gender (n = 126)				
Female (n = 37)	17 (45.9)	13 (35.2)	7 (18.9)	0.901
Male (n = 89)	34 (38.2)	39 (43.8)	16 (18.0)	
Age of onset (n = 126)				
<49 yr old	26 (43.3)	23 (38.3)	11 (18.4)	0.952
≥49 yr old	25 (39.1)	27 (42.2)	12 (18.7)	
Clinical stage (n = 118)				
I, II, and III (n = 69)	29 (42.0)	22 (31.9)	18 (26.1)	0.053
IV (n = 49)	20 (40.8)	24 (49.0)	5 (10.2)	
Histological type (n = 124)				
WMDNPC (n = 13)	5 (38.5)	8 (61.5)	—	0.114
UNPC (n = 111)	46 (41.4)	42 (37.8)	23 (20.7)	

WMDNPC, well or moderated differentiated NPC; UNPC, undifferentiated nasopharyngeal cancer;  $\chi^2$  test was performed comparing T carriers versus GG; P, Pearson  $\chi^2$ .

size, leading the ATM to phosphorylates p53 at Ser15 restraining the interaction with Mmd2, which results in the activation of p53 normal functions [8–10].

The MDM2 SNP309 polymorphism has been intensely studied in the past years since the Bond et al. described that a modification from T to G increase promoter activity and was associated with higher attenuation of the p53 pathway [13,20,36]. The higher expression of Mdm2 will increase degradation of p53 through the ubiquitin–proteasome pathway and lead to the abolishment of the p53 cell-cycle regulation pathway. Thus, increased levels of Mmd2 will favor cell proliferation and therefore increase the risk of tumorigenic transformation of cells, which in the presence of an oncogenic virus will contribute to cancer predisposition.

While several authors have shown that this polymorphism seems to influence the risk of cancer development, others did not find any association. In fact, a recently genome wide association study within a southern Chinese population did not found this polymorphism as a genetic risk marker [29]. However, this polymorphism has biological plausibility that continues to drive the scientific community to perform new studies and to evaluate its possible role in cancer development in distinct populations.

As a hospital-based case–control study, it is important to refer the potential limitations of our study: firstly it was not possible to match perfectly cases and controls; secondly, it is important to consider that this is a rare cancer in western civilizations and therefore the number of cases is limited by its natural occurrence; moreover, controls were selected upon community population and we may have inherent selection bias that could not be excluded, nevertheless, stratification and adjustment made in statistical analysis have minimized its effect. Additionally we have to consider that despite the high

power of the study (between 80% and 94.5%), this study requires the confirmation by other authors and in other populations mainly in western countries where the incidence is very low.

Our group has been studying genetic polymorphisms in genes involved in cell-cycle regulation and DNA repair cellular mechanisms as markers of host genetic susceptibility to the development of cancer [22,23,31,37–40]. In this study, results revealed an increasing susceptibility for MDM2 SNP309 GG homozygous to develop NPC. These results are in agreement with some studies that show higher activity of the gene promoter in the presence of the G allele and thus to higher expression levels of Mdm2. When we analyzed the UNPC type only, we observe that the risk is higher than when all types of NPC were considered. This result is more important for our conclusion, since according to the literature only UNPC type is associated in 100% with EBV. Moreover, we were expecting that the role of Mdm2 would be as a primary event of NPC development, since its deregulation will be one of the first steps to allow cells proliferation and our results have also shown that this polymorphism seems to be more important in the development of early stages of NPC. Additionally, we found out that cumulative hazard function plots showed that MDM2 SNP309 GG homozygous develop NPC cancer between 5 and 10 yr before individuals with other genotypes. These data point out that MDM2 SNP309 might be important in the definition of individuals who are at increased risk of develop cancer in younger ages. This fact correlates with our hypothesis that Mdm2 might contribute in the early phases of carcinogenesis.

These data suggest that Mdm2 is probably a key protein for the NPC carcinogenesis and differential expression according to the genetic background of the hosts can determine which individuals are more prone to develop cancer. As conclusion, our data

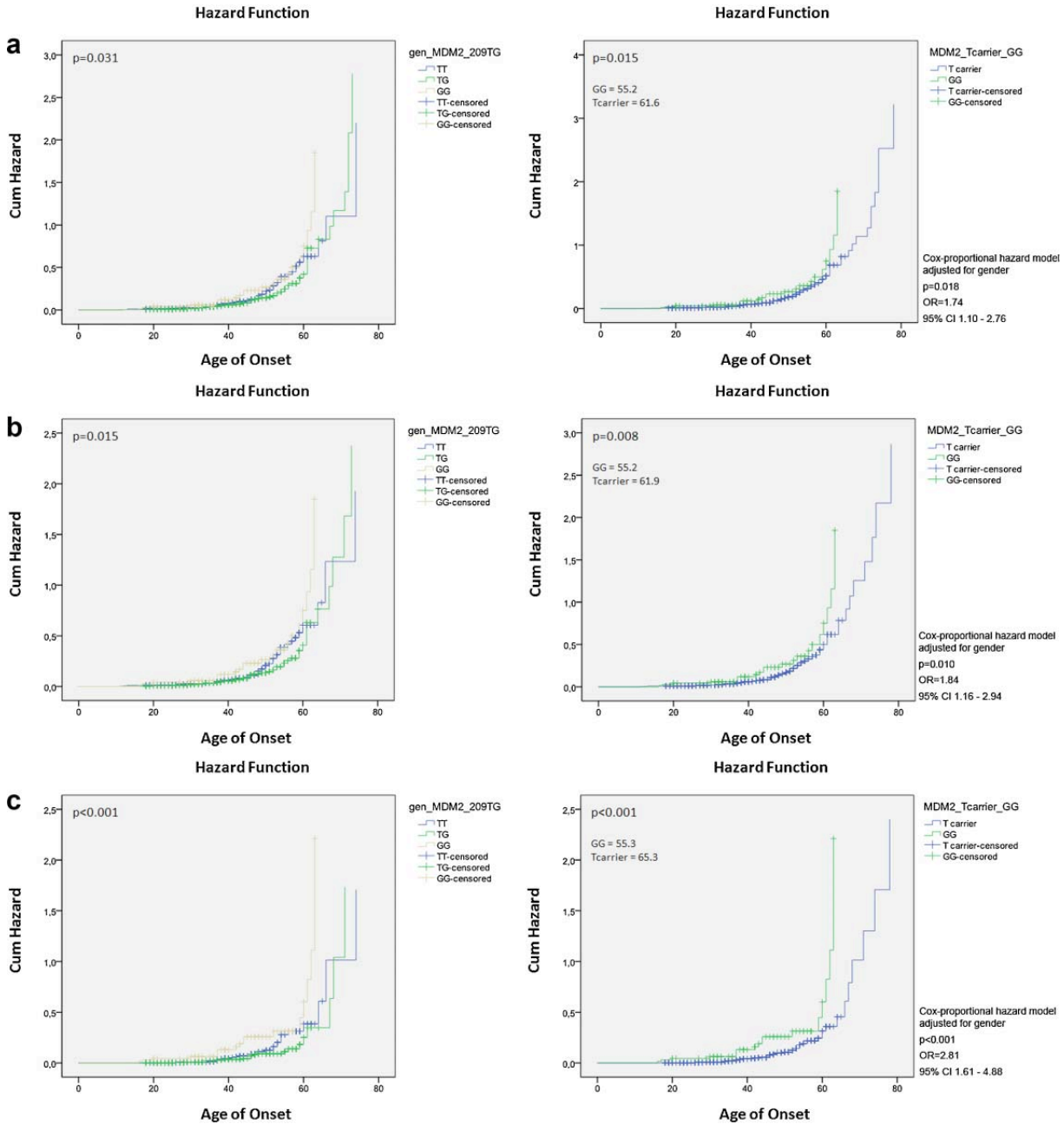


Figure 2. Association between MDM2 SNP309 genotypes and the age of onset. Cumulative hazard function plots by Cox-regression adjusted for gender and by Kaplan–Meier methodology with log-rank test for: (a) nasopharyngeal carcinoma (NPC) all types; (b) undifferentiated types (UNPC); (c) early stage UNPC cases.

provide strong evidences to consider this polymorphism genetic risk marker for the development of NPC in western populations and further studies may help to define if it may be important in the screening of this rare cancer.

