



Universidad de Oviedo

Programa de doctorado de Biomedicina y Oncología  
Molecular

“Análisis genético-molecular en la  
transformación maligna de los  
papilomas invertidos nasosinusales”

TESIS DOCTORAL

*Marta Menéndez del Castro*

2023





Universidad de Oviedo

Programa de doctorado de Biomedicina y Oncología  
Molecular

“Análisis genético-molecular en la  
transformación maligna de los  
papilomas invertidos nasosinusales”

TESIS DOCTORAL

Autor:  
Marta Menéndez del Castro  
2023

Directores:  
César Antonio Álvarez Marcos  
Mario Hermsen



relación entre VPH y peor supervivencia global y específica ( $p=0,048$ ), y en 0% CEN, observando diferencia entre todos los grupos ( $p<0,001$ ).

**Conclusiones:** En nuestro estudio se ha visto una mayor expresión de la proteína p16 en lesiones benignas (PI), descenso en PI-CEN y mínima expresión en CEN, relacionando la pérdida de expresión con el desarrollo de recidivas en PI y con un mayor estadio tumoral en PI-CEN. Por tanto, podría tratarse de un marcador de mal pronóstico en estos pacientes. La expresión de p53 se relacionó con la presencia de metástasis ganglionares en CEN. La mutación de EGFR en el exón 20 es habitual en estas lesiones, siendo más frecuente en PI-CEN y PI que en CEN. No se hallaron mutaciones en KRAS. Estos hechos podrían ser importantes en el futuro de cara al tratamiento con nuevas terapias dirigidas. La infección por VPH fue baja en PI, no pareciendo tener un factor determinante en su etiología al menos en nuestra área geográfica, pero aumenta su expresión en PI-CEN, mostrando que sí puede estar implicada en su transformación maligna.

### RESUMEN (en Inglés)

**Introduction and objective:** Inverted papilloma (IP) is the most frequent benign sinonasal tumor. Despite its benign histology, it exhibits an aggressive behavior due to its tendency towards recurrence (IPr) and malignant transformation, especially towards sinonasal squamous cell carcinoma (SCC). Malignant transformation can occur in two ways: synchronously with IP (IP-SCCs) or metachronously (IP-SCCm). The aim of this study was to evaluate human papillomavirus (HPV) infection and genetic and protein alterations in a sample composed of IP, malignant inverted papillomas (IP-SCC), and SCC, in order to define a progression model and determine its possible prognostic value.

**Material and Methods:** We conducted a retrospective study of surgically treated patients at the Hospital Universitario Central de Asturias with diagnoses of IP, IP-SCC, and SCC. We analyzed a total of 116 samples (49 IP, 15 IP-SCC, and 52 SCC) corresponding to 102 patients. We analyzed p16, p53, pEGFR and EGFR proteins expression by immunohistochemistry (IHQ), EGFR (exon 20) and KRAS (exon 2) mutations, TP53, CDKN2A, and EGFR genes copies, as well as HPV infection using polymerase chain reaction (PCR).

**Results:** p16 expression was 92% in IP, decreasing in patients with recurrences ( $p=0,021$ ), 42% in IP-SCC, with more advanced stages showing negative expression ( $p=0,030$ ), and 14% in SCC. p16 expression was higher in IP than IP-SCC ( $p<0,001$ ), and higher in IP-SCC than SCC ( $p=0,024$ ). Moreover, IP that subsequently presented IP-CENm expressed less p16 than the rest of the IP ( $p=0,050$ ). p53 expression was positive in 57% of IP, 67% of IP-SCC, and 69% of SCC. In SCC, p53 was related to the N+ category ( $p=0,013$ ). pEGFR expression was 57% in IP, 50% in IP-SCC, and 37% in SCC. It was higher in IP than in SCC ( $p=0,038$ ). EGFR expression was 88% in IP, 67% in IP-SCC, obtaining a relationship between its expression and a higher disease-free survival ( $p=0,01$ ), and 40% in SCC. The expression was higher in IP than in IP-SCCs ( $p=0,036$ ) and in SCC ( $p<0,001$ ). EGFR was mutated in 41% of IP, 55% of IP-SCC, and 7% of SCC ( $p=0,030$ ). No KRAS mutations were found. Loss of copies of CDKN2A was present in 5% of IP, 33% of IP-SCC (50% of IP-SCCm), and 23% of SCC. EGFR gain was observed in 11% of IP, 29% of IP-SCC (67% of IP-SCCs), and 19% of SCC. No alterations in TP53 copy number were observed in IP, but loss was present in 17% of IP-SCC (50% of IP-SCCs), and 5% of SCC. VPH infection was detected in 6% of IP, 46% of IP-SCC, with a relationship between VPH and worse overall and specific survival ( $p=0,048$ ), and 0% of SCC, showing a difference between all groups ( $p<0,001$ ).





Universidad de Oviedo

**Conclusions:** In our study, a higher expression of the p16 protein was observed in benign lesions (IP), decreasing in IP-SCC and showing minimal expression in SCC, with the loss of expression being related to the development of recurrences in IP and a higher tumor stage in IP-SCC. Therefore, it could be a marker of poor prognosis in these patients. The expression of p53 was related to the presence of lymph node metastasis in SCC. EGFR mutation in exon 20 is common in these lesions, being more frequent in IP-SCC and IP than in SCC. No mutations were found in KRAS. These findings could be important in the future for treatment with new targeted therapies. HPV infection was low in IP, and did not seem to have a determining factor in its etiology, but its expression increases in IP-SCC, showing that it may be involved in its malignant transformation.

**SR. PRESIDENTE DE LA COMISIÓN ACADÉMICA DEL PROGRAMA DE DOCTORADO  
EN BIOMEDICINA Y ONCOLOGÍA MOLECULAR**



*A mi familia*



# AGRADECIMIENTOS

No quisiera comenzar esta Tesis Doctoral sin mostrar mi agradecimiento a todas aquellas personas sin las que hubiese sido imposible realizar este trabajo.

Comenzando por mis directores de Tesis. Al Prof. César Antonio Álvarez Marcos, por su rigor y paciencia tanto en el ámbito clínico como en el de la investigación, por su infatigable sed de nuevos conocimientos y retos y por su tutela, tanto en esta tesis como en mi formación como otorrinolaringóloga. No estaría escrita de no ser por ti. Al Dr. Mario Hermsen, por su valiosa colaboración en el laboratorio y por iniciarme en el mundo de la biología molecular.

Al personal del laboratorio de Cáncer de Cabeza y Cuello del ISPA, sin el cual no sería posible esta tesis.

A todo el servicio de Otorrinolaringología del Hospital Universitario Central de Asturias. Todos vosotros me habéis enseñado algo, y es un honor poder aplicarlo cada día. En especial, al Prof. José Luis Llorente, para mí un ejemplo tanto profesional como personal. A mi tutor durante la residencia, el Dr. Fernando López, por toda la ayuda prestada durante la residencia y que todavía se mantiene en la actualidad.

Especialmente a mis compañeros de especialidad, porque en los momentos más duros son los que mejor te entienden. Gracias por esas comidas en la cafetería y esas tardes haciendo sesiones (y más cosas) en la sala, sin duda sois de las mejores cosas que me llevo de esta etapa.

Por último, y lo más importante, a mi familia. Por su apoyo incondicional y porque este trabajo no sería posible sin ellos, gracias.



# ÍNDICE

ABREVIATURAS.....	15
BASES PREVIAS .....	17
1. INTRODUCCIÓN.....	19
1.1. Papiloma Invertido (PI) y Cáncer Escamoso Nasosinusal (CEN).....	21
1.1.1. Epidemiología.....	23
1.1.2. Etiología y oncogénesis .....	23
1.1.3. Localización y clínica.....	25
1.1.4. Diagnóstico.....	26
1.1.5. Estadificación.....	34
1.1.6. Tratamiento.....	36
1.1.7. Pronóstico .....	38
1.2. Estado actual .....	41
2. HIPÓTESIS-MODELO TEÓRICO.....	47
3. OBJETIVOS.....	53
4. MATERIAL Y MÉTODO .....	57
4.1. Características del estudio.....	59
4.2. Selección de pacientes.....	59
4.3. Recogida de muestras .....	62
4.4. Procedimiento inmunohistoquímico.....	62
4.4.1. Técnica de los <i>tissue-array</i> .....	62
4.4.2. Técnica inmunohistoquímica .....	63
4.4.3. Interpretación .....	65
4.5. Extracción del ADN.....	67
4.6. Técnica de PCR .....	69
4.7. Técnica de MLPA .....	70
4.7.1. Fundamento de la técnica.....	70
4.7.2. Protocolo del experimento .....	72
4.7.3. Sondas empleadas.....	73
4.7.4. Interpretación .....	73
4.8. Virus del Papiloma Humano (VPH).....	74
4.9. Descripción de las variables .....	75
4.10. Análisis estadístico .....	76
5. RESULTADOS .....	79
5.1. Aspectos clínico-patológicos .....	81

5.1.1.	Características de PI .....	81
5.1.2.	Características de PI-CEN .....	83
5.1.3.	Características de CEN.....	85
5.2.	Análisis de expresión proteica.....	90
5.2.1.	Expresión en PI .....	91
5.2.2.	Expresión en PI-CEN .....	93
5.2.3.	Expresión en CEN .....	95
5.2.4.	Comparación de expresión proteica entre los grupos .....	97
5.3.	Aspectos genéticos.....	99
5.3.1.	Análisis de ganancia/pérdida de <i>TP53</i> , <i>CDKN2A</i> y <i>EGFR</i> .....	99
5.3.2.	Análisis de mutaciones en <i>EGFR</i> y <i>KRAS</i> .....	102
5.4.	Infección por Virus del Papiloma Humano.....	104
5.4.1.	VPH en PI .....	104
5.4.2.	VPH en PI-CEN .....	104
5.4.3.	VPH en CEN .....	106
5.4.4.	Comparación de infección por VPH entre los grupos .....	106
5.4.5.	Relación entre VPH y la expresión de p53, p16, pEGFR y EGFR.....	106
6.	DISCUSIÓN.....	109
6.1.	Justificación .....	111
6.2.	Aspectos clínico-patológicos .....	111
6.3.	Aspectos de expresión proteica y genéticos.....	113
6.4.1.	Expresión proteica de p16 y alteraciones en <i>CDKN2A</i> en PI, PI-CEN y CEN .....	114
6.4.2.	Expresión proteica de p53 y alteraciones en <i>TP53</i> en PI, PI-CEN y CEN .....	116
6.4.3.	Expresión proteica de EGFR y pEGFR y alteraciones en <i>EGFR</i> en .....	117
6.4.4.	PI, PI-CEN Y CEN.....	117
6.4.5.	Alteraciones en <i>KRAS</i> .....	120
6.4.	Infección por VPH.....	120
7.	LIMITACIONES Y PERSPECTIVAS .....	125
7.1.	Limitaciones .....	127
7.2.	Perspectivas .....	128
8.	CONCLUSIONES .....	131
9.	BIBLIOGRAFÍA .....	137
10.	ANEXOS .....	153



# ABREVIATURAS

- CECC: cáncer escamoso de cabeza y cuello
- CEN: cáncer escamoso nasosinusal
- CDKi: quinasas inhibidoras dependientes de ciclina
- COX2: ciclooxigenasa 2
- EGFR: receptor del factor de crecimiento epidérmico
- H-E: hematoxilina-eosina
- IHQ: inmunohistoquímica
- MLPA: amplificación de sondas dependiente de ligandos o “Multiplex Ligation dependent Probe Amplification”
- NFkB: factor de transcripción nuclear kappa B
- PCR: reacción en cadena de la polimerasa
- pEGFR: receptor del factor de crecimiento epidérmico fosforilado
- PET-TC: tomografía por emisión de positrones
- PI: papiloma invertido
- PI-CEN: papiloma invertido malignizado a CEN
- PI-CENm: papiloma invertido malignizado a CEN metacrónico
- PI-CENs: papiloma invertido malignizado a CEN sincrónico
- PIn: papiloma invertido no recidivado
- PIr: papiloma invertido recidivado
- RNM: resonancia nuclear magnética
- TAC: tomografía axial computarizada
- TGF $\alpha$ : factor de crecimiento transformante
- TKI: inhibidor de tirosina quinasa
- SCCA: antígeno del cáncer escamoso
- VEB: virus Epstein Barr
- VPH: virus papiloma humano



# BASES PREVIAS

## COMUNICACIONES EN CONGRESOS NACIONALES

1. Comunicación oral: Caracterización genético molecular de los papilomas invertidos malignizados.

Autores: Marta Menéndez del Castro, César Antonio Álvarez Marcos, Fernando López Álvarez, Paula Sánchez Fernández, Cristina García Inclán, Alejandro López Hernández, Mario Hermsen, José Luis Llorente Pendás.

Congreso: 68 Congreso Nacional de la Sociedad Española de Otorrinolaringología y Cirugía de Cabeza y Cuello (Madrid, 10 al 12 de noviembre de 2017).

2. Comunicación fórum de investigación: p16, p53 y pEGFR como marcadores moleculares en la transformación maligna de los papilomas invertidos nasosinusales.

Autores: Marta Menéndez del Castro, César Antonio Álvarez Marcos, Mario Hermsen, Sira Potes Ares, Virginia Naves Cabal, José Luis Llorente Pendás.

Congreso: 69 Congreso Nacional de la Sociedad Española de Otorrinolaringología y Cirugía de Cabeza y Cuello (Madrid, 19 al 22 de octubre de 2018).

## ARTÍCULOS CIENTÍFICOS (Anexos)

1. V N Cabal, M Menendez, B Vivanco, S Potes-Ares, C Riobello, L Suarez-Fernandez, R Garcia-Marin, V Blanco-Lorenzo, F Lopez, C Alvarez-Marcos, J L Llorente, M A Hermsen. EGFR mutation and HPV infection in sinonasal inverted papilloma and squamous cell carcinoma. *Rhinology*. 2020;58(4):368-76.
2. M Menendez, V N Cabal, B Vivanco, L Suarez-Fernandez, F Lopez, J L Llorente, M A Hermsen, C Alvarez-Marcos. Loss of p16 expression is a risk factor for recurrence in sinonasal inverted papilloma. *Rhinology*. 2022;60(6):453-61.



# 1. INTRODUCCIÓN



La transformación y progresión neoplásica en la mucosa nasosinusal siguen siendo una incógnita al tratarse de procesos poco conocidos, al contrario de lo que ocurre en otras zonas anatómicas como el cérvix uterino, la laringe glótica y la mucosa intestinal. Este desconocimiento está condicionado por la baja incidencia de las lesiones nasosinuales y la clínica anodina que producen, siendo difícil establecer los sucesivos pasos de estos fenómenos. No obstante, se han ido acumulando evidencias científicas que apoyan la transformación y progresión del papiloma invertido (PI) nasal hacia el cáncer escamoso nasosinusal (CEN). Tratar de comprobar esta suposición ha sido el impulso que nos ha llevado a desarrollar este trabajo de investigación.

En esta introducción se van a exponer los aspectos clínicos e histopatológicos más importantes de PI y CEN, para posteriormente establecer el perfil genético-molecular que los define y diferencia.

## 1.1. Papiloma Invertido (PI) y Cáncer Escamoso Nasosinusal (CEN)

Los tumores nasosinuales humanos contrastan al presentar amplia variedad de tipos histopatológicos en el reducido espacio anatómico del que se originan. En la Tabla 1 se expone una clasificación donde se evidencia su diversidad (1,2). Se destaca el PI por ser el tumor benigno en el que se ha visto con más frecuencia transformación maligna, y el CEN por ser el tumor maligno más frecuente.

---

Tabla 1. Clasificación adaptada de los tumores de las fosas nasales y senos paranasales según la OMS (2)

---

Tumores epiteliales malignos

- **Carcinoma escamoso (CEN)**
- Carcinoma linfoepitelial
- Carcinoma indiferenciado
- Adenocarcinoma
- Carcinoma de tipo salivar
- Tumores neuroendocrinos

Tumores epiteliales benignos

- Papilomas nasosinuales: **invertido (PI)**, oncocítico, exofítico.
- Adenomas de tipo salivar

Tumores de tejidos blandos

- Malignos: fibrosarcoma, histiocitoma fibroso maligno, leiomioma, rhabdomyosarcoma, etc.
- “Borderline” y con bajo potencial de malignización: fibromatosis desmoide, tumor miofibroblástico inflamatorio, hemangiopericitoma, etc.
- Benignos: mixoma, leiomioma, hemangioma, etc.

Tumores óseos y cartilagosos

- Malignos: condrosarcoma, osteosarcoma, cordoma.
- Benignos: tumor de células gigantes, condroma, osteoma, condroblastoma, etc.

Tumores hematolinfoides

Tumores neuroectodérmicos

Tumores de células germinales

---

Los papilomas se han clasificado según su patrón de crecimiento en: oncocíticos, exofíticos e invertidos (3), surgiendo este último en el epitelio Schneideriano de origen ectodérmico (4,5). La OMS define el PI como *“tumor epitelial benigno compuesto por epitelio respiratorio columnar o ciliado bien diferenciado, con un grado variable de diferenciación escamosa”* (6). Así, el PI es un tumor de origen epitelial clínicamente benigno, pero con una capacidad infiltrativa local debido al crecimiento invertido del epitelio hacia el tejido subyacente, además de tendencia a la recidiva y potencial malignización (7–10).

En el otro extremo de la transformación neoplásica está el CEN, neoplasia maligna epitelial originada en el epitelio mucoso de las cavidades nasales y senos paranasales, caracterizado por la proliferación de estructuras epiteliales no glandulares. Puede ser de dos tipos: queratinizado y no queratinizado. Este tumor tiene características clínicas diferentes al resto de carcinomas escamosos de cabeza y cuello (CECC). Su localización centrorfacial y la proximidad a la órbita, fosa infratemporal y base del cráneo, hacen que su tratamiento sea difícil y complejo, con una elevada morbimortalidad (1,11).



### 1.1.1. Epidemiología

Los tumores nasosinuales son poco frecuentes, con una incidencia de 0,6-2 casos por 100.000 personas y año (12), siendo los tumores benignos el 60% y los malignos el 40% restante (Tabla 1) (13). Entre los tumores benignos destacan los de origen epitelial, sobre todo el papiloma. Está considerado el tumor benigno más frecuente de esta zona, entre el 0,4-4,7% del total de los tumores nasosinuales (5,11,14,15), siendo el PI el subtipo más frecuente (70%) (10,16).

La incidencia de PI varía según las series entre 0,6-2,3 casos por 100.000 habitantes y año, aunque podría estar infradiagnosticado, por su clínica anodina y confundirse con otras patologías nasosinuales benignas, especialmente la poliposis nasosinusal (2,17,18). Afectan principalmente a varones (ratio 2-5/1) entre 50 y 60 años (10,19), siendo infrecuentes en la infancia (10,11,19).

Los tumores malignos nasosinuales representan el 0,2-0,8% de todas las neoplasias malignas y el 3% de los tumores malignos de cabeza y cuello. Su incidencia es baja en la mayoría de las poblaciones, siendo menor a 1,5 casos por cada 100.000 habitantes y año en varones. Esta incidencia es más alta en determinadas regiones de Japón, China e India. El CEN es la tumoración maligna nasosinusal más frecuente (50-80%) (1,11,20) y afecta también más a varones (ratio 2-5/1) entre 50-60 años, de forma paralela a la distribución de los PI. Hay autores que describen un descenso en su incidencia en los últimos años. Su localización predominante es el seno maxilar y la fosa nasal (1).

### 1.1.2. Etiología y oncogénesis

Las causas que originan PI y CEN no están bien establecidas. Se han implicado en su desarrollo factores ambientales (exposición a tóxicos inhalados, humo de tabaco, contaminación, serrín de madera, industria textil y química (Ni, As, formaldehído)), alergia, pólipos nasales o infecciones previas, aunque no hay una clara relación causa-efecto (2,10,19). El tabaco, factor etiológico demostrado en CECC, no juega un papel importante en el desarrollo de CEN (2,21).

La inflamación podría contribuir a la oncogénesis en sujetos expuestos a determinados agentes industriales. Esta relación se apoya en que factores relacionados con la inflamación crónica y la oncogénesis, como NFkB (factor de transcripción nuclear kB) o COX2 (ciclooxigenasa 2), están elevados en CEN, pero esta relación no ha sido demostrada en todos los estudios (1).

En el desarrollo del PI y su transformación a CEN se está dando mucha importancia a la posible implicación de virus como el de Epstein-Barr (VEB) y el del papiloma humano (VPH) (10,19). El

VEB está involucrado en el desarrollo de los tumores de la nasofaringe, pero no se ha comprobado que en PI sea un factor etiológico a considerar (18,19).

El VPH, por el contrario, se considera un factor etiológico de primer orden, demostrando tasas de infección variables entre 0-72% (4). Esta disparidad se debe al empleo de diferentes técnicas de diagnóstico y a la variabilidad geográfica en las tasas de infección (19). Se ha demostrado también una fuerte relación con tumores de orofaringe, cavidad oral y de la mucosa genital (22).

VPH pertenece a la familia Papillomaviridae, tiene un diámetro de 50-55 nanómetros, carece de envoltura y posee una cápside icosaédrica. El genoma viral está compuesto por ADN circular bicatenario (aproximadamente 7.900 pb) que se organiza en tres regiones: precoz (E), tardía (L) y no codificante (Figura 1). En la superficie del virión se encuentran determinantes antigénicos conformacionales específicos, identificando así más de 100 subtipos de VPH, siendo el 6, 11, 16 y 18 los más relacionados con la transformación maligna (22).

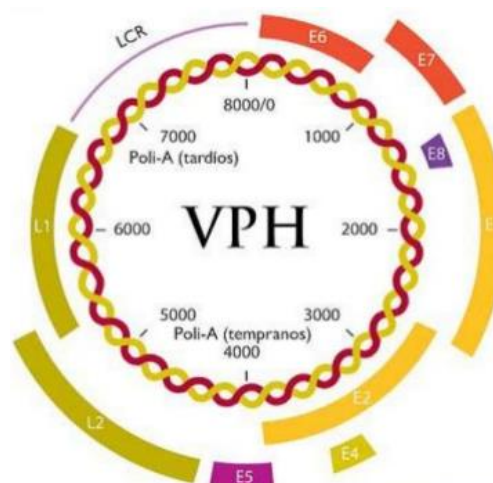


Figura 1. Representación esquemática del genoma de VPH. Se pueden ver las regiones codificantes precoz (E), tardía (L) y las no codificantes.

Muchos estudios han relacionado la presencia del VPH y la aparición de PI, pero no se ha demostrado si la infección es imprescindible para su desarrollo y crecimiento. Hay autores que defienden que la infección por VPH es necesaria para el inicio del PI, pero no para su mantenimiento o desarrollo, de forma que se ha visto que la tasa de infección podría descender a medida que avanza el estadio tumoral (14,23). Los subtipos 16 y 18 tienen características oncogénicas y son capaces de inmortalizar queratinocitos (22,24). Aumentan su tasa de detección si se asocia a algún grado de displasia o CEN sincrónico (PI-CENs), pudiendo considerarse un evento precoz en la transformación maligna (10,18,19,24), no solo en el tracto nasosinusal, también en orofaringe, cavidad oral y mucosa genital (23,25).

La actividad oncogénica de VPH se debe a los productos de expresión de los genes precoces E6 y E7. La proteína E6, considerada una oncoproteína, forma complejos con la proteína supresora de tumores p53, induciendo su ubiquitinación y degradación por el proteosoma (22,25). Es un hecho bien conocido que p53 regula el crecimiento celular y la supresión tumoral, por lo que su pérdida altera el ciclo celular, promueve la aparición de mutaciones, la inestabilidad cromosómica y facilita la transformación tumoral (25,26). E6 aumenta además la transcripción y expresión de EGFR (factor de crecimiento epidérmico), y junto a la proteína E5 contribuye a su reciclaje (27,28).

La oncoproteína E7 forma complejos con las proteínas hipofosforiladas del gen *Rb* que regulan negativamente el crecimiento celular al bloquear su ciclo. Asimismo, E7 se une a p130 y p107, proteínas relacionadas con *Rb*, que regulan la transición entre sus distintas fases (22,25).

E6 y E7 afectan también a la expresión de otras proteínas relacionadas con las vías de p53 y *Rb*, como son Ciclina D1, y CDKIs (quinasas inhibitoras dependientes de ciclina): p21, p16 y p27. Ciclina D1 estimula la fosforilación de *Rb* mediante asociación con CDKIs, mientras que p16 se une a las CDKIs 4 y 6, bloqueando su asociación con ciclina D1. La mutación inactivadora o la delección del gen supresor *CDKN2A*, que codifica la proteína p16, originaría un aumento de factores de transcripción y proliferación celular (29).

Por su parte, las proteínas E1 y E2 regulan la replicación del ADN vírico y la expresión de los genes en las células transformadas y en aquellas infectadas que no se están replicando (25). En la región tardía, los genes L1 y L2 codifican la proteína principal y las secundarias de la cápside, que sólo se expresan en células epiteliales escamosas diferenciadas (22).

### 1.1.3. Localización y clínica

La localización más frecuente de PI es la pared lateral de las fosas nasales (80%), seguido del seno maxilar y en menor frecuencia el etmoides, aunque puede afectar a todos los senos paranasales (4,10,13). En casos avanzados invade la órbita, nasofaringe, oído medio y puede extenderse intracranalmente (4), afectando a más de una localización y haciendo difícil establecer su origen (17). Es con mayor frecuencia unilateral, aunque se han descrito lesiones bilaterales (5%) y multicéntricas (18,24).

Su clínica es inespecífica, con síntomas similares a otras patologías nasosinusales benignas y malignas (18). Los síntomas más frecuentes son la obstrucción nasal unilateral, seguida por epistaxis y rinorrea acuosa (13,17), con una evolución de meses o años (18). Otros síntomas como epífora, proptosis, diplopía, cefaleas o algias faciales son menos frecuentes, indicativos

de lesión avanzada que afecta a la órbita o a la base del cráneo (17). En 23% de los casos PI es asintomático y se diagnostica de forma casual durante una exploración o con técnicas de imagen realizadas por otro motivo (19).

CEN tiene una sintomatología similar a PI, presentando síntomas neurológicos, diplopía y proptosis en estadios avanzados. La falta de especificidad en la clínica demora el diagnóstico, que acostumbra a hacerse en estadios avanzados de la enfermedad (1,30). Se observan metástasis linfáticas en el 20% de los pacientes (1), aunque las metástasis a distancia son infrecuentes (21).

#### 1.1.4. Diagnóstico

En la historia clínica se deben recoger antecedentes y factores de exposición ambientales, así como los síntomas y el tiempo de evolución. La exploración endoscópica y las técnicas de imagen son imprescindibles y orientan, siendo el diagnóstico definitivo histopatológico (18).

##### *Diagnóstico endoscópico*

En PI se observa una lesión polipoidea, blanquecina o grisácea, generalmente unilateral, con aspecto papilomatoso, que protruye desde la pared lateral nasal (Figura 2). En CEN la lesión suele tener un aspecto irregular, sangrante y/o necrótica (6,17).

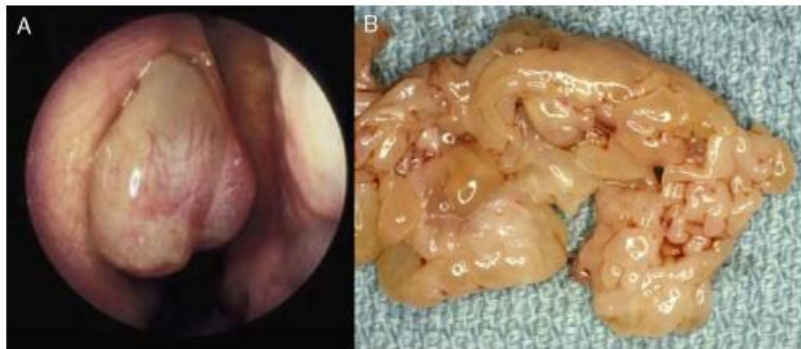


Figura 2. A: imagen endoscópica de PI, que puede ser confundido con un pólipo inflamatorio. B: pieza macroscópica tras la resección, se observa la coloración blanquecina y el aspecto cerebriforme típico.

En PI el diagnóstico diferencial se hará con la poliposis nasal inflamatoria y otros tumores benignos nasosinusales, estesioneuroblastoma, linfoma y resto de tumores malignos, incluido CEN (Tabla 1) (31).

### *Diagnóstico por imagen*

Se utilizan la tomografía axial computarizada (TAC) y la resonancia nuclear magnética (RNM), para valorar la extensión de la lesión y su configuración tridimensional, con el fin de establecer su relación con estructuras vecinas (órbita y base del cráneo) (17,19). La tomografía por emisión de positrones (PET-TC) en el diagnóstico de PI se está iniciando, pero su uso no se ha extendido aún en la rutina clínica (18).

Los hallazgos de la TAC en PI son inespecíficos, similares a los encontrados en los pólipos inflamatorios. Se observa una opacificación unilateral, en ocasiones bilateral, de la fosa nasal y de los senos paranasales afectados, con densidad de partes blandas, realce heterogéneo tras la administración de contraste y calcificaciones en el 20% (18,19,31,32) (Figura 3A). Hay remodelación ósea en el 43%, con adelgazamiento y desplazamiento sobre todo en la pared medial del seno maxilar o de la lámina papirácea, a diferencia del CEN, donde hay erosión o reabsorción óseas (18,24,31) (Figura 3B)

Se ha visto relación entre el origen del PI y la presencia de hiperostosis focal en la TAC, lo que podría predecir su origen (31,33).

La TAC define bien las partes óseas, lo cual le confiere ventaja respecto a la RNM, siendo imprescindible para la planificar la cirugía (32). Su limitación es la dificultad para diferenciar las zonas inflamatorias circundantes a la lesión, sobreestimando su tamaño y extensión (19).

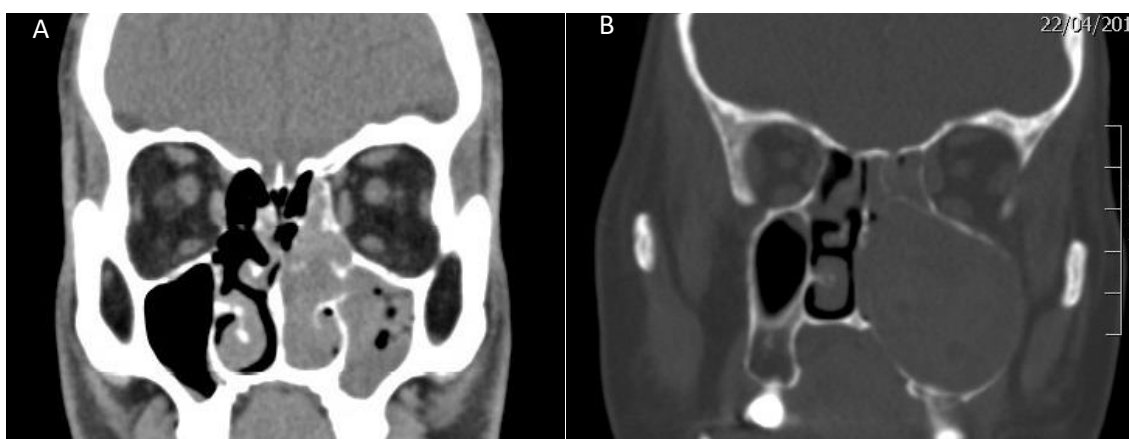


Figura 3. TACs en proyección coronal. A: Se observa una ocupación de fosa nasal, celdillas etmoidales y seno maxilar izquierdos por una masa de partes blandas. B: Ocupación de fosa nasal izquierda y seno maxilar izquierdo por masa de partes blandas que provoca desplazamiento y adelgazamiento de las paredes, sin erosión de las mismas.

La RNM en PI muestra una masa con aspecto cerebriforme, hipodensa o isodensa en T1, e hiperdensa en T2, con realce moderado y heterogéneo tras la administración de contraste, sin

el realce periférico típico de las lesiones inflamatorias (31,34) (Figura 4). La pérdida de este aspecto cerebriforme es sospechosa enfermedad maligna concomitante (35).