**ACKNOWLEDGMENTS**

Authors are grateful to the Portuguese League Against Cancer (*Liga Portuguesa Contra o Cancro—Núcleo Regional do Norte*) and the financial support of individual grant for Doctoral degree of the first

author by the Minister of Science, Technology and Superior Education—FCT (*Fundação para a Ciência e Tecnologia: SFRH/BD/40718/2007*). We also gratefully acknowledge funding of this work by the Portuguese Ministry of Health—*Comissão Fomento Investigação em Cuidados de Saúde* (48/2005).

**REFERENCES**

1. Breda E, Catarino R, Azevedo I, Fernandes T, Barreira da Costa C, Medeiros R. Characterization of the clinical

- evolution of nasopharyngeal carcinoma in Portuguese population. *Acta Otorrinolaringol Esp* 2007;58:191–197.
2. Lo KW, To KF, Huang DP. Focus on nasopharyngeal carcinoma. *Cancer Cell* 2004;5:423–428.
  3. Breda E, Catarino R, Coelho A, Sousa H, Medeiros R. Nasopharyngeal carcinoma study: Introduction and multidisciplinary perspective. *Acta Med Port* 2008;21:273–284.
  4. Tsurumi T, Fujita M, Kudoh A. Latent and lytic Epstein–Barr virus replication strategies. *Rev Med Virol* 2005;15:3–15.
  5. Amon W, Binne UK, Bryant H, Jenkins PJ, Karstegl CE, Farrell PJ. Lytic cycle gene regulation of Epstein–Barr virus. *J Virol* 2004;78:13460–13469.
  6. Amon W, Farrell PJ. Reactivation of Epstein–Barr virus from latency. *Rev Med Virol* 2005;15:149–156.
  7. Binne UK, Amon W, Farrell PJ. Promoter sequences required for reactivation of Epstein–Barr virus from latency. *J Virol* 2002;76:10282–10289.
  8. Sato Y, Kamura T, Shirata N, et al. Degradation of phosphorylated p53 by viral protein-ECS E3 ligase complex. *PLoS Pathog* 2009;5:e1000530.
  9. Sato Y, Shirata N, Kudoh A, et al. Expression of Epstein–Barr virus BZLF1 immediate-early protein induces p53 degradation independent of MDM2, leading to repression of p53-mediated transcription. *Virology* 2009;388:204–211.
  10. Kudoh A, Fujita M, Zhang L, et al. Epstein–Barr virus lytic replication elicits ATM checkpoint signal transduction while providing an S-phase-like cellular environment. *J Biol Chem* 2005;280:8156–8163.
  11. Bourdon JC, Laurenzi VD, Melino G, Lane D. p53: 25 years of research and more questions to answer. *Cell Death Differ* 2003;10:397–399.
  12. Zhou G, Zhai Y, Cui Y, et al. MDM2 promoter SNP309 is associated with risk of occurrence and advanced lymph node metastasis of nasopharyngeal carcinoma in Chinese population. *Clin Cancer Res* 2007;13:2627–2633.
  13. Bond GL, Hu W, Levine AJ. MDM2 is a central node in the p53 pathway: 12 years and counting. *Curr Cancer Drug Targets* 2005;5:3–8.
  14. Atwal GS, Bond GL, Metsuyanin S, et al. Haplotype structure and selection of the MDM2 oncogene in humans. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007;104:4524–4529.
  15. Michael D, Oren M. The p53 and Mdm2 families in cancer. *Curr Opin Genet Dev* 2002;12:53–59.
  16. Qian W, Hu LF, Chen F, et al. Infrequent MDM2 gene amplification and absence of gross WAF1 gene alterations in nasopharyngeal carcinoma. *Eur J Cancer B Oral Oncol* 1995;31B:328–332.
  17. Wu HC, Lu TY, Lee JJ, et al. MDM2 expression in EBV-infected nasopharyngeal carcinoma cells. *Lab Invest* 2004;84:1547–1556.
  18. Renouf B, Hollville E, Pujals A, Tetaud C, Garibal J, Wiels J. Activation of p53 by MDM2 antagonists has differential apoptotic effects on Epstein–Barr virus (EBV)-positive and EBV-negative Burkitt's lymphoma cells. *Leukemia* 2009;23:1557–1563.
  19. Saha A, Murakami M, Kumar P, Bajaj B, Sims K, Robertson ES. Epstein–Barr virus nuclear antigen 3C augments Mdm2-mediated p53 ubiquitination and degradation by deubiquitinating Mdm2. *J Virol* 2009;83:4652–4669.
  20. Bond GL, Hu W, Bond EE, et al. A single nucleotide polymorphism in the MDM2 promoter attenuates the p53 tumor suppressor pathway and accelerates tumor formation in humans. *Cell* 2004;119:591–602.
  21. Hu Z, Jin G, Wang L, Chen F, Wang X, Shen H. MDM2 promoter polymorphism SNP309 contributes to tumor susceptibility: Evidence from 21 case–control studies. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2007;16:2717–2723.
  22. Sousa H, Santos AM, Catarino R, et al. Linkage of TP53 codon 72 pro/pro genotype as predictive factor for nasopharyngeal carcinoma development. *Eur J Cancer Prev* 2006;15:362–366.
  23. Catarino RJ, Breda E, Coelho V, et al. Association of the A870G cyclin D1 gene polymorphism with genetic susceptibility to nasopharyngeal carcinoma. *Head Neck* 2006;28:603–608.
  24. Shanmugaratnam K, Sobin LH. The World Health Organization histological classification of tumours of the upper respiratory tract and ear. A commentary on the second edition. *Cancer* 1993;71:2689–2697.
  25. Hu Z, Ma H, Lu D, et al. Genetic variants in the MDM2 promoter and lung cancer risk in a Chinese population. *Int J Cancer* 2006;118:1275–1278.
  26. Pine SR, Mechanic LE, Ambs S, et al. Lung cancer survival and functional polymorphisms in MBL2, an innate-immunity gene. *J Natl Cancer Inst* 2007;99:1401–1409.
  27. Adams MJ, Jr., Khoury MJ, James LM. The use of attributable fraction in the design and interpretation of epidemiologic studies. *J Clin Epidemiol* 1989;42:659–662.
  28. Cheung FM, Pang SW, Yau TK, Chow SK, Lo KW. Nasopharyngeal intraepithelial lesion: Latent Epstein–Barr virus infection with malignant potential. *Histopathology* 2004;45:171–179.
  29. Bei JX, Li Y, Jia WH, et al. A genome-wide association study of nasopharyngeal carcinoma identifies three new susceptibility loci. *Nat Genet* 2010;42:599–603.
  30. Eldridge AG, O'Brien T. Therapeutic strategies within the ubiquitin proteasome system. *Cell Death Differ* 2010;17:4–13.
  31. Sousa H, Santos AM, Pinto D, Medeiros R. Is the p53 codon 72 polymorphism a key biomarker for cervical cancer development? A meta-analysis review within European populations. *Int J Mol Med* 2007;20:731–741.
  32. Wertz IE, Dixit VM. Regulation of death receptor signaling by the ubiquitin system. *Cell Death Differ* 2010;17:14–24.
  33. Momand J, Zambetti GP, Olson DC, George D, Levine AJ. The mdm-2 oncogene product forms a complex with the p53 protein and inhibits p53-mediated transactivation. *Cell* 1992;69:1237–1245.
  34. Lee JT, Gu W. The multiple levels of regulation by p53 ubiquitination. *Cell Death Differ* 2010;17:86–92.
  35. Li M, Brooks CL, Wu-Baer F, Chen D, Baer R, Gu W. Mono- versus polyubiquitination: Differential control of p53 fate by Mdm2. *Science* 2003;302:1972–1975.
  36. Bond GL, Hu W, Levine A. A single nucleotide polymorphism in the MDM2 gene: From a molecular and cellular explanation to clinical effect. *Cancer Res* 2005;65:5481–5484.
  37. Catarino R, Pereira D, Breda E, et al. Oncogenic virus-associated neoplasia: A role for cyclin D1 genotypes influencing the age of onset of disease? *Biochem Biophys Res Commun* 2008;370:118–122.
  38. Costa S, Pinto D, Pereira D, et al. DNA repair polymorphisms might contribute differentially on familial and sporadic breast cancer susceptibility: A study on a Portuguese population. *Breast Cancer Res Treat* 2007;103:209–217.
  39. Costa S, Pinto D, Pereira D, et al. XRCC1 Arg399Gln and RAD51 5'UTR G135C polymorphisms and their outcome in tumor aggressiveness and survival of Portuguese breast cancer patients. *Breast Cancer Res Treat* 2008;109:183–185.
  40. Santos AM, Sousa H, Catarino R, et al. TP53 codon 72 polymorphism and risk for cervical cancer in Portugal. *Cancer Genet Cytogenet* 2005;159:143–147.



Q1: The Journal's copyeditors have taken care to format your authorship according to journal style (First name, Middle Initial, Surname). In the event a formatting error escaped their inspection, or there was insufficient information to apply journal style, please take a moment to review all author names and sequences to ensure the accuracy of the authorship in the published article. Please note that this information will also affect external indexes referencing this paper (e.g., PubMed).

Q2: Please explain the significance of bold used in the table.



---



---

## COLOR REPRODUCTION IN YOUR ARTICLE

---



---

In the event that color figures were included with the final manuscript files that we received for your article, this form must be completed and returned with your corrected article proofs. Because of the high cost of color printing, we can only print figures in color if authors cover the expense.

Please indicate if you would like your figures to be printed in color or black and white. Color images will be reproduced online in Wiley *InterScience* at no charge, whether or not you opt for color printing.

You will be invoiced for color charges once the article has been published in print.

**Failure to return this form with your article proofs will delay the publication of your article.**

JOURNAL MOLECULAR CARCINOGENESIS

MS. NO. \_\_\_\_\_ NO. OF COLOR PAGES \_\_\_\_\_

TITLE OF MANUSCRIPT \_\_\_\_\_

AUTHOR(S) \_\_\_\_\_

No. Color Pages	Color Charges	No. Color Pages	Color Charges	No. Color Pages	Color Charges
<input type="checkbox"/> 1	950	<input type="checkbox"/> 5	<input type="checkbox"/> 3400	9	<input type="checkbox"/> 5850
<input type="checkbox"/> 2	1450	<input type="checkbox"/> 6	<input type="checkbox"/> 3900	10	<input type="checkbox"/> 6350
<input type="checkbox"/> 3	1950	<input type="checkbox"/> 7	<input type="checkbox"/> 4400	11	<input type="checkbox"/> 6850
<input type="checkbox"/> 4	2450	<input type="checkbox"/> 8	<input type="checkbox"/> 4900	12	<input type="checkbox"/> 7350
<b>***Please contact MCprod@wiley.com for a quote if you have more than 12 pages of color***</b>					

Please print my figures in black and white

Please print my figures in color

Please print the following figures in color:

**BILLING**

**ADDRESS:**

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_



### **Additional reprint and journal issue purchases**

Should you wish to purchase additional copies of your article, please click on the link and follow the instructions provided:  
<https://caesar.sheridan.com/reprints/redir.php?pub=10089&acro=MC>

Corresponding authors are invited to inform their co-authors of the reprint options available.

Please note that regardless of the form in which they are acquired, reprints should not be resold, nor further disseminated in electronic form, nor deployed in part or in whole in any marketing, promotional or educational contexts without authorization from Wiley. Permissions requests should be directed to mailto: [permissionsus@wiley.com](mailto:permissionsus@wiley.com)

For information about 'Pay-Per-View and Article Select' click on the following link: <http://wileyonlinelibrary.com/ppv>

# COPYRIGHT TRANSFER AGREEMENT



Date: \_\_\_\_\_ Contributor name: \_\_\_\_\_

Contributor address: \_\_\_\_\_

Manuscript number (Editorial office only): \_\_\_\_\_

Re: Manuscript entitled \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_ (the "Contribution")

for publication in \_\_\_\_\_ (the "Journal")

published by \_\_\_\_\_ ("Wiley-Blackwell").

Dear Contributor(s):

Thank you for submitting your Contribution for publication. In order to expedite the editing and publishing process and enable Wiley-Blackwell to disseminate your Contribution to the fullest extent, we need to have this Copyright Transfer Agreement signed and returned as directed in the Journal's instructions for authors as soon as possible. If the Contribution is not accepted for publication, or if the Contribution is subsequently rejected, this Agreement shall be null and void. **Publication cannot proceed without a signed copy of this Agreement.**

## A. COPYRIGHT

1. The Contributor assigns to Wiley-Blackwell, during the full term of copyright and any extensions or renewals, all copyright in and to the Contribution, and all rights therein, including but not limited to the right to publish, republish, transmit, sell, distribute and otherwise use the Contribution in whole or in part in electronic and print editions of the Journal and in derivative works throughout the world, in all languages and in all media of expression now known or later developed, and to license or permit others to do so.

2. Reproduction, posting, transmission or other distribution or use of the final Contribution in whole or in part in any medium by the Contributor as permitted by this Agreement requires a citation to the Journal and an appropriate credit to Wiley-Blackwell as Publisher, and/or the Society if applicable, suitable in form and content as follows: (Title of Article, Author, Journal Title and Volume/Issue, Copyright © [year], copyright owner as specified in the Journal). Links to the final article on Wiley-Blackwell's website are encouraged where appropriate.

## B. RETAINED RIGHTS

Notwithstanding the above, the Contributor or, if applicable, the Contributor's Employer, retains all proprietary rights other than copyright, such as patent rights, in any process, procedure or article of manufacture described in the Contribution.

## C. PERMITTED USES BY CONTRIBUTOR

1. **Submitted Version.** Wiley-Blackwell licenses back the following rights to the Contributor in the version of the Contribution as originally submitted for publication:

a. After publication of the final article, the right to self-archive on the Contributor's personal website or in the Contributor's institution's/employer's institutional repository or archive. This right extends to both intranets and the Internet. The Contributor may not update the submission version or replace it with the published Contribution. The version posted must contain a legend as follows: This is the pre-peer reviewed version of the following article: FULL CITE, which has been published in final form at [Link to final article].

b. The right to transmit, print and share copies with colleagues.