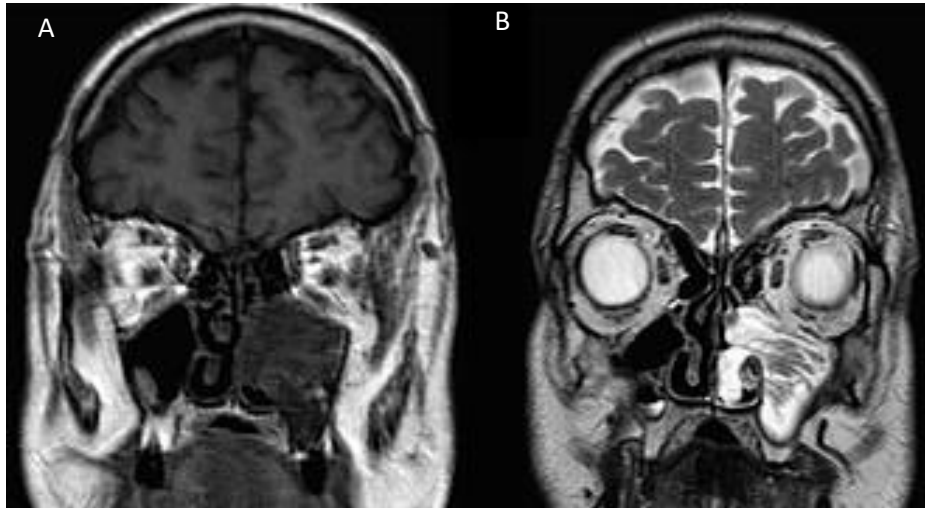


Figura 4. RNM en proyección coronal. Ocupación de fosa nasal y seno maxilar izquierdos, con señal hipointensa en T1 (A) e hiperintensa en T2 con realce heterogéneo tras administrar de contraste (B).

La RNM aporta mejor definición que la TAC en la extensión de la lesión y la invasión de tejidos blandos próximos (órbita, endocráneo), siendo útil en casos avanzados (34). Además diferencia PI de mucocelos y pólipos inflamatorios (18,31,34). Es útil como diagnóstico precoz de lesiones malignizadas, ya que se ha visto un patrón de bandas alternas hiper e hipointensas en secuencias T2 y T1 con contraste, a diferencia de PI (36).

En CEN también estaría indicada la TAC y RNM, para definir la extensión del tumor y la invasión de áreas próximas (1,37). La TAC con contraste intravenoso es la técnica inicial más adecuada. Permite diferenciar el tumor del tejido inflamatorio circundante, así como definir la afectación o erosión ósea y la extensión a estructuras vecinas. Se presenta como una imagen sólida, con realce moderado de contraste, y destrucción ósea local, al contrario que PI o mucocelo, en los que se ve expansión o desplazamiento óseo. Esta imagen es característica, pero no patognomónica (38) (Figura 5A).

La RNM en CEN es superior a la TAC para valorar la extensión vecina, especialmente a base de cráneo, intracraneal y orbitaria al diferenciar mejor el tejido inflamatorio peritumoral (34). Se observa una imagen de intensidad intermedia, en secuencias T1 y T2, aunque en T2 la señal puede ser más intensa (38) (Figura 5B). Se ha visto que utilizando determinados algoritmos de RNM se podría predecir la respuesta de CEN al tratamiento (39).

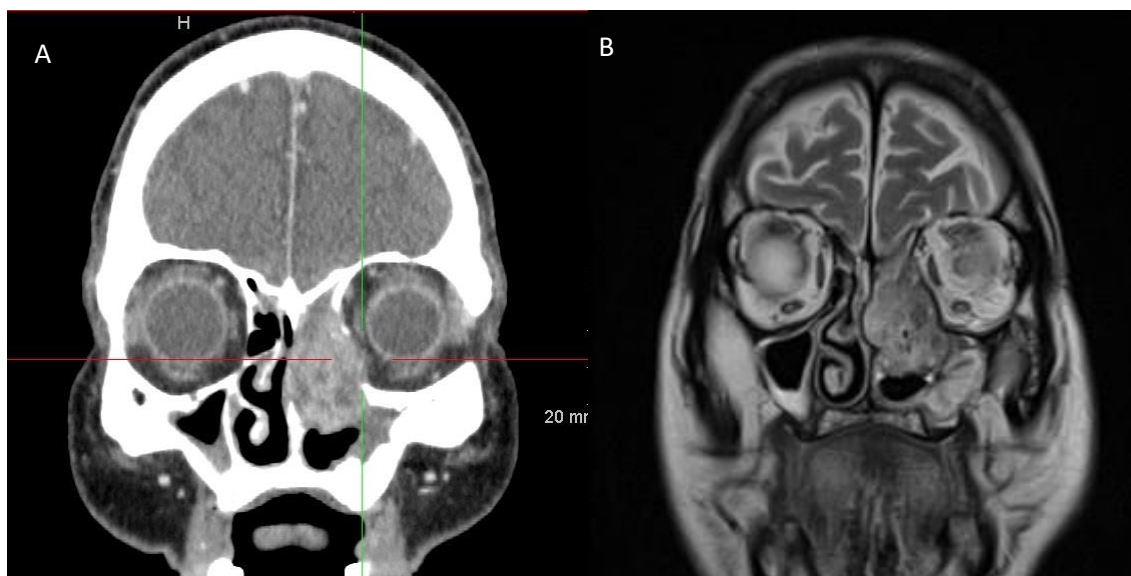


Figura 5. TAC corte coronal (A) en el que se ve masa originada en etmoides izquierdo con reabsorción de pared medial orbitaria. RNM corte coronal y secuencia T1 (B) en el que se aprecia la misma lesión, viéndose que a pesar de la erosión en la pared orbitaria, no existe invasión de partes blandas (grasa o contenido orbitario).

El uso de la PET-TC con  $^{18}\text{F}$ -fluorodeoxiglucosa (PET/CT  $^{18}\text{F}$ FDG) en PI y CEN permite observar áreas con elevado metabolismo de glucosa, sobre todo en lesiones malignas, aunque no de manera específica, ocurriendo también en otras lesiones benignas como poliposis, y procesos infecciosos. En PI el aumento de actividad metabólica puede indicar enfermedad maligna concomitante, pero no es un hallazgo específico (18), por lo que las lesiones hipercaptantes no implican necesariamente malignidad (40). El PET-TC podría tener interés en CEN, principalmente en lesiones avanzadas, sospecha de recidiva o persistencia tumoral (1,37). Hay que tener en cuenta que pacientes tratados recientemente pueden presentar aumento del metabolismo en la base del cráneo que se mantiene en el tiempo, no habiéndose determinado aún el plazo de tiempo para poder interpretar ese hallazgo (41).

#### *Diagnóstico histológico*

Es imprescindible tanto en PI como en CEN, para confirmar el diagnóstico e indicar el tratamiento (17).

En PI se observa una hiperplasia epitelial que se invierte e introduce sobre el estroma, manteniendo íntegra la membrana que lo separa del epitelio (11,18,42) (Figura 6).

La celularidad epitelial permite establecer diversos tipos histológicos: escamoso, transicional y columnar. La actividad mitótica se limita a la zona basal y parabasal, con infiltración de

neutrófilos, a diferencia de los pólipos inflamatorios donde predominan eosinófilos (4). El estroma subyacente puede variar de denso y fibroso a laxo y mixoide, con cambios inflamatorios tanto crónicos como agudos y áreas de fibrosis y edema (43).

Se pueden observar cambios tisulares indicativos de infección por VPH, como son la presencia de coilocitos, disqueratosis, papilomatosis, hiperqueratosis, acantosis y paraqueratosis. La coilocitosis es el efecto citopático más común, siendo patognomónico de las lesiones asociadas a VPH, como también se ha visto en el cáncer de orofaringe (44).

El PI puede coexistir con poliposis nasosinusal (20-50%), siendo frecuentes los diagnósticos falsos negativos, por la escasa muestra de la biopsia. En muchos casos el diagnóstico definitivo se hará tras el estudio completo de la pieza quirúrgica (19,24).

Pueden coexistir con el PI distintos grados de displasia, carcinoma in situ y CEN. La invasión linfovascular, elevado índice mitótico, mitosis atípicas, desmoplasia, invasión ósea, descenso de neutrófilos y eosinófilos, hiperqueratosis, hiperplasia epitelial escamosa, disqueratosis, maduración paradójica o aumento de la expresión de Ki67, deben hacernos sospechar CEN asociado, que puede estar presente en partes de la muestra (Figura 7), obligando al análisis histopatológico exhaustivo (2,45).



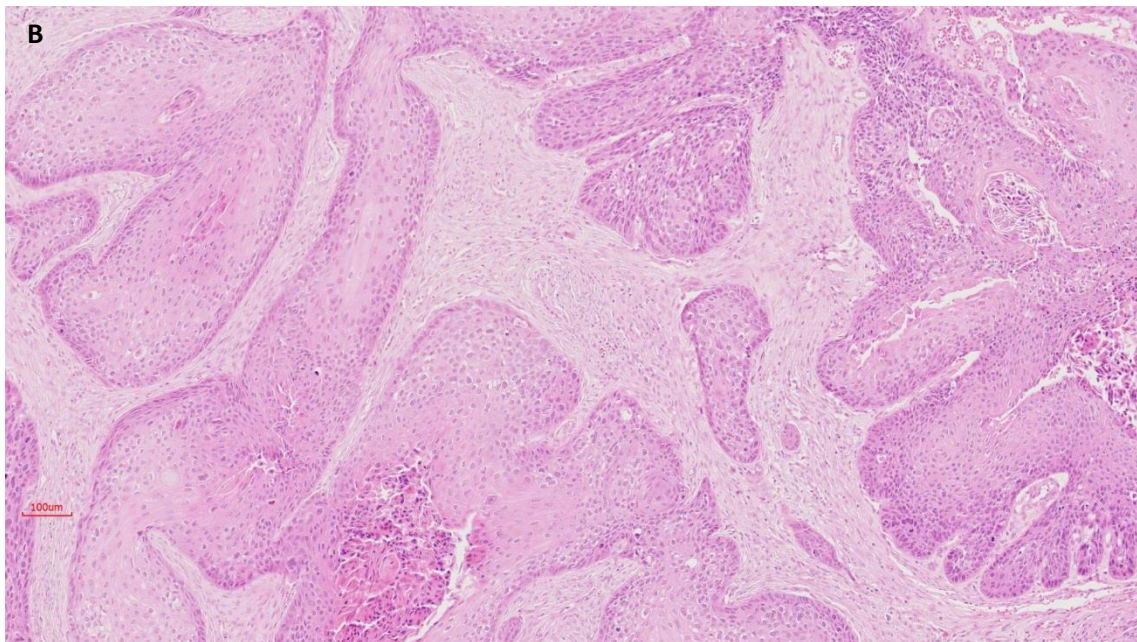
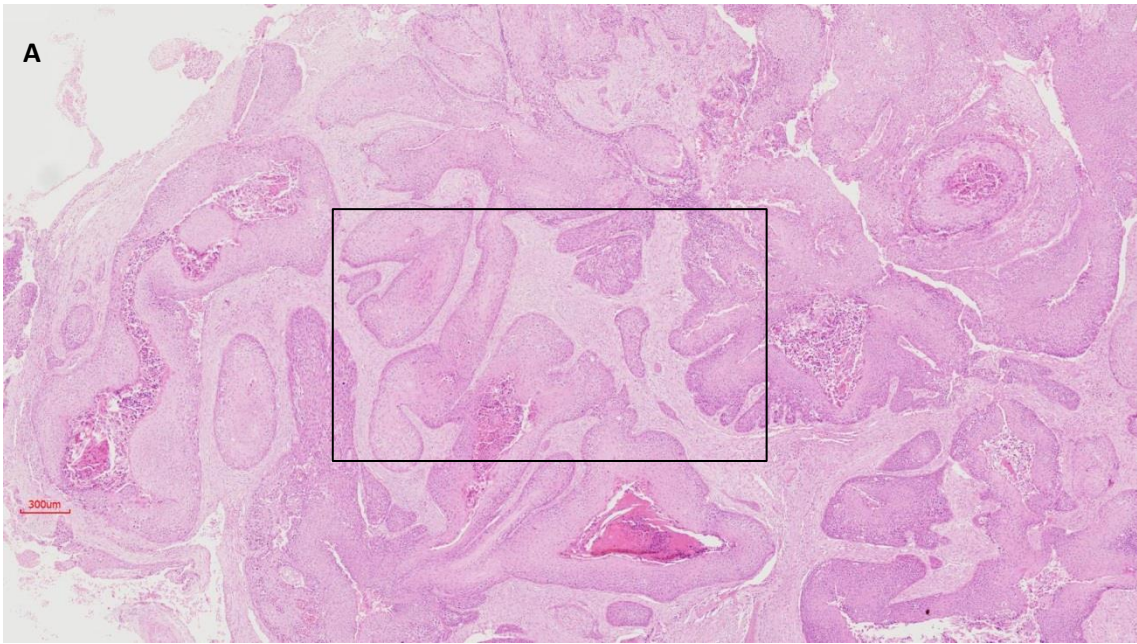


Figura 6. Histopatología de PI. Hematoxilina-eosina, a 4x (A) y 10x (B). Se observa la característica inversión del epitelio en el estroma subyacente, manteniendo la integridad de la membrana.



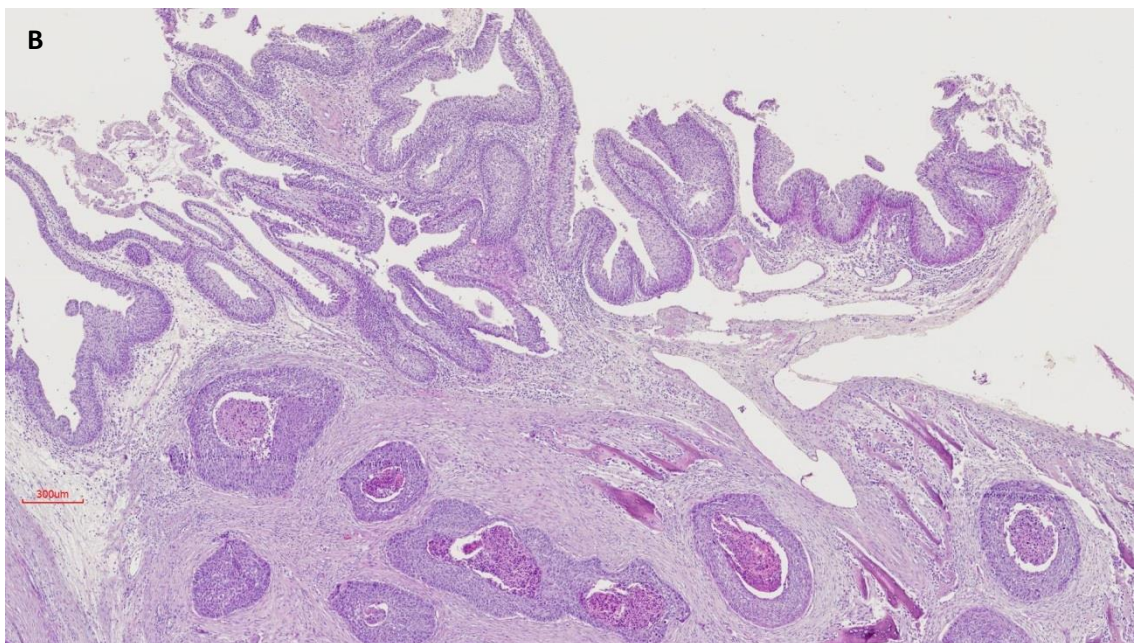
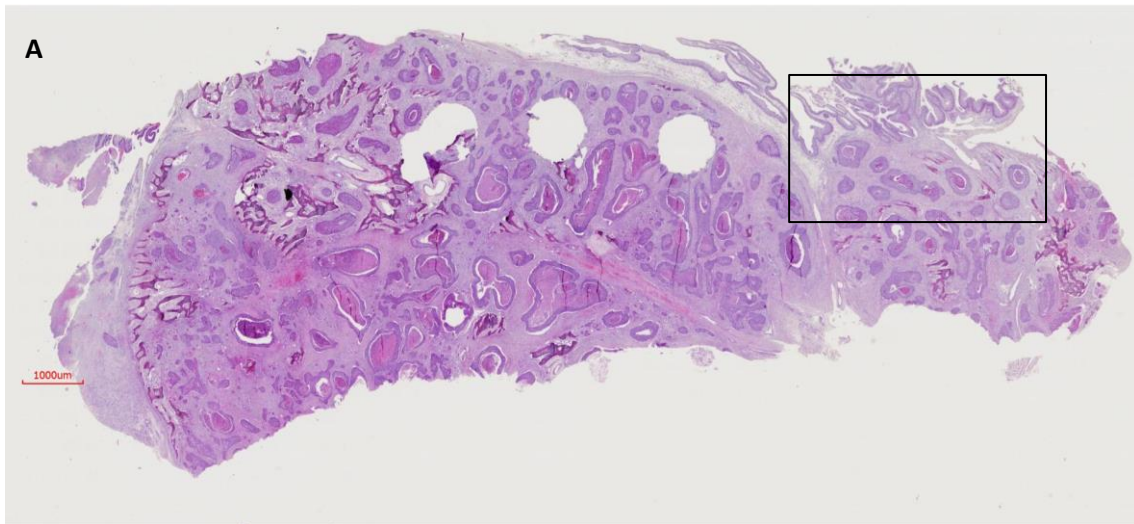


Figura 7. Histopatología de PI-CENs. Hematoxilina-eosina a 1x (A), 4x (B). En A podemos ver el bloque histológico completo. En B el detalle donde se muestra la coexistencia de una zona con características de PI (arriba), y otra con características de CEN (abajo).

CEN está constituido por trabéculas o nidos de tamaño variable, formadas por células similares a las de epitelios planos poliestratificados, con un grado de atipia citológica variable, aunque en general suele ser intensa (alto grado) (Figura 8). Puede presentar queratinización e invasión de tejidos circundantes según el grado de extensión tumoral (46), de forma que actualmente se distingue entre CEN queratinizante y CEN no queratinizante (47). El grado de diferenciación es también variable, existiendo tumores bien diferenciados, moderadamente diferenciados, pobremente diferenciados e indiferenciados. En el CECC la diferenciación histológica predice a menudo el comportamiento biológico, incluyendo la diseminación locorregional o a distancia,



y por tanto el pronóstico. En general, los tumores poco diferenciados van a ser más agresivos que los bien diferenciados (48).

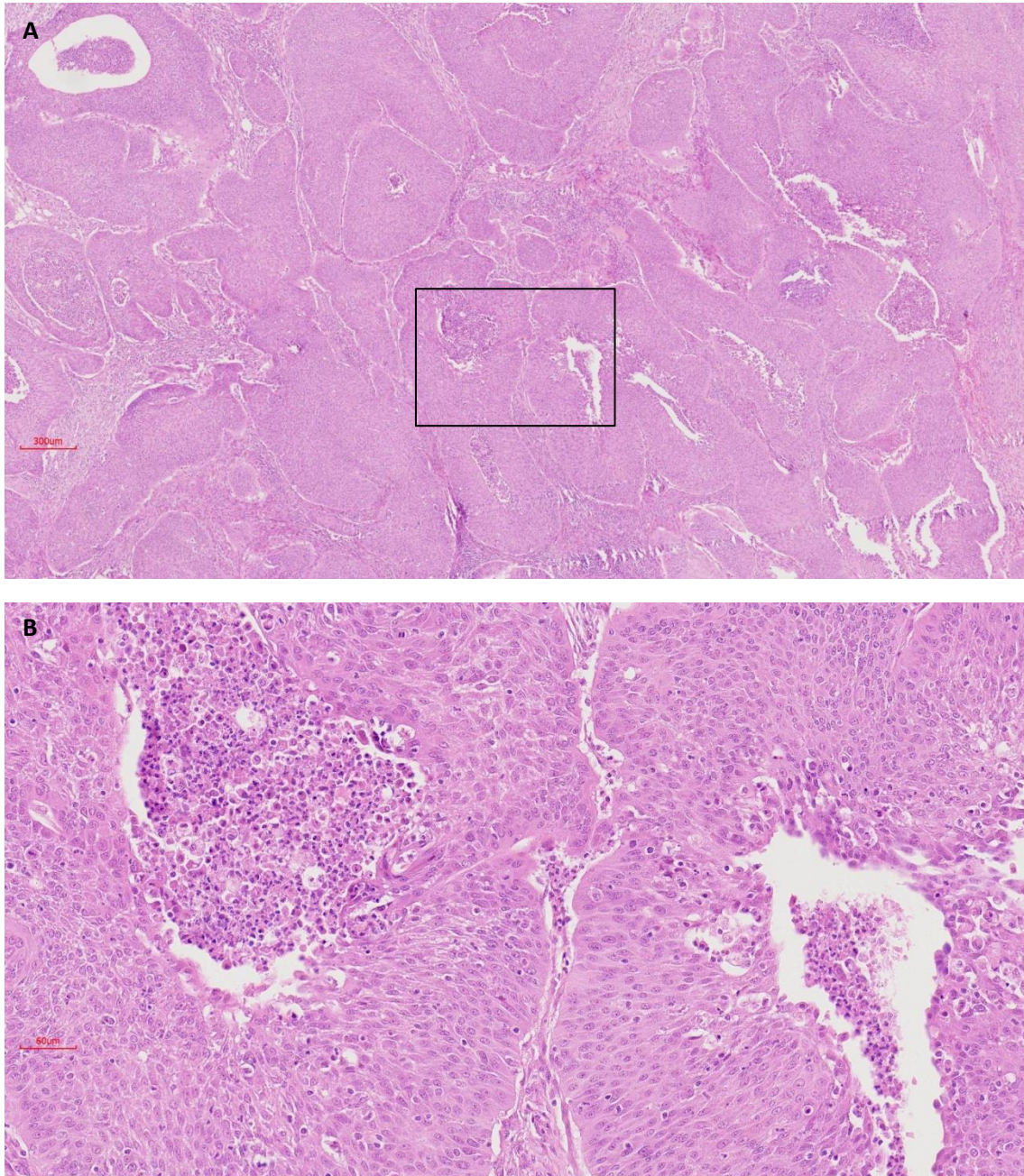


Figura 8. Histopatología de CEN. Hematoxilina-eosina, a 4x (A) y 20x (B). Se observa en detalle los característicos nidos o trabéculas que componen la histología típica del tumor.

### 1.1.5. Estadificación

El sistema más utilizado para estadificar PI fue propuesto por Krouse y se basa en su localización y extensión radiológica, así como en su posible transformación maligna (Tabla 2) (49).

I	Sin signos de malignidad Lesión limitada a la cavidad nasal Ninguna extensión sinusal ni extrasinusal
II	Sin signos de malignidad Lesión del complejo osteomeatal, seno etmoidal, pared medial o superior del seno maxilar, con o sin extensión hacia cavidad nasal
III	Sin signos de malignidad Lesión de paredes inferior, lateral, anterior o posterior del seno maxilar, del seno esfenoidal o del seno frontal
IV	Sin signos de malignidad pero con extensión extrasinusal Con signos de malignidad

Esta clasificación es sencilla y reproducible, aunque está apoyada en series pequeñas con PI malignizados que deberían clasificarse aparte. Además, las tasas de recidiva en estadios I y II son similares, cuestionando su diferencia (18,19,50).

Cannady propuso un nuevo sistema de clasificación y pronóstico (Tabla 3), separando PI en tres grupos, considerando exclusivamente la localización y extensión (50). Esta clasificación se adapta a las técnicas de cirugía endoscópica y muestra diferencias entre los grupos en cuanto a tasas de recidiva (31).

A	Confinado a cavidad nasal, seno etmoidal o maxilar medial
B	Compromiso de cualquier pared de seno maxilar, o de senos frontales o esfenoidales
C	Extensión extranasosinusal

En CEN la estadificación se basa en el sistema TNM, siendo T la extensión del tumor primario (Tablas 4 y 5), N la afectación ganglionar linfática (Tabla 6) y M las metástasis a distancia (Tabla 7). Según estas tres categorías se obtiene la clasificación de CEN en estadios (Tabla 8) (2).

Tabla 4. Clasificación TNM del CEN. Tumor primario (T) (seno maxilar)	
TX	Tumor primario no se puede evaluar
Tis	Carcinoma in situ
T1	Tumor limitado a la mucosa de seno maxilar sin erosión ni destrucción ósea
T2	Tumor que causa erosión o destrucción ósea incluyendo extensión a paladar duro y/o meato medio, excepto extensión a la pared posterior del seno maxilar y apófisis pterigoides
T3	El tumor afecta uno de los siguientes: hueso de la pared posterior del seno maxilar, tejido subcutáneo, suelo o pared medial orbitaria, fosa pterigoidea, celdillas etmoidales
T4	Enfermedad local moderadamente avanzada o muy avanzada
T4a	Enfermedad local moderadamente avanzada El tumor invade el contenido orbitario anterior, piel de la mejilla, apófisis pterigoides, fosa infratemporal, lámina cribosa, senos frontal o esfenoidal
T4b	Enfermedad local muy avanzada El tumor invade uno de los siguientes: ápex orbitario, duramadre, cerebro, fosa craneal media, otros nervios craneales además de la rama maxilar del nervio trigémino (V2), nasofaringe o clivus

Tabla 5. Clasificación TNM del CEN. Tumor primario (T) (cavidad nasal y celdillas etmoidales)	
TX	Tumor primario no se puede evaluar
Tis	Carcinoma in situ
T1	Tumor limitado a una sublocalización, con o sin invasión ósea
T2	Tumor que afecta a dos sublocalizaciones en una sola región o que invade una región adyacente etmoidal, con o sin invasión ósea
T3	Tumor que invade el suelo o la pared medial de la órbita, seno maxilar, lámina cribosa o paladar
T4	Enfermedad local moderadamente avanzada o muy avanzada
T4a	Enfermedad local moderadamente avanzada Tumor que invade cualquiera de las siguientes regiones: contenido orbitario anterior, piel de la mejilla, mínima extensión a la fosa craneal anterior, apófisis pterigoides, senos frontal o esfenoidal
T4b	Enfermedad local muy avanzada El tumor invade uno de los siguientes: ápex orbitario, duramadre, cerebro, fosa craneal media, otros nervios craneales además de la rama maxilar del nervio trigémino (V2), nasofaringe o clivus

<b>NX</b>	Los ganglios linfáticos regionales no se pueden evaluar
<b>N0</b>	Sin metástasis en ganglios linfáticos regionales
<b>N1</b>	Metástasis en un único ganglio ipsilateral, de 3 cm o menor de dimensión máxima, y enfermedad extranodal (EEN) negativa
<b>N2a</b>	Metástasis en un único ganglio ipsilateral mayor de 3 cm pero menor de 6 cm de dimensión máxima, y EEN negativa
<b>N2b</b>	Metástasis en múltiples ganglios ipsilaterales, no mayores de 6 cm y con EEN negativa
<b>N2c</b>	Metástasis en ganglios bilaterales o contralaterales, no mayores de 6 cm y EEN negativos
<b>N3a</b>	Metástasis en un ganglio mayor de 6 cm y EEN negativo
<b>N3b</b>	Metástasis en cualquier ganglio con EEN positivo

<b>MX</b>	Las metástasis a distancia no se pueden evaluar
<b>M0</b>	Ausencia de metástasis a distancia
<b>M1</b>	Presencia de metástasis a distancia

Estadio	T	N	M
Estadio 0	Tis	N0	M0
Estadio I	T1	N0	M0
Estadio II	T2	N0	M0
Estadio III	T1-2	N1	M0
	T3	N0-1	
Estadio IVA	T1-3	N2	M0
	T4a	N0-2	
Estadio IVB	T4b	Cualquier N	M0
	Cualquier T	N3	
Estadio IVC	Cualquier T	Cualquier N	M1

### 1.1.6. Tratamiento

En el caso del PI, pretende eliminar de forma completa la lesión para prevenir su recidiva y/o posible transformación maligna. El tratamiento clásico es la cirugía, aunque también se puede emplear la radio y quimioterapia, particularmente en casos malignizados y/o en recidivas (10,19,50,51).

### *Cirugía*

Se indica en todos los PI, excepto en pacientes inoperables por motivos médicos (10,24). La técnica quirúrgica se ha ido modificando, desde técnicas abiertas (rinotomía lateral) que presentaban mayor morbilidad y secuelas estéticas y funcionales (24), a técnicas para reducir las cicatrices faciales (“degloving” y cirugía externa mínimamente invasiva como el Caldwell-Luc) (52).

En la actualidad la cirugía externa se ha visto claramente superada por la cirugía endoscópica (10,24,52,53), que además de reducir los daños estéticos y funcionales, presenta menor tasa de recidiva que las técnicas abiertas (12% vs 17%) (54). La recidiva se reduce aún más si después de reseca el PI se fresa, extirpa o cauteriza el hueso subyacente (55). El tratamiento de elección en la recidiva sigue siendo la cirugía, con criterios similares a los del PI primario. La cirugía endoscópica permite además extirpar recidivas de PI previamente tratado con cirugía abierta (10,24), cuando se asocia a displasia o se maligniza (tanto en CEN sincrónicos como metacrónicos) (18).

En CEN la opción terapéutica más utilizada es la resección quirúrgica completa, con los mismos criterios que en PI, pero se tiende a ser más radical y a asociar radioterapia complementaria. El tratamiento debe ser personalizado según el estado general del paciente, la extensión tumoral y los tratamientos previos (1). Es imprescindible el control local con márgenes de seguridad suficientes, que suelen estar comprometidos por las características anatómicas y la afectación de estructuras vitales. Los abordajes quirúrgicos dependen de la localización tumoral, la extensión y la necesidad de realizar técnicas reconstructivas. Al igual que ocurre en el PI, la cirugía endoscópica mínimamente invasiva cada vez tiene mayor indicación, ya que reduce la morbilidad y las complicaciones postquirúrgicas, consiguiendo una supervivencia similar (1,2).

### *Radio y quimioterapia*

La radioterapia es una alternativa terapéutica controvertida en pacientes con PI sin signos de transformación maligna, ya que el beneficio es dudoso y aumentan las complicaciones, entre ellas la aparición de segundos tumores radioinducidos. Actualmente se defiende como tratamiento de PI en tres circunstancias: presencia de CEN asociado, recidiva múltiple, y contraindicación de la cirugía, bien por el estado general del paciente o por el tamaño de la lesión que la hace inoperable (19,56).

En CEN la radioterapia es un tratamiento complementario a la cirugía, especialmente en estadios avanzados, en caso de márgenes quirúrgicos afectos y cuando no sea posible la

resección completa por invasión de zonas vitales. Podrá ser indicado como tratamiento único o asociada a quimioterapia en pacientes inoperables o tumores irresecables (1,15,21,56).

Sobre el uso de quimioterapia en monoterapia hay pocos estudios. Se empleó el 5-Fluorouracilo tópico como tratamiento adyuvante a la cirugía, para reducir la tasa de recidiva en resecciones incompletas o cuando no fue posible extirpar o fresar el hueso subyacente, sobre todo en las lesiones de la lámina cribosa o en las paredes laterales del seno frontal, lugares de difícil acceso quirúrgico (57).

La indicación clásica de quimioterapia en CEN es el tratamiento paliativo de tumores localmente avanzados o metastásicos, cuando se agotan otros tratamientos o están contraindicados. Recientemente ha crecido el interés por este tratamiento, sobre todo por el uso de terapias dirigidas (1), como se ha propuesto en otros tumores nasosinuales (58).

Por otro lado, en los últimos años se está estudiando el papel de la quimioterapia como tratamiento neoadyuvante, con resultados prometedores, ya que puede disminuir el riesgo de recidiva local y metástasis a distancia. En estadios avanzados podría mejorar el control local permitiendo preservar estructuras como la órbita (59).

#### 1.1.7. Pronóstico

La evolución del paciente con PI una vez tratado contempla tres situaciones. En primer lugar, que la enfermedad cure y no se vuelva a manifestar, hecho esperado al tratarse de una lesión benigna. No obstante, la lesión puede recidivar o, lo que es peor, sufrir una transformación maligna. Debido a estas dos circunstancias se recomiendan hacer un seguimiento mínimo de 3-5 años (19), sugiriendo algunos autores un seguimiento de por vida (60). La trascendencia de estas dos características: recidiva y transformación maligna, ha sido el principal motivo que ha impulsado esta investigación.

#### *Recidiva*

Se han publicado tasas de recidiva local y locorregional de hasta el 78% en series antiguas (45,61), aunque estudios más recientes presentan menor porcentaje (15-20%) (62,63). La recidiva puede aparecer desde pocos meses hasta muchos años después de la primera cirugía, ocurriendo la mayoría en los dos primeros (10,24). La recidiva en el primer año de seguimiento se debe considerar como persistencia tumoral o tumor residual por resección incompleta, siendo esta la causa más frecuente de "recidiva" precoz (24,57). Esta situación ocurre con mayor frecuencia cuando el tumor primario se origina en zonas anatómicas de difícil acceso,



como el seno frontal y el suelo o la pared lateral del seno maxilar (45,64). Es importante la elección del abordaje quirúrgico, observando menores tasas de recidiva con cirugía endoscópica (54), especialmente si además se trata el hueso subyacente con cauterización, escisión o fresado (55).