2. **Accepted Version.** Re-use of the accepted and peer-reviewed (but not final) version of the Contribution shall be by separate agreement with Wiley-Blackwell. Wiley-Blackwell has agreements with certain funding agencies governing reuse of this version. The details of those relationships, and other offerings allowing open web use, are set forth at the following website: <http://www.wiley.com/go/funderstatement>. NIH grantees should check the box at the bottom of this document.

3. **Final Published Version.** Wiley-Blackwell hereby licenses back to the Contributor the following rights with respect to the final published version of the Contribution:

a. Copies for colleagues. The personal right of the Contributor only to send or transmit individual copies of the final published version in any format to colleagues upon their specific request provided no fee is charged, and further-provided that there is no systematic distribution of the Contribution, e.g. posting on a listserve, website or automated delivery.

b. Re-use in other publications. The right to re-use the final Contribution or parts thereof for any publication authored or edited by the Contributor (excluding journal articles) where such re-used material constitutes less than half of the total material in such publication. In such case, any modifications should be accurately noted.

c. Teaching duties. The right to include the Contribution in teaching or training duties at the Contributor's institution/place of employment including in course packs, e-reserves, presentation at professional conferences, in-house training, or distance learning. The Contribution may not be used in seminars outside of normal teaching obligations (e.g. commercial seminars). Electronic posting of the final published version in connection with teaching/training at the Contributor's institution/place of employment is permitted subject to the implementation of reasonable access control mechanisms, such as user name and password. Posting the final published version on the open Internet is not permitted.

d. Oral presentations. The right to make oral presentations based on the Contribution.

4. **Article Abstracts, Figures, Tables, Data Sets, Artwork and Selected Text (up to 250 words).**

a. Contributors may re-use unmodified abstracts for any non-commercial purpose. For on-line uses of the abstracts, Wiley-Blackwell encourages but does not require linking back to the final published versions.

b. Contributors may re-use figures, tables, data sets, artwork, and selected text up to 250 words from their Contributions, provided the following conditions are met:

- (i) Full and accurate credit must be given to the Contribution.
- (ii) Modifications to the figures, tables and data must be noted. Otherwise, no changes may be made.
- (iii) The reuse may not be made for direct commercial purposes, or for financial consideration to the Contributor.
- (iv) Nothing herein shall permit dual publication in violation of journal ethical practices.

#### D. CONTRIBUTIONS OWNED BY EMPLOYER

1. If the Contribution was written by the Contributor in the course of the Contributor's employment (as a "work-made-for-hire" in the course of employment), the Contribution is owned by the company/employer which must sign this Agreement (in addition to the Contributor's signature) in the space provided below. In such case, the company/employer hereby assigns to Wiley-Blackwell, during the full term of copyright, all copyright in and to the Contribution for the full term of copyright throughout the world as specified in paragraph A above.

2. In addition to the rights specified as retained in paragraph B above and the rights granted back to the Contributor pursuant to paragraph C above, Wiley-Blackwell hereby grants back, without charge, to such company/employer, its subsidiaries and divisions, the right to make copies of and distribute the final published Contribution internally in print format or electronically on the Company's internal network. Copies so used may not be resold or distributed externally. However the company/employer may include information and text from the Contribution as part of an information package included with software or other products offered for sale or license or included in patent applications. Posting of the final published Contribution by the institution on a public access website may only be done with Wiley-Blackwell's written permission, and payment of any applicable fee(s). Also, upon payment of Wiley-Blackwell's reprint fee, the institution may distribute print copies of the published Contribution externally.

#### E. GOVERNMENT CONTRACTS

In the case of a Contribution prepared under U.S. Government contract or grant, the U.S. Government may reproduce, without charge, all or portions of the Contribution and may authorize others to do so, for official U.S. Govern-

ment purposes only, if the U.S. Government contract or grant so requires. (U.S. Government, U.K. Government, and other government employees: see notes at end)

#### F. COPYRIGHT NOTICE

The Contributor and the company/employer agree that any and all copies of the final published version of the Contribution or any part thereof distributed or posted by them in print or electronic format as permitted herein will include the notice of copyright as stipulated in the Journal and a full citation to the Journal as published by Wiley-Blackwell.

#### G. CONTRIBUTOR'S REPRESENTATIONS

The Contributor represents that the Contribution is the Contributor's original work, all individuals identified as Contributors actually contributed to the Contribution, and all individuals who contributed are included. If the Contribution was prepared jointly, the Contributor agrees to inform the co-Contributors of the terms of this Agreement and to obtain their signature to this Agreement or their written permission to sign on their behalf. The Contribution is submitted only to this Journal and has not been published before. (If excerpts from copyrighted works owned by third parties are included, the Contributor will obtain written permission from the copyright owners for all uses as set forth in Wiley-Blackwell's permissions form or in the Journal's Instructions for Contributors, and show credit to the sources in the Contribution.) The Contributor also warrants that the Contribution contains no libelous or unlawful statements, does not infringe upon the rights (including without limitation the copyright, patent or trademark rights) or the privacy of others, or contain material or instructions that might cause harm or injury.

---

#### CHECK ONE BOX:

<input type="checkbox"/> Contributor-owned work		
<b>ATTACH ADDITIONAL SIGNATURE PAGES AS NECESSARY</b>	Contributor's signature _____	Date _____
	Type or print name and title _____	
	Co-contributor's signature _____	Date _____
	Type or print name and title _____	
<input type="checkbox"/> Company/Institution-owned work (made-for-hire in the course of employment)	Company or Institution (Employer-for-Hire) _____	Date _____
	Authorized signature of Employer _____	Date _____
<input type="checkbox"/> U.S. Government work	<b>Note to U.S. Government Employees</b> A contribution prepared by a U.S. federal government employee as part of the employee's official duties, or which is an official U.S. Government publication, is called a "U.S. Government work," and is in the public domain in the United States. In such case, the employee may cross out Paragraph A.1 but must sign (in the Contributor's signature line) and return this Agreement. If the Contribution was not prepared as part of the employee's duties or is not an official U.S. Government publication, it is not a U.S. Government work.	
<input type="checkbox"/> U.K. Government work (Crown Copyright)	<b>Note to U.K. Government Employees</b> The rights in a Contribution prepared by an employee of a U.K. government department, agency or other Crown body as part of his/her official duties, or which is an official government publication, belong to the Crown. U.K. government authors should submit a signed declaration form together with this Agreement. The form can be obtained via <a href="http://www.opsi.gov.uk/advice/crown-copyright/copyright-guidance/publication-of-articles-written-by-ministers-and-civil-servants.htm">http://www.opsi.gov.uk/advice/crown-copyright/copyright-guidance/publication-of-articles-written-by-ministers-and-civil-servants.htm</a>	
<input type="checkbox"/> Other Government work	<b>Note to Non-U.S., Non-U.K. Government Employees</b> If your status as a government employee legally prevents you from signing this Agreement, please contact the editorial office.	
<input type="checkbox"/> NIH Grantees	<b>Note to NIH Grantees</b> Pursuant to NIH mandate, Wiley-Blackwell will post the accepted version of Contributions authored by NIH grant-holders to PubMed Central upon acceptance. This accepted version will be made publicly available 12 months after publication. For further information, see <a href="http://www.wiley.com/go/nihmandate">www.wiley.com/go/nihmandate</a> .	