Otro factor que condiciona la aparición de la recidiva es el estadio o extensión del PI, aumentando la tasa de recidiva hasta el 51% en el estadio III de Krouse (65). Sin embargo, otros autores no vieron diferencia en la tasa de recidiva en los diferentes estadios de Krouse, sugiriendo que el factor más importante para prevenirla es la resección completa en un primer tiempo (61).

Otros factores implicados de mal pronóstico para las recidivas incluyen la edad temprana al diagnóstico, el sexo femenino y la exposición a tabaco o tóxicos industriales (solventes orgánicos) (66–68).

La histopatología también se ha relacionado con la recidiva y entre sus hallazgos se incluyen la ausencia de pólipos inflamatorios o la presencia de hiperqueratosis, hiperplasia epitelial escamosa, aumento del índice mitótico y aneuploidía, aunque no son patognomónicos (45,64,69).

Por último, hay marcadores moleculares predictores de recidiva como la sobreexpresión de PLUNC (clon proteico palatino, pulmonar y del epitelio nasal), C/EBP $\alpha$  (“CCAAT/enhancer-binding protein Alpha”), CK10, Ki67 y HIF-1 $\alpha$  (Factor inducible por hipoxia 1 $\alpha$ ), pérdida de expresión de CK14 (keratina celular 14 basal) y la elevación sérica de SCCA (antígeno del cáncer escamoso) que desciende tras la cirugía y cuyo incremento podría ser útil en el seguimiento (64,68,70–74).

### *Transformación maligna*

Es otra característica de PI que condiciona su pronóstico (24,75). Puede ocurrir hasta en el 27% de los casos (5,76), aunque hay autores que sólo la han visto en el 7% (10). Su incidencia es de 0,33 casos por millón de habitantes por año (42), siendo más frecuente en varones de edades avanzadas (8).

La transformación maligna más frecuente en PI es hacia el CEN, aunque también se han descrito, con menor frecuencia, otros carcinomas: mucoepidermoide, indiferenciado, verrucoso, de células transicionales y de célula pequeña, así como diferentes adenocarcinomas (2,5,18).

Hay lesiones preinvasivas como la metaplasia escamosa y la displasia de la mucosa nasal que pueden preceder al desarrollo de CEN (2), habiendo constatado en ocasiones la presencia de un PI previo (1).

El CEN asociado a PI (PI-CEN) puede darse de dos maneras: 1) Sincrónica, coexistiendo ambos al mismo tiempo (simultáneo) o, como máximo, durante los 6 primeros meses tras el diagnóstico de PI. 2) Metacrónica, cuando el CEN surge pasados los 6 meses tras el diagnóstico de PI. Es más frecuente el CEN sincrónico (PI-CENs) que el metacrónico (PI-CENm) (8% vs 3%) (5,42).

El diagnóstico histopatológico y el perfil inmunohistoquímico del PI-CEN no está del todo definido (5). En PI-CENs, el área tumoral del CEN es muy variable (10-95%), incluso pueden verse anatómicamente separadas, y se seguiría considerando PI-CENs (42,77). Por este motivo, una biopsia parcial podría no incluir el área transformada, dando diagnósticos erróneos, siendo necesario el estudio minucioso de la pieza quirúrgica completa (Figura 7) (5).

Se han estudiado varios factores predisponentes para la transformación maligna. Hay autores que defienden el papel activo del VPH en dicha transformación, aunque la mayoría de estudios no han logrado resultados significativos. Se piensa que la infección por VPH podría ser una etapa precoz en esta transformación, siendo necesarios cambios genéticos o epigenéticos iniciales para disparar el proceso. Posteriormente la progresión pasaría por pasos intermedios de displasia hasta concluir en CEN (5,78,79).

Los marcadores moleculares y séricos que se han relacionado con la transformación maligna de PI son las mutaciones de *TP53*, el aumento de la expresión de EGFR, TGF $\alpha$  (factor de crecimiento transformante) y desmogleína, junto a la disminución en la expresión de E-Cadherina y  $\beta$ -Catenina (45,69,80,81). Se ha visto alteración en las proteínas de la vía de señalización Wnt (82) y de factores proinflamatorios como la ciclooxigenasa 2 (COX2) (83), la presencia en suero del SCCA (74) o la expresión elevada de Ki67 (84). Algunos de ellos se han propuesto como posibles marcadores del seguimiento y diagnóstico de la transformación maligna de PI (64), aunque ninguno está extendido en la práctica clínica.

Los principales factores clínicos predictores de mal pronóstico respecto a la transformación maligna serían la edad, el estadio avanzado, los PI-CENm en comparación con los PI-CENs (76) y la ausencia de pólipos nasales (45). La tasa de supervivencia global a los 5 años se sitúa en torno al 50-75% (76,85).

Por otro lado, el pronóstico de un CEN establecido o diagnosticado de *novo* es muy pobre, con una supervivencia a 5 años entre 30-50% (1). Las recidivas locales son la primera causa de muerte, siendo mejor el pronóstico cuando se localiza en las fosas nasales respecto a los senos paranasales, porque el diagnóstico es más precoz. La clasificación T, la afectación de base de cráneo anterior, la extensión orbitaria y la recidiva local son los principales factores de mal pronóstico en CEN (21).

## 1.2. Estado actual

Se van a considerar los aspectos moleculares y genéticos referentes a PI y su relación con la transformación maligna hacia CEN para que sirvan de base al desarrollo de la investigación.

Existen diferentes teorías que pretenden explicar el proceso de transformación maligna de PI. Hay autores que consideran PI una lesión preinvasiva de CEN, mientras que otros los suponen procesos independientes. Califano, autor de prestigio por sus propuestas de modelos de progresión en CECC, observó que PI es una lesión monoclonal, aunque no tiene el perfil fenotípico clásico de una lesión precursora, ni posee alteraciones genéticas asociadas con la transformación maligna, a diferencia de otras lesiones preinvasivas (6). Lawson defiende que la progresión de PI a displasia y CEN es secundaria a otros eventos, como la infección VPH de alto grado tras el desarrollo del PI, y/o la integración del genoma viral (14). Por el contrario, Udager demostró que PI es una lesión preinvasiva tras detectar las mismas mutaciones de *EGFR* en PI, PI-CENs y PI-CENm (86). Por tanto, no existe consenso respecto a si PI-CEN es una lesión que aparece tras un proceso de transformación maligna, o si PI y CEN son lesiones independientes y coincidentes en el tiempo. A esta controversia se añade que tanto PI como CEN son patologías poco frecuentes y las series recopiladas tienen un número limitado de casos, siendo los datos publicados muy variables.

Destacamos y detallamos los aspectos con especial trascendencia en el proceso de transformación maligna, algunos de ellos ya mencionados.

En primer lugar, vamos a considerar las alteraciones genéticas y su expresión proteica en PI, PI-CEN y CEN de *novo* en relación con la infección VPH.

**VPH**, como ya se ha comentado, es uno de los factores más defendidos y estudiados en el desarrollo de PI y su transformación maligna, aunque su papel sigue sin estar claro, debido a unas tasas de infección muy variables y dependientes de la región geográfica, así como de la técnica de detección utilizada en cada serie (87). Se ha visto de manera directa que VPH está relacionado con proteínas de la proliferación y ciclo celular, entre las que se encuentran p53 como proteína supresora de tumores, las CDKI como p16 y los receptores de la familia C-erbB como EGFR, tal como se ha descrito anteriormente. Como ya se comentó, la tasa de infección por VPH en PI es muy variable (0-100%), siendo en general menor en los CEN (20-30%) (16,88–91). El subtipo más frecuente encontrado en CEN es el VPH 16, al igual que en otros CECC (92). Los autores que defienden el papel oncogénico de VPH en la transformación de PI a PI-CEN, se apoyan en que su tasa de detección aumenta en estos últimos (14). Sin embargo, la mayoría de los estudios muestran resultados dispares, con una tasa de infección en PI-CEN entre 0-100% (16,80,93), habiendo trabajos donde es menor en PI-CEN que en PI (94).

Otro aspecto a considerar de la infección VPH es su posible valor pronóstico, tanto en PI como en CEN, como ha ocurrido en otros CECC, particularmente en el cáncer de orofaringe. En esta localización la detección del virus (VPH+) suele darse en pacientes jóvenes y se considera de buen pronóstico, hasta el punto en el que se ha modificado la última clasificación TNM (95). Algunos autores han descrito también esta tendencia en CEN, de forma que los pacientes VPH+ son más jóvenes y con mejor pronóstico, con mayor supervivencia libre de enfermedad (89,94).

**p16** (INK4a) es una proteína supresora tumoral, codificada por el gen *CDKN2A* (inhibidor 2A de kinasa dependiente de ciclina, también llamado *MTS-1* o *p16<sup>INK4</sup>*), localizado en el locus 9p21. Se considera el gen más frecuentemente mutado en CECC tras *TP53* (96). Pertenece a la familia INK4, de la que forman parte otras proteínas similares (p15, p18, p19) y se relaciona con la familia CIP/KIP, que incluye p21, p27 y p57. Su función es, mediante inhibición de CDKI, impedir la fosforilación de la proteína supresora Rb, regulando negativamente el ciclo celular en fase G1 y por tanto deteniendo la proliferación celular (97). También participa en la regulación de la vía p53, estando así relacionada con las dos principales vías de regulación del ciclo celular (96). La mutación o delección de *CDKN2A* produciría una proteína mutada que inactivaría la ruta Rb, actuando también sobre p53, pudiendo provocar una reducción en la expresión de p16 y una regulación al alza del ciclo celular. Se relaciona además con VPH debido a que la oncoproteína viral E7 también regula al alza p16 por inactivación de pRb y la correlación recíproca entre ambos, siendo p16 utilizada como marcador indirecto de infección

por VPH de alto riesgo en CECC, especialmente en tumores orofaríngeos (98–100). Esta relación VPH+ y sobreexpresión p16 se ha visto en tumores nasosinuales, aunque con menor consenso, cuando la expresión de p16 es fuerte (>70%) (96,101,102), no obstante, otros autores niegan su utilidad como marcador de infección en esta localización (99,103).

Se ha demostrado mayor expresión p16 en PI respecto a PI-CEN, sugiriendo que dicha expresión no se pierde en el desarrollo del PI, sino que es durante el proceso de transformación maligna cuando p16 se inactiva. En otros CECC no relacionados con VPH, la pérdida de expresión de p16 es una de las alteraciones más comunes, reforzando la teoría de que la progresión a malignidad de PI comparte con ellos una vía común (104).

**EGFR** es un receptor de superficie celular cuyo gen se localiza en el locus 7p12. Su nombre se debe a “epidermal growth factor receptor” o receptor del factor de crecimiento epidérmico. Forma parte de la familia de receptores de crecimiento c-erbB integrada por cuatro miembros: c-erbB-1, c-erbB-2/neu/HER2, c-erbB-3/HER3 y c-erbB-4/HER4, que poseen un dominio intracelular con actividad tirosina-kinasa (TK) (105).

Al unirse a su ligando produce una homo o heterodimerización con fosforilación de los dominios intracitoplasmáticos que activa y estimula la cascada de transducción por medio de proteínas con actividad TK (RAS/RAF/MAPK, STAT y PI3K). Estas proteínas están involucradas en vías relacionadas con la actividad neoplásica (transformación, proliferación, diferenciación, adhesión, migración y apoptosis) (106,107).

Las mutaciones del gen que provoquen su sobreexpresión aumentarán la síntesis de ADN y la proliferación celular, incrementando el riesgo oncogénico. Las mutaciones *EGFR* están presentes en el 30% de los tumores malignos epiteliales, donde se incluyen los CEN (108).

EGFR se sobreexpresa por dos mecanismos: 1) Aumento en su síntesis (desregulación de p53, polimorfismos genéticos y, con menos frecuencia, amplificación). 2) Disminución de los fenómenos de “downregulation”. Hay relación entre la mutación de *EGFR* y su expresión proteica con la infección por VPH. El oncogén viral E5 activa *EGFR* y su vía de señalización mitogénica, mientras que E6 aumenta su expresión de manera directa (27,28,105,109).

EGFR se expresa en muchos tumores malignos y particularmente en CECC (108). Son numerosos los estudios publicados en los últimos años que han relacionado *EGFR* con CEN, especialmente las mutaciones en el exón 20 (110). Se ha visto que *EGFR* presenta mayor número de mutaciones en PI (90%) y en PI-CEN (77%) respecto a los CEN de *novo* (6-44%) (86,105,109,111). Por eso parece tener un papel importante en el desarrollo del PI, pero no en

la transformación de PI a PI-CEN (112). En PI-CEN se demostró que la mutación *EGFR* era independiente y excluyente de la infección por VPH (113).

Otros autores han demostrado mayor expresión de *EGFR* en PI en comparación con la mucosa sana y los pólipos inflamatorios, pero sin establecer diferencias entre PI-CEN y CEN (104,114). En CEN se ha visto que la sobreexpresión *EGFR* (40-89%) se asocia a mayor tasa de recidiva local y a menor tiempo libre de enfermedad (92,105).

Por todo lo anteriormente indicado *EGFR* es marcador de mal pronóstico de la lesión que lo expresa, aunque podría ser diana de terapias dirigidas como Gefitinib y Erlotinib, habiéndose estudiado en el carcinoma colorrectal y en CECC (105,115). No obstante, la expresión de *EGFR* no ha sido demostrada como marcador predictivo de respuesta a terapias dirigidas, proponiéndose otros marcadores, incluido p*EGFR* (forma fosforilada de *EGFR*) (107), aún no estudiado en patología nasosinusal.

Hay que tener en cuenta que la terapia con anti-*EGFR* puede tener resistencias si se asocia con mutación del oncogén *K-RAS* (115). La mutación *K-RAS* se ha demostrado en el 3,5% del CECC, pero no en PI, PI-CEN y CEN, aunque sí se han visto en CEN asociados a papiloma oncocítico (114–117).

***TP53*** es un gen supresor tumoral cuyo locus se localiza en 17p13. Es el gen más frecuentemente mutado en tumores malignos y actúa en los mecanismos de proliferación celular y apoptosis regulando el punto de control T1 del ciclo celular. La inactivación de *TP53* se produce por la pérdida de heterocigosidad o por una doble mutación (112). Se codificaría así la proteína mutada p53 que se expresaría en CECC, en el que está incluido el CEN (5,118,119). En condiciones normales p53 es un regulador negativo del crecimiento celular, pero la proteína mutada promueve el crecimiento tumoral debido a la pérdida de su función reguladora. Diversos autores han observado sobreexpresión de p53 en PI-CEN y CEN en comparación con PI (72,104,119,120). El 50% de los CEN tienen alterada su expresión (92), relacionando su mutación y por tanto sobreexpresión con la transformación maligna (72,112).







## 2. HIPÓTESIS-MODELO TEÓRICO





Sobre este modelo planteamos la siguiente **hipótesis**:

“Es probable que la integración del genoma del VPH en las células de la mucosa nasal altere los genes y proteínas implicados en el ciclo y crecimiento celular (p16, p53, EGFR), facilitando la progresión hacia un tumor maligno. Si estas alteraciones se detectasen en una lesión benigna (PI), se podría establecer la secuencia del proceso de transformación y progresión tumoral para contribuir al diagnóstico precoz del tumor maligno (CEN). Por otro lado, la actividad de estas proteínas, especialmente en el caso de EGFR, también puede ser alterada por mutaciones en los genes que las codifican, por lo que podría establecerse una secuencia independiente en la progresión tumoral”.





## 3. OBJETIVOS





El **objetivo general** que se ha fijado en este trabajo es profundizar en el conocimiento de los factores que intervienen en el proceso de transformación y progresión neoplásica que acontece en la mucosa nasosinusal, teniendo en cuenta sus características clínicas, histopatológicas, de expresión proteica y genético-moleculares.

Para ello se han fijado los siguientes **objetivos específicos** operativos:

1. Describir los aspectos clínico-patológicos con más trascendencia que definen nuestra serie de pacientes con diagnóstico de PI, PI-CEN (PI-CENs y PI-CENm) y CEN.
2. Reconocer los perfiles de expresión de las proteínas p16, p53, pEGFR y EGFR.
3. Identificar mutaciones en los genes *EGFR* y *KRAS*.
4. Establecer el perfil genético-molecular de ganancias y pérdidas en los genes *CDKN2A*, *TP53* y *EGFR*.
5. Determinar la prevalencia de infección por VPH en los subtipos de alto y bajo riesgo oncológico.
6. Relacionar los aspectos clínico-patológicos, la infección VPH, la expresión proteica, las alteraciones genético-moleculares y la presencia de mutaciones, con el fin de establecer patrones que indiquen la transformación y progresión neoplásica y el pronóstico de los pacientes.



## 4. MATERIAL Y MÉTODO



## 4.1. Características del estudio.

Se realizó un estudio retrospectivo y descriptivo en pacientes diagnosticados y tratados quirúrgicamente de PI nasosinusal, PI-CEN y CEN en el Servicio de Otorrinolaringología (ORL) del Hospital Universitario Central de Asturias (HUCA), entre enero de 1989 y diciembre de 2014. El estudio fue aprobado por el Comité Ético Institucional del HUCA y por el CEIC Regional del Principado de Asturias (07/16 para CICPF16008HERM y 2020.048 para FIS PI19/00191). El consentimiento informado se obtuvo de todos los pacientes al firmar la autorización quirúrgica y consentir el uso del material biológico para investigación. Los procedimientos realizados siguieron las normas éticas de la declaración del Helsinki.

## 4.2. Selección de pacientes

Se recogieron un total de 102 pacientes con lesiones nasosinuales que se distribuyeron en tres grupos: 39 PI, 11 PI-CEN y 52 CEN. Todos ellos fueron intervenidos quirúrgicamente con fin curativo. La búsqueda se realizó en los archivos del registro de tumores del HUCA y en el libro de quirófano del servicio de ORL. Las muestras histopatológicas estudiadas fueron obtenidas durante esa primera cirugía. En los pacientes con recidivas de PI (PIr) se indicó cirugía de rescate que también se realizó en los tumores malignos cuando fue técnicamente posible, completando el tratamiento con radioterapia y/o quimioterapia si estaban indicadas, bien de forma complementaria o paliativa.

Los datos clínicos e histopatológicos de la muestra de pacientes se resumen en las tablas 9 y 10.

Los sujetos estudiados debían cumplir los siguientes criterios: 1) Disponer de acceso a una historia clínica bien documentada, con un seguimiento mínimo de 12 meses o hasta el fallecimiento del paciente. 2) Tener un diagnóstico histopatológico de la pieza quirúrgica que se corresponda con PI, PI-CEN o CEN, realizado por un patólogo experimentado en cabeza y cuello. 3) Disponer de muestras tisulares en óptimas condiciones y en pacientes que no habían recibido quimio o radioterapia antes de su obtención.

Tabla 9. Descripción de las variables clínico-patológicas en PI (N=39)			
	PI n (%)	PIr n (%)	Total PI n (%)
	27 (69)	12 (31)	39 (100)
Sexo			
Varón	17 (63)	7 (58)	24 (61)
Mujer	10 (37)	5 (42)	15 (39)
Edad*			
	64 (36-81)	59 (28-85)	62 (28-85)
Clínica			
Obstrucción nasal	26 (96)	11 (92)	37 (95)
Rinorrea	9 (33)	5 (42)	14 (36)
Epistaxis	4 (15)	1 (8)	5 (13)
Algas faciales	2 (7)	1 (8)	3 (8)
Otros síntomas	4 (15)	1 (8)	5 (13)
Localización			
Fosa nasal	11 (41)	5 (42)	16 (41)
Seno maxilar	9 (33)	4 (33)	13 (33)
Seno etmoidal	5 (19)	1 (8)	6 (16)
Seno frontal	2 (7)	2 (17)	4 (10)
Lado			
Derecho	10 (37)	4 (33)	14 (36)
Izquierdo	17 (63)	7 (59)	24 (61)
Ambos	0	1 (8)	1 (3)
Estadio de Krouse			
I	9 (33)	3 (25)	12 (31)
II	15 (56)	5 (42)	20 (51)
III	3 (11)	4 (33)	7 (18)
Tipo de cirugía			
Abierta	2 (7)	4 (33)	6 (15)
Endoscópica	25 (93)	8 (67)	33 (85)

\* Media y rango

El % se redondea a número entero

Tabla 10. Descripción de las variables clínico-patológicas en PI-CENS (n=11) y CEN (n=52)				
	PI-CENS n (%)	PI-CENm n (%)	Total PI-CEN n (%)	CEN n (%)
	7 (64)	4 (36)	11 (100)	52 (100)
<b>Sexo</b>				
Varón	3 (43)	1 (25)	4 (36)	37 (71)
Mujer	4 (57)	3 (75)	7 (64)	5 (29)
<b>Edad *</b>				
	55 (22-73)	72 (52-82)	61 (22-82)	66 (42-92)
<b>Clínica</b>				
Obstrucción nasal	7 (100)	1 (25)	8 (73)	23 (44)
Rinorrea	2 (29)	4 (100)	2 (18)	15 (29)
Epistaxis	2 (29)	4 (100)	2 (18)	15 (29)
Algas faciales	4 (57)	4 (100)	8 (73)	35 (67)
Otros síntomas	4 (57)	3 (75)	7 (64)	22 (42)
<b>Localización</b>				
Fosa nasal	1 (14)	1 (25)	2 (18)	-
Seno maxilar	4 (57)	3 (75)	7 (64)	42 (81)
Seno etmoidal	2 (29)	0 (0)	2 (18)	10 (19)
Seno frontal	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
<b>Lado</b>				
Derecho	3 (43)	2 (50)	5 (45,5)	25 (48)
Izquierdo	3 (43)	2 (50)	5 (45,5)	27 (52)
Ambos	1 (14)	0 (0)	1 (9)	0 (0)
<b>TNM (T)</b>				
T1	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
T2	1 (14)	1 (25)	2 (18)	5 (10)
T3	3 (43)	0 (0)	3 (27)	16 (31)
T4a	3 (43)	1 (25)	4 (37)	23 (44)
T4b	0 (0)	2 (50)	2 (18)	8 (15)
<b>TNM (N)</b>				
N0	5 (71)	3 (75)	8 (73)	41 (79)
N1	2 (29)	1 (25)	3 (27)	8 (17)
N2	0 (0)	0 (0)	0 (0)	2 (4)
<b>TNM (M)</b>				
M0	7 (100)	4 (100)	11 (100)	52 (100)
M1	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
<b>Estadio tumoral</b>				
Estadio I	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
Estadio II	1 (14)	1 (25)	2 (18)	5 (10)
Estadio III	3 (43)	0 (0)	3 (27)	15 (29)
Estadio IVa	3 (43)	1 (25)	4 (37)	24 (46)
Estadio IVb	0 (0)	2 (50)	2 (18)	8 (15)
<b>Tratamiento</b>				
Cirugía abierta	5 (71)	3 (75)	8 (73)	43 (83)
Cirugía endoscópica	2 (29)	1 (25)	3 (27)	9 (17)
Radioterapia	6 (86)	3 (75)	9 (82)	40 (77)
Quimioterapia	0 (0)	0 (0)	0 (0)	2 (4)

\*Media y rango, el % se redondean a número entero

## 4.3. Recogida de muestras

Las muestras tisulares fueron obtenidas de la pieza quirúrgica una vez extirpada la lesión. Se excluyeron los pacientes tratados previamente con quimio-radioterapia. Para realizar los estudios todas las muestras de tumor primario fueron obtenidas a partir de muestras tumorales incluidas en bloques de parafina, una vez procesada la pieza para su estudio histopatológico en el servicio de Anatomía Patológica.

En total se recogieron 112 muestras de los 102 pacientes, debido a que en algunos se analizó más de una muestra por paciente.

El trabajo de laboratorio se realizó en el Laboratorio del grupo de Oncología de Cabeza y Cuello del Instituto de Investigación Sanitaria del Principado de Asturias (ISPA).

## 4.4. Procedimiento inmunohistoquímico

Para proceder a este estudio se elaboraron bloques de *tissue-array* con 87 pocillos que fueron teñidos por inmunohistoquímica (IHQ). Detallamos a continuación todos los pasos seguidos en el procedimiento.

### 4.4.1. Técnica de los *tissue-array*.

#### *Selección de las zonas a muestrear.*

Los bloques de tejido parafinado correspondientes a las 112 muestras se cortaron en secciones de 3  $\mu$ m y tiñeron de manera habitual con hematoxilina-eosina (H-E). Las laminillas teñidas correspondientes a cada bloque fueron revisadas por un patólogo, que seleccionó al menos 3 áreas representativas que se marcaron con círculos de 1 mm de diámetro.

#### *Elaboración del *tissue-array**

El número de muestras por bloque y su tamaño se determinaron según el número de casos, el diámetro de las agujas perforadoras y la distancia entre las perforaciones. Cada bloque de *tissue-array* medía 2 x 2,5 cm, con pocillos de 1mm de diámetro, siguiendo las instrucciones técnicas del proveedor del aparato. Cada bloque constaba de 87 pocillos y 29 muestras. Extraídos los cores de tejido de 1mm de diámetro de las áreas representativas marcadas, se colocan en el bloque receptor, según el esquema previamente definido. Completado este



proceso se homogeneiza el bloque en la estufa a 60°C durante 12-15 minutos, colocándolo boca abajo sobre un portaobjetos y nunca directamente sobre el metal. Se deja enfriar a temperatura ambiente, introduciéndolo en la nevera para endurecerlo antes de proceder a cortarlo.

El esquema topográfico del *tissue-array* se representa en una tabla de Word que dispone de tantas casillas como cilindros del tejido. En cada casilla se coloca el número de biopsia, pudiendo especificar la topografía y morfología del tumor. En la figura 10 se resume el proceso de elaboración de los *tissue-array*.

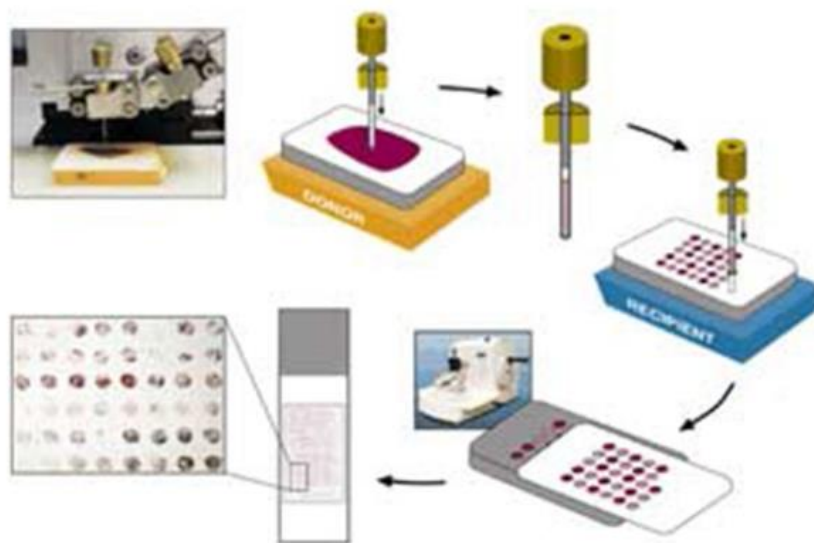


Figura 10. Resumen del proceso de elaboración del *tissue-array*. Tras analizar un patólogo las laminillas teñidas con H-E de cada muestra tumoral, se seleccionan 3 secciones de 1mm que se colocan en el bloque receptor según un esquema topográfico previamente establecido (121).

#### *Secciones del bloque*

La matriz del *tissue-array* se corta en secciones de 3  $\mu\text{m}$ . El primer corte útil se tiñe con H-E de control. En el caso de necesitar más de 20 secciones por bloque, se hace un nuevo control con H-E.

Si las secciones no se van a utilizar de inmediato, los portaobjetos deben cubrirse con una fina capa de parafina y guardarse refrigerados en una caja en la nevera a -3°C.

#### 4.4.2. Técnica inmunohistoquímica

Las secciones parafinadas de 3 $\mu\text{m}$  de los *tissue-arrays* se adhieren a los portas siliconizados (DakoCytomation), que se dejan en la estufa a 56-58°C un mínimo de 2 horas y un máximo de

18. Posteriormente se realiza el desparafinado de las muestras con xilol e hidratación con alcoholes de graduación decreciente. A continuación, se efectúa el desenmascaramiento antigénico con una solución recuperadora de antígenos en el Ptlink de Dako a 95°C durante 20 minutos, manteniendo las preparaciones dentro de la solución recuperadora de antígenos hasta que la temperatura baja a 60°C. Finalizado el proceso se colocan las preparaciones en un recipiente con un buffer de lavado.

A partir de este paso, la técnica se realiza en el inmunoteñidor Autostainer plus de DakoCytomation. En primer lugar, se introducen las muestras en un buffer de lavado y en una solución bloqueante de peroxidasa durante 5 minutos. Se añade el anticuerpo monoclonal primario dirigido hacia la proteína que deseamos detectar durante un tiempo variable, según el tipo de anticuerpo utilizado. La inmunodetección fue realizada con el sistema de polímeros de dextran EnVision Plus (PDE) "anti-mouse", empleando como sustrato el cromógeno diaminobenzidina (DakoCytomation).

El sistema EnVision Plus es una técnica de tinción en dos pasos en la que al anticuerpo primario le sigue el polímero conjugado de alto peso molecular dextrano, al que se unen de manera covalente un gran número de moléculas de enzima (peroxidasa de rábano) y del anticuerpo secundario. El sistema aumenta la sensibilidad y permite incrementar las diluciones de anticuerpo primario, con menos fondo que las técnicas tradicionales de avidina-biotina.

Por último, se contrasta la preparación mediante hematoxilina durante un minuto y luego se deshidrata mediante alcoholes de graduación ascendente, colocando al final un cubreobjetos (Figura 11).

Mediante esta técnica se estudió la expresión de 4 proteínas: p16, p53, pEGFR y EGFR. Se consiguió realizar la técnica en las 116 muestras de p53, p16 y pEGFR, sin embargo en 11 muestras no se pudo realizar EGFR debido a que algunos casos no tenían representación suficiente en los TMA por ser de un grosor menor, no pudiendo obtener cortes suficientes para realizar en ellos las técnicas IHQ.

La batería de anticuerpos utilizados en la IHQ se presenta en la tabla 11.



Figura 11. Resultado final del TMA después de realizar los cortes, adherirlos al porta siliconizado, realizar la tinción con H-E y añadir el anticuerpo para su estudio IHQ. A la izquierda, imagen completa del portaobjetos. A la derecha, detalle de las distintas muestras incluidas.

Tabla 11. Anticuerpos utilizados en la IHQ

Anticuerpo	Tipo	pH	Dilución	Minutos incubación	Clon (laboratorio)
p16	Murino	9	Prediluido	30	E6H4 (VentanaRoche, Glostrup, Dinamarca)
p53	Murino	9	1:10	15	DO-7 (Dako, Glostrup, Dinamarca)
pEGFR	Murino	9	Prediluido	30	D7A5 (Cell signalling technology, Cambridge, Reino Unido)
EGFR	Murino	9	1:10	30,5	2-18C9 (Dako, Glostrup, Dinamarca)

#### 4.4.3. Interpretación

Los resultados obtenidos por IHQ fueron valorados por dos investigadores independientes que desconocían los datos clínico-patológicos de la muestra. Cuando existían discrepancias se resolvieron mediante la evaluación conjunta utilizando un microscopio de visualización múltiple.

En la tabla 12 se esquematizan los criterios seguidos para cuantificar la expresión, considerando que la inmunotinción fue positiva con >10% de extensión. En el caso de p16 se consideró además un punto de corte >70% de las células, siendo considerado este grado 3 de tinción predictor de infección por VPH en otros trabajos publicados (96,101,102). Para evaluar la expresión de p16, independientemente de su relación con VPH, se utilizó la graduación general que consideraba positiva la inmunotinción >10% de la extensión celular.

Tabla 12. Tipo de tinción considerada positiva y cuantificación

Anticuerpo	Tipo de tinción	Cuantificación de la expresión
p16	Citoplasmática	Negativa: <10% extensión Grado 1: 10-30% extensión Grado 2: 30-70% extensión Grado 3: >70% extensión*
p53	Nuclear	Negativa: <10% extensión Grado 1: 10-30% extensión Grado 2: 30-70% extensión Grado 3: >70% extensión
pEGFR	Membrana citoplasmática con o sin tinción del citoplasma	Negativa: <10% extensión Grado 1: 10-30% extensión Grado 2: 30-70% extensión Grado 3: >70% extensión
EGFR	Membrana citoplasmática con o sin tinción del citoplasma	Negativa: <10% extensión Grado 1: 10-30% extensión Grado 2: 30-70% extensión Grado 3 : >70% extensión

\*Posible predictor de infección VPH.