AU1 ►

## Genetic Risk Markers for Nasopharyngeal Carcinoma in Portugal: Tumor Necrosis Factor Alpha –308G >A Polymorphism

Hugo Sousa,<sup>1–3</sup> Eduardo Breda,<sup>4</sup> Alexandra M. Santos,<sup>1</sup> Raquel Catarino,<sup>1,3</sup>  
 Daniela Pinto,<sup>1,2</sup> and Rui Medeiros<sup>1–3</sup>

The tumor necrosis factor-alpha (TNF- $\alpha$ ) is a strong proinflammatory cytokine produced by the activated macrophages in the immune response to viral infections. A common polymorphism on the promoter region of *TNFA* gene (–308G >A) has been associated with different susceptibilities to the development of several diseases including viral-associated neoplasias. Data suggest that the A allele has been associated with higher levels of TNF- $\alpha$  and, therefore, leads to increased risk of cancer development. We have performed a case–control study considering the role of the –308G >A polymorphism in 750 individuals from the northern region of Portugal, including 123 patients with nasopharyngeal carcinoma (NPC) and 627 healthy individuals. Our study revealed an increased frequency of the –308A *TNFA* allele in patients with NPC. The statistical analysis for recessive model revealed that –308AA genotype is associated with increased risk for the development of NPC (odds ratio = 2.46; 95% confidence interval, 0.98–6.17;  $p = 0.047$ ); moreover, this effect was stronger in undifferentiated types, which are virtually 100% caused by the Epstein-Barr virus (odds ratio = 2.75; 95% confidence interval, 1.09–6.90;  $p = 0.025$ ). These results reveal that in our population –308 *TNFA* AA genotype can represent a risk marker for NPC development and contributes for the definition of genetic susceptibility profiles for individuals at risk of development of a viral infection and associated neoplasia.

### AU2 ► Introduction

IT IS CURRENTLY ACCEPTED that some viruses have oncogenic properties and viral-associated neoplasias represent nowadays almost 16% of all human cancer cases (Vousden and Farrell, 1994; Farrell, 2002). Oncogenic viruses have the ability to target different cellular pathways to inhibit host immune responses and to control the cell cycle progression, giving rise to proliferating cells with new phenotypes (Kuppers, 2003).

Among the several oncogenic viruses, the Epstein-Barr virus (EBV) is one of the most common, leading to latent infection with a minimum viral activity only to allow viral persistence. Despite the oncogenic potential of these viruses, not all infected individuals will develop disease, and there are still several questions to be answered in what concerns to the progression from infection to cancer (Zur Hausen, 2001, 2009).

Nowadays, it is well established that cancer has a multifactorial etiology and that host genetic factors are extremely important in determining the outcome of infections caused by infectious pathogens (Kuppers, 2003; Zur Hausen, 2009).

Recently, it has been discussed that deficiencies in the immune response to viral infections can be important in the different individual susceptibilities for viral-associated cancer development (Hurme, 1998; Wang *et al.*, 1998; Beck *et al.*, 2001; Wang and Armstrong, 2007; Wang *et al.*, 2009).

The role of immunologic factors is particularly evident in chronic/persistent infections with agents such as EBV, which reside in a state of persistence, and where they can balance the equilibrium between host immunity and pathogen multiplication. One of the most important factors in the immune response to viral infections is the tumor necrosis factor-alpha (TNF- $\alpha$ ), expressed by the *TNFA* gene, a strong proinflammatory cytokine produced by the activated macrophages (Wilson and Duff, 1995; Wilson *et al.*, 1995; Dranoff, 2004; Daniel and Wilson, 2008). Different studies suggested that this cytokine has different functions depending on its concentration: lower concentrations seem to protect the cell from viral infections, whereas higher concentrations seem to deregulate the immune response acting as cancer promoter. Several studies revealed that a polymorphism within the promoter region of the *TNFA* gene (position –308), consisting

<sup>1</sup>Molecular Oncology Group, Porto, Portugal.

<sup>2</sup>Molecular Virology Laboratory of Virology Service, Porto, Portugal.

<sup>3</sup>ICBAS, Abel Salazar Institute for the Biomedical Sciences, University of Porto, Porto, Portugal.

<sup>4</sup>Otorrinolaryngology Service, Portuguese Institute of Oncology of Porto, Porto, Portugal.

of a single nucleotide modification from guanine (G) to adenine (A), seems to play a role in the balance of TNF- $\alpha$  levels (Kroeger *et al.*, 1997, 2000; Wilson *et al.*, 1997; Dranoff, 2004; Wang and Armstrong, 2007). These studies established that the A allele is associated with increased levels of TNF- $\alpha$  and, as a consequence, leads to increased risk of cancer development (Tsai *et al.*, 2002; Machado *et al.*, 2003; Ho *et al.*, 2004; Duarte *et al.*, 2005; Ho *et al.*, 2006; Canedo *et al.*, 2008). Wu *et al.* (2002) reported that this polymorphism is correlated with an increased susceptibility and severity of viral infection, and therefore, it can play a role in the susceptibility of virus-associated neoplasias. Moreover, previous studies in Portuguese populations had established that the -308 TNFA polymorphism increases the risk for both gastric adenocarcinoma and cervical cancer (Machado *et al.*, 2003; Duarte *et al.*, 2005; Canedo *et al.*, 2008).

We aimed to characterize the role of the -308G > A TNFA polymorphism in nasopharyngeal carcinoma (NPC) development within a southern European population from the northern region of Portugal. Despite several studies have been made in different populations, more data are necessary to establish if this can be a specific genetic marker for cancer development in our population.

## Methods

### Type of study, cases, and specimens

We have developed a hospital-based case-control study considering patients diagnosed with NPC ( $n = 123$ , 87 males and 36 females) and healthy individuals without evidence of neoplastic disease ( $n = 627$ , 316 males and 311 females), who were Caucasian individuals from the northern region of Portugal (Table 1).

All NPC patients were attended at the Otorrinolaryngology Department of the Portuguese Institute of Oncology of Porto and diagnosis was histologically confirmed by a senior pathologist at the institution. Tumor-node-metastasis stage classification was made according to the World Health Organization: type I (keratinizing squamous cell carcinoma) and type II (nonkeratinizing squamous cell carcinoma), which were combined as well or moderately differentiated NPC ( $n = 12$ ), and type III or undifferentiated NPC (UNPC,  $n = 111$ ).

TABLE 1. DISTRIBUTION OF CLINICAL DATA IN CASES AND CONTROLS INCLUDED IN THE STUDY

	Patients	Controls
Gender, no. (%)		
Female	36 (29.3)	311 (49.6)
Male	87 (70.7)	316 (50.4)
Age, year (mean $\pm$ SD)	47.1 $\pm$ 14.1	41.7 $\pm$ 11.5
Histological type, no.		
WMDNPC	12	
UNPC	111	
Clinical stage, <sup>a</sup> no.		
I, II, and III	69	
IV	49	

<sup>a</sup>Patients with missing data were not included.

SD, standard deviation; WMDNPC, well or moderately differentiated nasopharyngeal cancer; UNPC, undifferentiated nasopharyngeal cancer.

Healthy controls were randomly selected from a blood donors source clinically evaluated from our institution and the selection criteria for controls included no individual history of cancer.

All individuals included in the study gave their informed consent according to the Declaration of Helsinki.

### Sample collection and DNA extraction

Peripheral blood samples (8–10 mL) were collected following standard venipuncture technique in EDTA-containing tubes, and the DNA was extracted from the white blood cell fraction using a salting-out protocol (Mullenbach *et al.*, 1989). The presence of viable genomic DNA was previously tested with PCR protocols for house-keeping genes.