En la figura 12 se muestran ejemplos de las inmunotinciones para las proteínas estudiadas.

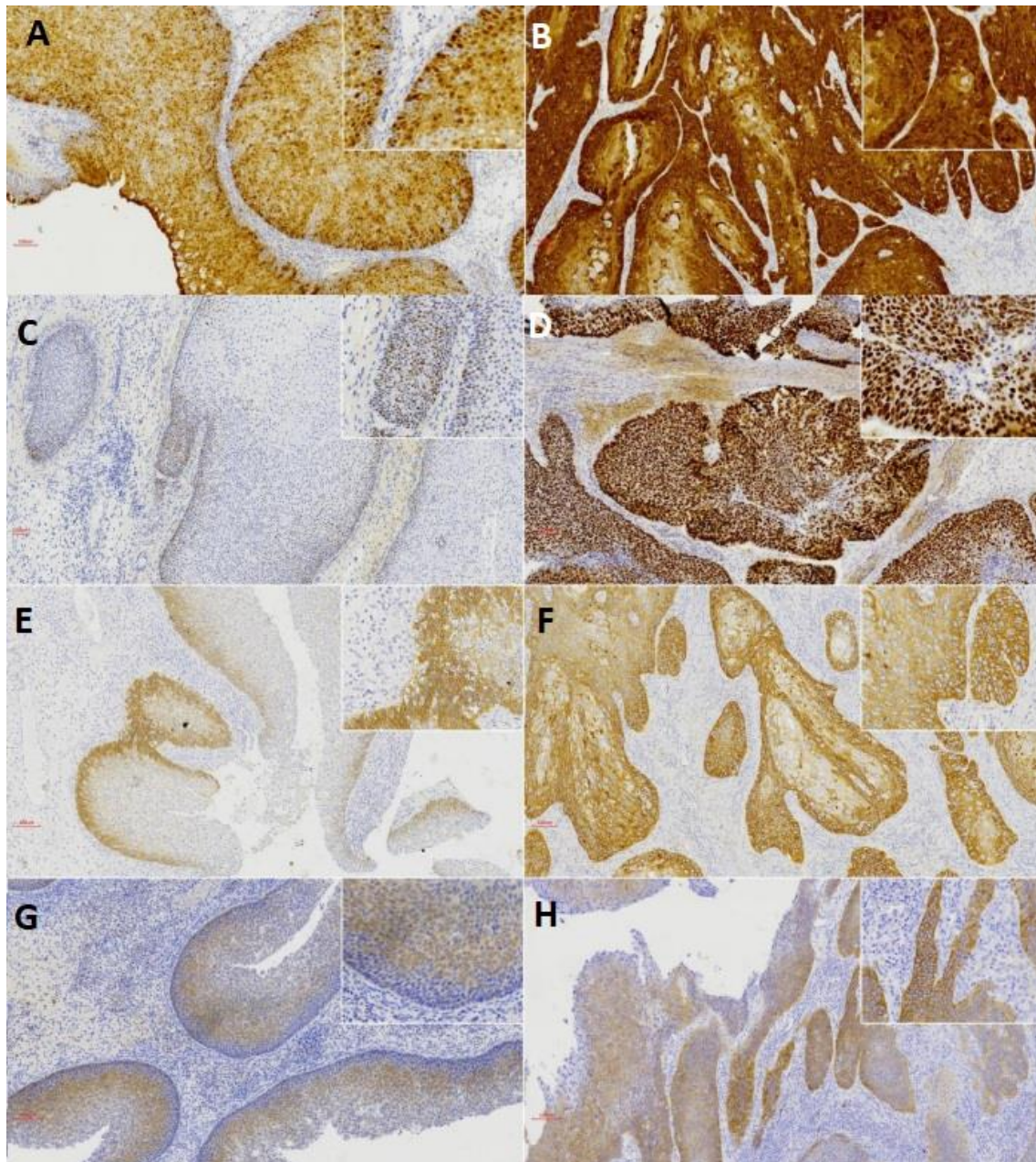


Figura 12. Microfotografías de inmunotinción para p16, p53, EGFR y pEGFR a 10x y 20x (detalle). Tinción citoplasmática positiva para p16 en PI (A) y CEN (B). Tinción nuclear positiva para p53 en PI (C) y CEN (D). Tinción citoplasmática y membranosa positiva para EGFR en PI (E) y CEN (F). Tinción citoplasmática y membranosa positiva para pEGFR en PI (G) y CEN (H).

## 4.5. Extracción del ADN

El ADN se extrajo de las muestras parafinadas con el kit QIAmp DNA Mini KIT (Quiagen GmbH, Hilden, Alemania), de acuerdo con las recomendaciones del fabricante y utilizando un protocolo previamente publicado (21).

De las muestras incluidas en parafina se obtienen 3 cortes de 50  $\mu\text{m}$ . También se hizo un corte de 5  $\mu\text{m}$  que se tiñó con H-E con el fin de observar la muestra al microscopio óptico y seleccionar la zona tumoral más pura, evitando contaminaciones por necrosis, tejido y células sanas como linfocitos y fibroblastos. Según esta selección se realiza una microdissección en los tres cortes de 50  $\mu\text{m}$ , recogiendo el material en un tubo de microcentrífuga.

El primer paso consiste en desparafinar la muestra. Para ello se incubó la muestra en 1 mL de xilol a 55°C durante 10 minutos, centrifugando a 14.000 rpm otros 10 minutos para eliminar los restos de parafina. Repetimos dos veces más la incubación con xilol y a continuación añadimos 1 mL de metanol, incubando la muestra 5 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente se realizaron 2 ciclos de centrifugación a 14.000 rpm durante 10 minutos a 45°C descartando el sobrenadante. Añadimos 1 mL de etanol absoluto, agitamos bien y centrifugamos a 14.000 rpm otros 5 minutos. Tras decantar el sobrenadante, dejamos secar al aire el tejido depositado en el fondo del tubo de microcentrífuga.

A continuación, se añade 1 mL de tiocianato sódico, 1M para limpiar el ADN y, tras mezclar bien en un agitador, se deja incubando toda la noche a 37°C en una placa térmica con agitación. A la mañana siguiente se centrifugan los tubos durante 5 minutos a máxima velocidad y se decanta el sobrenadante. Seguidamente se añade 1 mL de PBS para lavar y eliminar los restos de tiocianato sódico de los tubos, se mezcla bien, se centrifuga y se decanta el sobrenadante. Tras repetir una vez más este lavado con PBS, los tubos son centrifugados de nuevo para retirar el PBS que pudiera quedar retenido en el tejido.

Una vez limpia y desparafinada la muestra, se disgrega mecánicamente cortándola en pequeños fragmentos que son depositados en un tubo de microcentrífuga de 1,5mL.

Posteriormente se realiza el lisado añadiendo 200  $\mu\text{L}$  del tampón de lisis ATL (QIAamp tissue extraction kit, Qiagen) y 20  $\mu\text{L}$  de proteinasa K (concentración de almacenamiento: 10mg/mL). Se mezcla bien en un agitador y se deja incubando a 56°C en una placa térmica con agitación. Por la tarde se vuelven a añadir otros 20  $\mu\text{L}$  de proteinasa K, se mezcla bien y se deja incubando a 56°C toda la noche.

A la mañana siguiente se añaden 200  $\mu\text{L}$  de tampón AL (Qiagen), se agita enérgicamente y se incubó a 70°C durante 10 minutos. Se añaden 200  $\mu\text{L}$  de etanol absoluto y se agita enérgicamente durante 15 segundos para precipitar el ADN. Posteriormente se aplica el contenido del tubo de microcentrífuga a una columna de afinidad (QIAamp®) que se coloca en un tubo de recolección de 2 mL. La columna y el tubo de recolección se centrifugan durante 1 minuto a 8.000 rpm y el filtrado es eliminado. Posteriormente se procede a la purificación del



ADN añadiendo sobre la columna 500  $\mu$ L del tampón AW1, centrifugando a 8.000 rpm durante 1 minuto. Tras eliminar el filtrado se continúa con un segundo lavado añadiendo a la columna 500  $\mu$ L del tampón AW2 y centrifugando a 14.000 rpm durante 3 minutos. Se coloca la columna de afinidad en un nuevo tubo de microcentrífuga y se añaden 200  $\mu$ L de agua destilada para eluir el ADN de la columna. Se incuba durante 1 minuto y se centrifuga 1 minuto a 8.000 rpm. Finalmente el ADN se almacena a 4°C.

La concentración y la pureza del ADN obtenido se determinan midiendo su absorbancia a 260 y 280 nm en un espectrofotómetro NanoDrop 1000 (versión 3.1.0), (NanoDrop Technologies Inc.). La absorbancia a 260 nm nos indica la concentración de ADN que tenemos en nuestra muestra y la relación A260/A280 el grado de pureza de la muestra. Se consideran aceptables purezas con valores mayores de 1,5 (óptimo 1,7-1,9).

Mediante electroforesis en un gel de agarosa al 1% se puede comprobar que la extracción de ADN ha sido correcta.

## 4.6. Técnica de PCR

Por medio de secuenciación directa se comprobó la presencia de mutaciones en los exones 20 de *EGFR* y 2 de *KRAS* (codones 12 y 13). Se decidió investigar solo estas regiones ya que la mayoría de mutaciones activadoras ocurren en ellas, aunque también se han descrito en los exones 18, 19 y 21 de *EGFR* y en el exón 3 de *KRAS* (122,123).

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) es una técnica utilizada para amplificar el ADN utilizando secuencias cortas de ADN o cebadores para seleccionar y amplificar parte del genoma. Los cebadores utilizados para la secuenciación de *EGFR* y *KRAS* se muestran en la tabla 13.

La amplificación se llevó a cabo en el termociclador Simpliamp Thermal Cycler VXA24811 en condiciones estándar.

Tabla 13. Cebadores utilizados para la secuenciación de *EGFR* y *KRAS*

<i>EGFR</i> Exon 20 Fw	CCCTGTGCTAGGTCTTTTG
<i>EGFR</i> Exon 20 Rv	GTCTTTGTGTTCCCGGACAT
<i>KRAS</i> Exon 2 Fw	TACTGGTGGAGTATTTGATAGTG
<i>KRAS</i> Exon 2 Rv	CTGTATCAAAGAATGGTCCTG

Las condiciones utilizadas para realizar la PCR fueron las siguientes:

- *EGFR* exón 20: (5min/95°C + (15'' 95°C/30'' 57°C/1min 72°C) x 35 ciclos + 7min/72°C + 4°C).
- *KRAS* exón 2: (5min/95°C + (30'' 95°C/45'' 60°C/1min 72°C) x 30 ciclos + 7min/72°C + 4°C).

Los productos de PCR se purificaron con Exo-BAP Mix (EURx Ltd, Gdansk, Polonia) de acuerdo con las especificaciones del fabricante, y se analizaron mediante secuenciación Sanger utilizando el ABI PRISM 3100 y el Analizador Genético 3730 (Applied Biosystems, Foster City, CA, EEUU).

## 4.7. Técnica de MLPA

### 4.7.1. Fundamento de la técnica

La Amplificación de Sondas Dependiente de Ligandos o MLPA ("Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification") permite la detección de cambios en el número de copias de hasta 50 secuencias diana diferentes de ARN o ADN en la misma reacción, sin que se precisen cultivos celulares o células vivas. Se utilizó ADN extraído de muestras tumorales parafinadas según el protocolo anteriormente descrito (105).

Para este experimento se utilizó ADN control procedente de ganglios linfáticos de sujetos sanos y ADN de los tumores primarios.

Cada una de las sondas de MLPA está formada por dos oligonucleótidos, uno sintético y otro derivado del vector M13. El oligonucleótido sintético está formado por un "primer" en el extremo 5' de 19 nucleótidos ("primer" Y) y por una secuencia de hibridación de 21-30 nucleótidos que se unirá a la muestra de ADN. El oligonucleótido derivado del vector M13 tiene un tamaño diferente en cada sonda, que varía gracias a una secuencia de relleno ("stuffer sequence") de diferentes tamaños que se intercala entre el "primer" de 36 nucleótidos, situado en el extremo 3' ("primer" X) y la secuencia de hibridación de 25-43 nucleótidos que se unirá a la muestra de ADN (Figura 13).



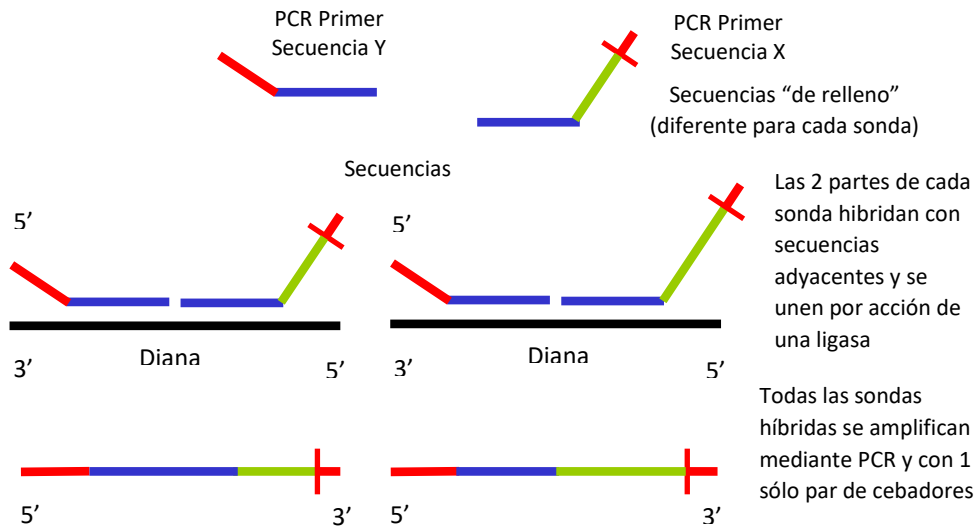


Figura 13. Bases moleculares de la MLPA.

La mezcla de sondas de cada “kit” contiene además sondas de control interno llamadas DQ (“DNA Quality”). En la amplificación por PCR estas sondas control generan productos más pequeños que los amplificados por las sondas de genes. El control interno determina si la calidad y concentración del ADN de la muestra son las necesarias para obtener un resultado óptimo. El control interno está formado por dos tipos de sondas:

- 1- Cuatro fragmentos de ADN que generan productos amplificados de 64, 70, 76 y 82 pares de bases (pb), incluso si se omite el proceso de ligación.
- 2- Un producto de amplificación de 94 pb dependiente del proceso de ligación y del ADN de la muestra.

El tamaño de los cuatro picos del control interno (64-82 pb), una vez amplificados por PCR, depende de la cantidad de ADN de la muestra. Serán difícilmente visibles si el ADN es >100 ng y tendrán un tamaño menor que el fragmento amplificado de 94 pb si la cantidad de ADN es de aproximadamente 50 ng. Si estos 4 fragmentos tienen un tamaño similar o mayor que el fragmento de 94 pb y los productos de PCR de 130-482 pb, significa que la reacción de ligación ha fallado o que la cantidad de ADN es escasa y los resultados obtenidos no tienen validez. El tamaño del pico de 94 pb debe ser similar al obtenido por los productos amplificados de las sondas de genes y nos sirve de control para afirmar que el experimento ha sido satisfactorio (Figura 14).

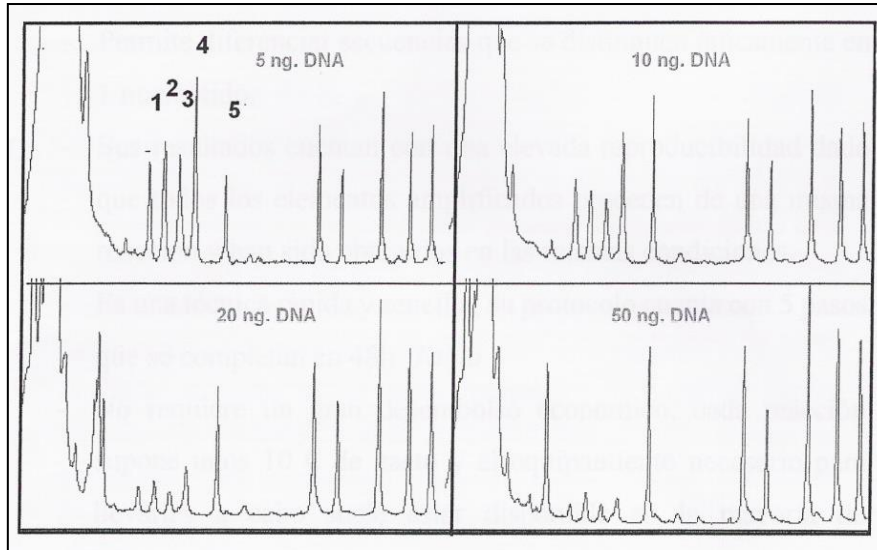


Figura 14. Calidad el ADN. Si los cuatro primeros picos -de control- (picos 1, 2, 3, 4) son más altos que los picos del producto de amplificación de 94 pb (pico 5) el ADN de la muestra es insuficiente o bien hay fracaso en la reacción de ligación.