### -308G/A TNF- $\alpha$ polymorphism analysis

The -308G/A TNFA polymorphism analysis was carried out using TaqMan<sup>®</sup> SNP Genotyping Assay C\_7514879\_10 (Applied Biosystems, Foster City, CA). Reactions were performed on an Applied Biosystems 7300 Real Time PCR System (Applied Biosystems) with a 5  $\mu$ L final volume mixture containing 1  $\times$  TaqMan Genotyping Master Mix (Applied Biosystems), 900 nM of each primer, 200 nM of probes labeled with either FAM or VIC, and 10 ng of extracted DNA. Thermal cycling conditions were 10 min at 95°C, followed by 40 cycles of 15 s at 95°C and 1 min at 60°C. Allelic discrimination was performed by measuring end-point fluorescence using ABI PRISM<sup>®</sup> Sequence Detection System (Applied Biosystems).

All samples were genotyped on 96-well plates, using the genotyping assay that has been already validated by Applied Biosystems, and results were independently analyzed by two of the authors. Afterward, 10% of all samples were randomly selected and resubmitted to a new genotyping where the concordance of genotypes was 100% among duplicates.

### Statistical analysis

To compare the categorical variables we have used the computer software SPSS (version 16.0) for Windows. The odds ratio (OR) and its 95% confidence interval (CI) were calculated by chi-square ( $\chi^2$ ) test with a 5% level of significance as a measure of the association between the genotypes (-308GG vs. -308AA; dominant model: -308GG vs. -308A carriers; additive model: -308GA vs. -308AA; and recessive model: -308G carriers vs. -308AA) and the categorical variables (mean age at diagnosis, gender, histological type of NPC, and tumor-node-metastasis stage categorized as stages I-III vs. IV). Fisher's exact test was used for tables containing cells where values are less than five individuals.

The power of analysis was calculated with the PS Power and Sample Size Calculations software, version 3.0, available at <http://biostat.mc.vanderbilt.edu/twiki/bin/view/Main/PowerSampleSize>. We have also calculated the attributable proportion (AP) given by the following formula:  $AP = PRF \times (1 - 1/OR)$  (PRF, percentage of risk factor), which represents the proportion of cases that can be imputed to the influence of a particular factor.

TABLE 2. RISK ANALYSIS OF -308 BP TUMOR NECROSIS FACTOR-ALPHA GENOTYPES AMONG NASOPHARYNGEAL CARCINOMA PATIENTS

	-308GG n (%)	-308GA n (%)	-308AA n (%)		p	OR	95% CI
Controls ( <i>n</i> = 627)	442 (70.5)	170 (27.1)	15 (2.4)			1.00	Reference
NPC ( <i>n</i> = 123)	84 (68.3)	32 (26.0)	7 (5.7)	(a)	0.625	1.11	0.72–1.72
				(b)	0.050	2.46	0.88–6.66
				(c)	0.060	2.48	0.84–7.16
				(d)	<b>0.047</b>	<b>2.46</b>	<b>0.98–6.17</b>
UNPC ( <i>n</i> = 111)	75 (67.6)	29 (26.1)	7 (6.3)	(a)	0.534	1.15	0.73–1.81
				(b)	<b>0.026</b>	<b>2.75</b>	<b>0.98–7.49</b>
				(c)	<b>0.038</b>	<b>2.74</b>	<b>0.92–7.97</b>
				(d)	<b>0.025</b>	<b>2.75</b>	<b>1.09–6.90</b>
WMDNPC ( <i>n</i> = 12)	9 (75.0)	3 (25.0)	—		1.000*	†	†

p value, Pearson  $\chi^2$ ; OR, odds ratio; CI, confidence interval;  $\chi^2$  test was performed comparing: (a) -308GG versus -308A carriers (dominant model); (b) -308GG versus -308AA; (c) -308GA versus -308AA (additive model); and (d) -308G carriers versus -308AA (recessive model).

\*Two-tailed Fisher's exact test value.

†Not calculated because of low number of WMDNPC cases (*n* = 12).

## Results

### Frequency distribution

T2 ▶ The distribution of the three different genotypes of -308 TNF- $\alpha$  polymorphism among cases and controls and associated risk of NPC development is shown in Table 2. From the 123 NPC cases, 68.3% were found to be homozygous for the G allele, 26.0% were heterozygous, and 5.7% homozygous for the A allele; in the 627 healthy individuals the frequencies were 70.5%, 27.1%, and 2.4%, respectively. Despite the differences found in the frequencies of -308 TNF- $\alpha$  polymorphism, there were no significant differences between the genotype distribution among patients and controls. Nevertheless, all genotypic distributions are in Hardy-Weinberg equilibrium ( $p > 0.05$ ).

### Risk estimates for NPC

Statistical analysis revealed that significant results could only be found when comparing -308T allele carriers versus -308AA (Table 2). Despite similar values, this study reveals that patients with homozygous -308A allele are at increased risk of NPC development (OR = 2.46; 95% CI, 0.98–6.17;  $p = 0.047$ ), and this effect was even stronger in UNPC (OR = 2.75; 95% CI, 1.09–6.90;  $p = 0.025$ ). We found that the AP for the -308 TNF- $\alpha$  A allele homozygous is 3.38% and 4.00% for NPC and UNPC development, respectively, and moreover, the power of the study was calculated as 50%.

T3 ▶ No significant associations were found when stratifying the analysis according to gender, or when comparing NPC cases according to the clinicopathological data, such as gender, histological data, and clinical stage (Table 3).

## Discussion

During NPC carcinogenesis, several EBV latent proteins are expressed and infected cells start to escape the host immune system and become resistant to the cytotoxic effect of the TNF- $\alpha$  (Wu *et al.*, 2002). The role of TNF- $\alpha$  is extremely important in host immune response to viral infections where

it acts as a necrosis factor in normal tissues, but also can contribute for the establishment of viral pathogenicity with the establishment of a proinflammatory environment (Pillai *et al.*, 1989). Additionally, there are some studies suggesting the circumstantial evidence that abundant secretion of TNF- $\alpha$  by EBV-infected cells may be responsible for the distinctive features characterizing EBV-associated malignancies (Tao and Wasik, 2001). As a proinflammatory cytokine, TNF- $\alpha$  is involved in the regulation of B-cell differentiation, and its expression leads to necrosis, karyorrhexis, and proliferation and maturation of lymphoid cells, which occur in EBV-associated malignancies (Wu *et al.*, 2002, 2008).

The controversy on the role of TNF- $\alpha$  in disease was widely studied and nowadays we know that TNF- $\alpha$  levels are quite important to the definition of which profile will be activated in the tissue. A few studies suggest that at higher levels, TNF- $\alpha$  induces the activation of angiogenic pathways in the local tissue, providing selective growth advantage to the cells, which therefore may evolve to cancer (Eksteen *et al.*, 2001; Dranoff, 2004).

TABLE 3. ASSOCIATION OF -308 TUMOR NECROSIS FACTOR-ALPHA GENOTYPES WITH CLINICOPATHOLOGICAL PARAMETERS IN NASOPHARYNGEAL CARCINOMA PATIENTS

	GG n (%)	GA n (%)	AA n (%)	p
Gender ( <i>n</i> = 123)				
Female ( <i>n</i> = 36)	27 (75.0)	6 (16.7)	3 (8.3)	
Male ( <i>n</i> = 87)	57 (65.5)	26 (29.9)	4 (4.6)	0.334
Age of onset ( <i>n</i> = 123)				
<49 years old	40 (65.6)	18 (29.5)	3 (4.9)	
≥49 years old	44 (71.0)	14 (22.6)	4 (6.5)	0.714
Histological type ( <i>n</i> = 123)				
WMDNPC ( <i>n</i> = 12)	9 (75.0)	3 (25.0)	—	
UNPC ( <i>n</i> = 111)	75 (67.6)	29 (26.1)	7 (6.3)	0.654
Clinical stage ( <i>n</i> = 118)				
I, II, and III ( <i>n</i> = 69)	46 (66.7)	18 (26.1)	5 (7.2)	
IV ( <i>n</i> = 49)	34 (69.4)	13 (26.5)	2 (4.1)	0.772

$\chi^2$  test was performed comparing -308G carriers versus -308AA (recessive model).



Genetic alterations are supposed to play important roles in the definition of host factors that may influence the susceptibility to viral infections or cancer development (Duarte *et al.*, 2005; Cardoso *et al.*, 2006; Catarino *et al.*, 2006; Santos *et al.*, 2006; Sousa *et al.*, 2006; Coelho *et al.*, 2007; Sousa *et al.*, 2007; Catarino *et al.*, 2008; Oliveira *et al.*, 2008). Polymorphisms on the *TNFA* promoter have been described as affecting the binding of transcription factors and therefore controlling the activity of the promoter and, as a consequence, the mRNA and protein levels. The  $-308G > A$  polymorphism has been associated with differential regulation and the  $-308A$  allele has been associated with higher levels of TNF- $\alpha$  favoring the development of several infectious diseases, including viral-associated neoplasias (Kroeger *et al.*, 1997; Wilson *et al.*, 1997; Kroeger *et al.*, 2000; Machado *et al.*, 2003). Nevertheless, the differences between the TNF- $\alpha$  levels are not clear and some authors insist that there is no significant differences between the low and high producer alleles (G or A, respectively) (Brinkman *et al.*, 1995; Stuber *et al.*, 1995).

Despite these controversial evidences, there is still a lack of research considering the role of the  $-308G > A$  *TNFA* polymorphism in EBV-associated malignancies. From the few reports that have been published regarding the role of this polymorphism in cancer development, only two papers have studied NPC (Tsai *et al.*, 2002; Ho *et al.*, 2006), and moreover, there are only two more articles regarding the role of this polymorphism in EBV-associated malignancies (Wu *et al.*, 2002; Babel *et al.*, 2007). Surprisingly, there is no concordance on the results, although all studies suggest that this polymorphism still requires further studies to investigate how it can interfere with EBV infection susceptibility and associated cancer development.

In our study we intend to show if there was any association between the genetically acquired ability to produce higher levels of TNF- $\alpha$  and an increased risk to develop NPC, an EBV-associated malignancy. Despite our study reveals that  $-308AA$  homozygous are at increased risk of NPC development, we are aware that the sample size can be a limitation in this study. Nevertheless, the role of the  $-308AA$  genotype is clearer on the particular case of the UNPC type, which is associated with EBV infection in over 95% of the cases. Assuming that the A allele induces higher expression of TNF- $\alpha$ , the increase of angiogenesis will favor the growth of infected cells and therefore provide a favorable environment for the viral infection to spread. Therefore, our results substantiate this hypothesis and contribute for the understanding of the genetic predisposition of some individuals to higher susceptibility to viral infections and mainly to viral-associated neoplasias.

This finding that  $-308$  *TNFA* polymorphism is linked to increased susceptibility of developing NPC may be a major step toward the understanding of biological and physiological alterations that may precede NPC carcinogenesis. This is the first study considering the role of this polymorphism in NPC development within western civilizations characterized by low incidence rates. Our data revealed that the  $-308AA$  *TNFA* genotype is correlated with NPC development, contributing for the definition of a genetic profile for risk markers that may favor NPC development in our population.

According to published data, the  $-308$  *TNFA* polymorphism is being consistently associated to cancer development

in Portugal (Machado *et al.*, 2003; Duarte *et al.*, 2005; Canedo *et al.*, 2008), which in addition with the results we describe in this article suggest that  $-308$  *TNFA* polymorphism can be a key genetic marker for cancer development in the Portuguese population. Although it might be extremely important within the Portuguese population, further studies may help to understand the role of this polymorphism in the behavior and prognosis of this neoplasia.

#### Acknowledgments

The authors are grateful to Professor Paul J. Farrell from the Virology Department of Imperial College Faculty of Medicine, London, United Kingdom, and Professor Joseph Pagano from the Comprehensive Cancer Centre of North Carolina University, North Carolina, for their constructive criticisms on an earlier draft of this manuscript, and to the Portuguese League Against Cancer (Liga Portuguesa Contra o Cancro-Núcleo Regional do Norte. The authors also acknowledge the financial support by an individual grant for Doctoral degree of the first author from the Minister of Science, Technology and Superior Education-FCT (Fundação para a Ciência e Tecnologia: SFRH/BD/40718/2007) and the funding of this work by the Portuguese Ministry of Health-Comissão Fomento Investigação em Cuidados de Saúde (48/2005).

#### Disclosure Statement

No competing financial interests exist.

#### References

- Babel, N., Vergopoulos, A., Trappe, R.U., Oertel, S., Hammer, M.H., Karaivanov, S., *et al.* (2007). Evidence for genetic susceptibility towards development of posttransplant lymphoproliferative disorder in solid organ recipients. *Transplantation* **84**, 387–391.
- Beck, A., Pazolt, D., Grabenbauer, G.G., Nicholls, J.M., Herbst, H., Young, L.S., *et al.* (2001). Expression of cytokine and chemokine genes in Epstein-Barr virus-associated nasopharyngeal carcinoma: comparison with Hodgkin's disease. *J Pathol* **194**, 145–151.
- Brinkman, B.M., Zuijdeest, D., Kaijzel, E.L., Breedveld, F.C., and Verweij, C.L. (1995). Relevance of the tumor necrosis factor alpha (TNF alpha)  $-308$  promoter polymorphism in TNF alpha gene regulation. *J Inflamm* **46**, 32–41.
- Canedo, P., Duraes, C., Pereira, F., Regalo, G., Lunet, N., Barros, H., *et al.* (2008). Tumor necrosis factor alpha extended haplotypes and risk of gastric carcinoma. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* **17**, 2416–2420.
- Cardoso, C.S., Araujo, H.C., Cruz, E., Afonso, A., Mascarenhas, C., Almeida, S., *et al.* (2006). Haemochromatosis gene (HFE) mutations in viral-associated neoplasia: linkage to cervical cancer. *Biochem Biophys Res Commun* **341**, 232–238.
- Catarino, R., Pereira, D., Breda, E., Coelho, A., Matos, A., Lopes, C., *et al.* (2008). Oncogenic virus-associated neoplasia: a role for cyclin D1 genotypes influencing the age of onset of disease? *Biochem Biophys Res Commun* **370**, 118–122.
- Catarino, R.J., Breda, E., Coelho, V., Pinto, D., Sousa, H., Lopes, C., *et al.* (2006). Association of the A870G cyclin D1 gene polymorphism with genetic susceptibility to nasopharyngeal carcinoma. *Head Neck* **28**, 603–608.
- Coelho, A., Matos, A., Catarino, R., Pinto, D., Sousa, H., Pereira, D., *et al.* (2007). The influence of chemokine receptor CCR2

- genotypes in the route to cervical carcinogenesis. *Gynecol Obstet Invest* **64**, 208–212.
- Daniel, D., and Wilson, N.S. (2008). Tumor necrosis factor: renaissance as a cancer therapeutic? *Curr Cancer Drug Targets* **8**, 124–131.
- Dranoff, G. (2004). Cytokines in cancer pathogenesis and cancer therapy. *Nat Rev Cancer* **4**, 11–22.
- Duarte, I., Santos, A., Sousa, H., Catarino, R., Pinto, D., Matos, A., *et al.* (2005). G-308A TNF-alpha polymorphism is associated with an increased risk of invasive cervical cancer. *Biochem Biophys Res Commun* **334**, 588–592.
- Eksteen, J.A., Scott, P.A., Perry, I., and Jankowski, J.A. (2001). Inflammation promotes Barrett's metaplasia and cancer: a unique role for TNFalpha. *Eur J Cancer Prev* **10**, 163–166.
- Farrell, P.J. (2002). Tumour viruses—could they be an Achilles' heel of cancer? *Eur J Cancer* **38**, 1815–1816.
- Ho, S.Y., Wang, Y.J., Chen, H.L., Chen, C.H., Chang, C.J., Wang, P.J., *et al.* (2004). Increased risk of developing hepatocellular carcinoma associated with carriage of the TNF2 allele of the –308 tumor necrosis factor-alpha promoter gene. *Cancer Causes Control* **15**, 657–663.
- Ho, S.Y., Wang, Y.J., Huang, P.C., Tsai, S.T., Chen, C.H., Chen, H.H., *et al.* (2006). Evaluation of the associations between the single nucleotide polymorphisms of the promoter region of the tumor necrosis factor-alpha gene and nasopharyngeal carcinoma. *J Chin Med Assoc* **69**, 351–357.
- Hurme, M. (1998). [Is susceptibility to infections in the genes?]. *Duodecim* **114**, 733–734.
- Kroeger, K.M., Carville, K.S., and Abraham, L.J. (1997). The –308 tumor necrosis factor-alpha promoter polymorphism effects transcription. *Mol Immunol* **34**, 391–399.
- Kroeger, K.M., Steer, J.H., Joyce, D.A., and Abraham, L.J. (2000). Effects of stimulus and cell type on the expression of the –308 tumour necrosis factor promoter polymorphism. *Cytokine* **12**, 110–119.
- Kuppers, R. (2003). B cells under influence: transformation of B cells by Epstein-Barr virus. *Nat Rev Immunol* **3**, 801–812.
- Machado, J.C., Figueiredo, C., Canedo, P., Pharoah, P., Carvalho, R., Nabais, S., *et al.* (2003). A proinflammatory genetic profile increases the risk for chronic atrophic gastritis and gastric carcinoma. *Gastroenterology* **125**, 364–371.
- Mullenbach, R., Lagoda, P.J., and Welter, C. (1989). An efficient salt-chloroform extraction of DNA from blood and tissues. *Trends Genet* **5**, 391.
- Oliveira, S., Sousa, H., Santos, A.M., Pinto, D., Pinto-Correia, A.L., Fontoura, D., *et al.* (2008). The p53 R72P polymorphism does not influence cervical cancer development in a Portuguese population: a study in exfoliated cervical cells. *J Med Virol* **80**, 424–429.
- Pillai, S., Bikle, D.D., Eessalu, T.E., Aggarwal, B.B., and Elias, P.M. (1989). Binding and biological effects of tumor necrosis factor alpha on cultured human neonatal foreskin keratinocytes. *J Clin Invest* **83**, 816–821.
- Santos, A.M., Sousa, H., Pinto, D., Portela, C., Pereira, D., Catarino, R., *et al.* (2006). Linking TP53 codon 72 and P21 nt590 genotypes to the development of cervical and ovarian cancer. *Eur J Cancer* **42**, 958–963.
- Sousa, H., Santos, A.M., Catarino, R., Pinto, D., Vasconcelos, A., Lopes, C., *et al.* (2006). Linkage of TP53 codon 72 pro/pro genotype as predictive factor for nasopharyngeal carcinoma development. *Eur J Cancer Prev* **15**, 362–366.
- Sousa, H., Santos, A.M., Pinto, D., and Medeiros, R. (2007). Is the p53 codon 72 polymorphism a key biomarker for cervical cancer development? A meta-analysis review within European populations. *Int J Mol Med* **20**, 731–741.
- Stuber, F., Udalova, I.A., Book, M., Drutskaya, L.N., Kuprash, D.V., Turetskaya, R.L., *et al.* (1995). –308 tumor necrosis factor (TNF) polymorphism is not associated with survival in severe sepsis and is unrelated to lipopolysaccharide inducibility of the human TNF promoter. *J Inflamm* **46**, 42–50.
- Tao, J., and Wasik, M.A. (2001). Epstein-Barr virus associated polymorphic lymphoproliferative disorders occurring in nontransplant settings. *Lab Invest* **81**, 429–437.
- Tsai, M.H., Chen, W.C., and Tsai, F.J. (2002). Correlation of p21 gene codon 31 polymorphism and TNF-alpha gene polymorphism with nasopharyngeal carcinoma. *J Clin Lab Anal* **16**, 146–150.
- Vousden, K.H., and Farrell, P.J. (1994). Viruses and human cancer. *Br Med Bull* **50**, 560–581.
- Wang, D., Dubois, R.N., and Richmond, A. (2009). The role of chemokines in intestinal inflammation and cancer. *Curr Opin Pharmacol* **9**, 688–696.
- Wang, J.M., Deng, X., Gong, W., and Su, S. (1998). Chemokines and their role in tumor growth and metastasis. *J Immunol Methods* **220**, 1–17.
- Wang, Y., and Armstrong, S.A. (2007). Genome-wide SNP analysis in cancer: leukemia shows the way. *Cancer Cell* **11**, 308–309.
- Wilson, A.G., di Giovine, F.S., and Duff, G.W. (1995). Genetics of tumour necrosis factor-alpha in autoimmune, infectious, and neoplastic diseases. *J Inflamm* **45**, 1–12.
- Wilson, A.G., and Duff, G.W. (1995). Tumor necrosis factor. *Lancet* **345**, 649.
- Wilson, A.G., Symons, J.A., McDowell, T.L., McDevitt, H.O., and Duff, G.W. (1997). Effects of a polymorphism in the human tumor necrosis factor alpha promoter on transcriptional activation. *Proc Natl Acad Sci USA* **94**, 3195–3199.
- Wu, G.Y., Wang, X.M., Keese, M., Hasenberg, T., and Sturm, J.W. (2008). [Association between tumor necrosis factor alpha gene polymorphism and colorectal cancer]. *Zhonghua Wei Chang Wai Ke Za Zhi* **11**, 569–571.
- Wu, M.S., Huang, S.P., Chang, Y.T., Shun, C.T., Chang, M.C., Lin, M.T., *et al.* (2002). Tumor necrosis factor-alpha and interleukin-10 promoter polymorphisms in Epstein-Barr virus-associated gastric carcinoma. *J Infect Dis* **185**, 106–109.
- Zur Hausen, H. (2001). Oncogenic DNA viruses. *Oncogene* **20**, 7820–7823.
- Zur Hausen, H. (2009). The search for infectious causes of human cancers: where and why. *Virology* **392**, 1–10.

Address correspondence to:

Hugo Sousa

Grupo de Oncologia Molecular—CI

Laboratórios 4° Piso

Instituto Português de Oncologia do Porto FG, EPE

Rua Dr. António Bernardino Almeida

4200-072 Porto

Portugal

E-mail: hugo.sousa@ipopoporto.min-saude.pt,

hugomls@gmail.com

◀AU3

Received for publication May 23, 2010; received in revised form July 23, 2010; accepted July 26, 2010.



**AUTHOR QUERY FOR DNA-2010-1086-SOUSA\_1P**

AU1: Please italicize all the gene symbols mentioned in the article.

AU2: Refs. style of the article has been changed to comply with the Ref. style of this journal. Please check.

AU3: Please mention the degrees of the corresponding author.

AU4: In Table 2, please mention the significance of bold values.