#### 4.7.2. Protocolo del experimento

El *primer día* del experimento, el ADN previamente extraído de cada muestra (100-200 ng) se desnaturaliza en un termociclador, aplicando un ciclo de 5 minutos a 98°C y enfriando posteriormente a 25°C. Se mezcla el ADN desnaturalizado con las sondas del “kit” y su correspondiente tampón de hibridación y se coloca, de nuevo, en el termociclador en un ciclo único de un minuto a 95°C y 16 horas a 60°C para que las sondas hibriden sobre el ADN de la muestra.

El *segundo día* se procede a la ligación de los dos oligonucleótidos de las 56 sondas que han hibridado sobre el ADN. Para ello, se añade al tubo de PCR la mezcla de ligación con el enzima ligasa y su tampón y se coloca de nuevo en el termociclador 15 minutos a 54°C, seguido de 5 minutos a 98°C, y posterior enfriamiento a 25°C. Una vez ligados los moldes de las 56 regiones, se procede a preparar la mezcla de tampón y los “primers” para la PCR, el tampón del enzima de dilución y la polimerasa para la amplificación de las 56 sondas. Todas las sondas ligadas poseen las mismas secuencias en sus extremos, permitiendo su amplificación simultánea por PCR utilizando sólo un par de “primers”. Los oligonucleótidos no ligados al ADN de la muestra no serán amplificados por PCR y, por tanto, no precisan ser eliminados.

Una vez añadidos los “primers”, se colocan de nuevo las muestras en el termociclador y se corre el programa de PCR aplicando 1 minuto a 60°C, 33 ciclos, (35 en caso de que la concentración de ADN fuese muy baja: inferior a 30 ng/μl) con tres pasos cada ciclo de 30

segundos a 95°C, 30 segundos a 60°C y 60 segundos a 72°C, y enfriando finalmente a 4°C. Las muestras son almacenadas a 4°C hasta realizar el análisis de fragmentos.

Cada sonda da lugar a un producto de amplificación de tamaño único de entre 130 a 482 pb debido a la diferencia en tamaño de la secuencia relleno. Los productos amplificados de las sondas se analizan mediante electroforesis capilar. Para ello mezclamos 2 µL del producto de amplificación con 10 µL de formamida y 0,5 µL de marcador interno. La mezcla se desnaturaliza por calor y se somete a electroforesis capilar en un equipo "ABI Prism 3100" (Applied Biosystems, Warrington, UK). Los capilares están rellenos de un polímero que ofrece dificultad a la migración permitiendo separar los fragmentos por su tamaño, corriendo los fragmentos más pequeños más rápido que los grandes. Al final del recorrido hay un láser y un sistema de captura de la señal de fluorescencia que permite detectar los distintos productos. Estos productos finales serán analizados con el software "GeneScan v3.7" (Applied Biosystems, Warrington, UK), que permite determinar su tamaño por interpolación con distintos fragmentos de tamaño conocido del marcador interno y cuantificar cada producto según su intensidad de fluorescencia. Cada sonda vendrá representada por un pico. La señal relativa de cada sonda se define dividiendo la medida del área de cada pico entre la suma de todas las áreas de todos los picos de sondas de una muestra.

#### 4.7.3. Sondas empleadas

Se utilizó el "kit" SALSA p105-D2 Glioma-2 (MCR-Holland, Amsterdam, Holanda), que contiene 56 sondas (incluyendo 10 de referencia y 4 como control interno). Este kit permite la detección de copias aberrantes de *EGFR* (7p11.2) utilizando 11 sondas específicas, además de detectar copias aberrantes de *PDGFRA* (4q12), *CDKN2A* (9p21.3), *PTEN* (10q23.31), *TP53* (17p13.1), *CDK4-MIR26A2-MDM2* (12q14-q15) y *NFKBIA* (14q13.2), *EGFRvIII* (variante activa de *EGFR* con delección en los exones 2-7).

#### 4.7.4. Interpretación

Para definir la ganancia o pérdida de material genético en cada una de las sondas de una muestra hay que normalizar los datos obtenidos. Para ello se calcula la mediana, desviación estándar y valor mínimo y máximo para las muestras control y para cada una de las muestras que queremos estudiar. La relación entre el valor del tejido estudio y el control se calcula aplicando las siguientes fórmulas:

1. Relación mínima = cociente entre el valor mínimo del tejido estudio y el valor máximo del control.
2. Relación máxima = cociente entre el valor máximo del tejido estudio y el valor mínimo del control.
3. Relación tumor/control = media de la relación mínima y la relación máxima.
4. Desviación estándar de la relación tejido estudio/control = diferencia entre la relación tejido estudio/control y la relación mínima.

Con este análisis formalizado se obtiene un diagrama de barras de las sondas estudiadas en el ADN tumoral. Si la relación tejido estudio/control es mayor de 1,25 y la desviación estándar es >1 se interpreta como ganancia, si es menor de 0,8 y la desviación estándar es <1 se interpreta como pérdida. Por último, si la relación tejido estudio/control es >2 se interpreta como amplificación.

## 4.8. Virus del Papiloma Humano (VPH)

La calidad del ADN obtenido fue comprobada mediante amplificación de  $\beta$ -globina con PCR (cebador directo 5'-ACACAACCTTGTGTGTTCACTAGC-3' y cebador reverso 5'-CAAACCTTCATCCACGTTCCACC-3').

Se realizó la PCR con cebadores MY11/GP6 (dirigidos al fragmento L1 de VPH) para detectar un amplio espectro de genotipos VPH.

Se tomaron 25  $\mu$ l de mezcla de reacción que contenía 1x tampón de PCR, 2 mmol/L de MgCl<sub>2</sub>, 50  $\mu$ mol/L de cada desoxinucleósido, 0,5  $\mu$ mol/L de cebadores directos y reversos, 10  $\mu$ l de muestra de ADN y 1 U de polimerasa *Taq* (Promega Biotech Iberica SL Madrid, España), por perfil térmico de 35 ciclos: desnaturalización a 94°C durante 30 segundos, hibridación a 55°C durante 30 segundos y extensión a 72°C durante 1 minuto, con una desnaturalización inicial a 94°C durante 5 minutos y una extensión final a 72°C durante 10 minutos.

Los fragmentos de ADN amplificados de aproximadamente 200 pb se identificaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 1,5% con bromuro de etidio. Todas las muestras positivas para el fragmento L1 se analizaron mediante hibridación utilizando sondas específicas para cada subtipo VPH (Tabla 14).

Tabla 14. Sondas específicas por subtipo VPH	
Subtipo VPH	Sonda de hibridación específica
VPH 6	MY12: 5'CATCCGTAACACTACATCTTCCA-3'
VPH 11	MY13: 5'-TCTGTGTCTAAATCTGCTACA3'
VPH 16	MY14: 5'-CATAACCTCCAGCACCTAA-3'
VPH 18	WD74: 5'GGATGCTGCACCCGGCTGA-3'
VPH 31	WDB128: 5'TTGCAAACAGTGATACTACATT-3'
VPH 33	MY16: 5'CACACAAGTAACTAGTGACAG-3'
VPH 35	5'-CTGCTGTGTCTTCTAGTGA-3'
VPH 39	5'ATAGAGTCTTCCATACCTTC-3'
VPH 45	MYB69: 5'ATACTACACCTCCAGAAAAGC-3'
VPH 51	5'-TGCTGCGGTTTCCCAA-3'
VPH 52	5'-GAATACCTTCGTCATGGC-3'
VPH 56	5'-TGTCTACATATAATTCAAAGC-3'
VPH 58	SANTI58: 5'TGAAGTAACTAAGGAAGGTACA-3'
VPH 66	5'-AGCTAAAAGCACATTAATAA-3'
VPH 68	5'CTGAATCAGCTGTACCAAT-3'

## 4.9. Descripción de las variables

En el estudio realizado se seleccionaron las siguientes variables clínico-patológicas:

- Edad (años).
- Sexo (hombre, mujer).
- Síntomas al diagnóstico: obstrucción nasal, algias faciales, epistaxis, rinorrea, otros.
- Localización tumoral: fosa nasal, seno maxilar, etmoides, seno frontal, seno esfenoidal.
- Lateralidad: izquierdo, derecho, ambos.
- Estadio de Krouse para PI: I, II, III.
- Estadio TNM para PI-CEN y CEN: I, II, III, IVa, IVb.
  - Categoría T: T1, T2, T3, T4a, T4b
  - Categoría N: N0, N1, N2.
  - Categoría M: M0, M1.
- Tratamiento complementario: radioterapia, quimioterapia.
- Supervivencia libre de enfermedad.
- Supervivencia global y supervivencia específica para tumor.
- Estado del paciente (vivo, muerto por tumor, muerto por otra causa, vivo con recidiva).

Las variables de expresión IHQ para p16, p53, pEGFR y EGFR, fueron la positividad o negatividad de tinción, siendo considerada positiva una tinción membranosa, citoplasmática o

nuclear en función del anticuerpo utilizado. Se consideraron tinción negativa, y tinción positiva (>10%), considerando dentro de la positividad tres grados de extensión (1 a 3); en p16, particularmente el grado 3 (>70%).

Las variables génicas estudiadas por PCR fueron la presencia o ausencia de mutaciones activadoras en *EGFR* y *KRAS*.

Las variables génicas estudiadas por MLPA fueron la pérdida o ganancia de *EGFR*, *CDKN2a* y *TP53*. La relación tejido estudio/control se interpreta como ganancia si es mayor de 1,2 y su desviación estándar es > 1, como pérdida si es menor de 0,8 y su desviación estándar < 1, y como amplificación cuando la relación tumor/control es > 2.

Las variables relacionadas con VPH fueron la presencia o ausencia de infección por los distintos subtipos, oncogénicos (subtipos 16 y 18) y no oncogénicos (subtipos 6, 11, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 66, 68) de VPH.

## 4.10. Análisis estadístico

El análisis estadístico sobre las distintas variables estudiadas se realizó con el programa informático SPSS (“Statistical Package for Social Science”), versión 27 para Windows (SPSS® Inc. Illinois, EE.UU.).

La asociación de caracteres cualitativos se llevó a cabo mediante la prueba de correlación  $\chi^2$  de Pearson o la prueba del estadístico exacto de Fisher. El nivel de significación se fijó para una  $p \leq 0,050$ .

Para estimar la supervivencia se utilizaron las curvas Kaplan-Meier, comparando las distribuciones de supervivencia mediante la Prueba del Logaritmo del Rango “Log-Rank Test”. Los valores con  $p \leq 0,050$  fueron considerados significativos.







## 5. RESULTADOS



## 5.1. Aspectos clínico-patológicos

Se describen todas las características clínico-patológicas de los 102 pacientes estudiados. Para ello diferenciamos grupos de pacientes con PI, PI-CEN y CEN.

### 5.1.1. Características de PI

Se incluyeron 39 pacientes con diagnóstico de PI: 27 con PIn (PI no recidivante), y 12 con PIr (PI recidivante). En los pacientes con recidivas y varias muestras, se tomó como referencia la muestra más antigua. Las variables clínico-patológicas de este grupo se resumen en la tabla 9.

En el grupo de pacientes con PI predominan los varones (61,5%), tanto en el subgrupo PIn (63%) como en PIr (58,3%). No se observó diferencia significativa en la distribución por sexos entre ambos subgrupos ( $p=0,784$ ).

La edad media al diagnóstico fue 62,5 años y la mediana 64 años, con un rango entre 28-85 años y desviación típica de 14,75. La edad al diagnóstico de PIr fue ligeramente menor que la de PIn, sin diferencia significativa.

El síntoma más habitual fue la obstrucción nasal, presente en el 95%, seguida por rinorrea (36%), epistaxis (13%), además de otros síntomas menos frecuentes. No se observó diferencia entre los subgrupos de PI.

La localización más frecuente fue la fosa nasal (41%) y la menos el seno frontal (10,3%). Se observó mayor tendencia en el complejo nasosinusal izquierdo (61,5%), con lesiones bilaterales en un paciente (2,6%).

El estadio de Krouse más frecuente fue el II (51,3%), seguido del I (30,8%) y el III (17,9%). Esta tendencia se mantuvo en ambos subgrupos. La poliposis nasosinusal era un antecedente presente en 5 pacientes (12,8%). La tasa de recidiva en nuestra serie fue 30,7%.

El tratamiento realizado en todos los casos fue exclusivamente quirúrgico, con predominio de la técnica endoscópica (84,6%). La cirugía abierta se realizó con mayor frecuencia en el grupo PIr (33,3% vs 7,4%), alcanzando valor significativo ( $p=0,038$ ). Todas las cirugías abiertas se realizaron en los 10 primeros años del estudio.

El 31% de los pacientes con PI presentaron recidivas (PIr) y el 69% no (PIn). El tiempo libre de enfermedad fue de 213,9 meses (12-279), con una supervivencia libre de enfermedad de 97% en el primer año y 74% a los 5 años (Figura 15).

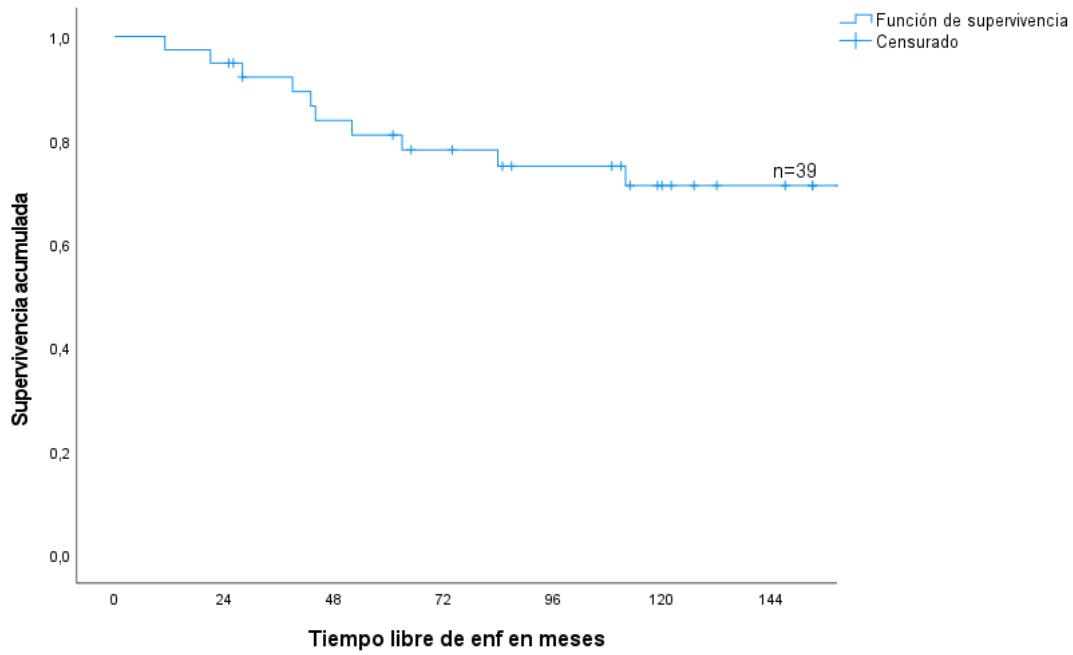


Figura 15. Supervivencia libre de enfermedad en los pacientes con PI.

No se observó diferencia significativa entre el tiempo libre de enfermedad y el sexo ( $p=0,341$ ). El tiempo libre de enfermedad fue 85 meses en el estadio III de Krouse y de 227,6 y 232,9 meses para los estadios I y II respectivamente, alcanzando diferencias significativas ( $p=0,023$ ) (Figura 16). Si analizamos solo los estadios I y II, no se observan más recidivas en el segundo ( $p=1,000$ ), ni existe diferencia entre ambos grupos en el tiempo libre de enfermedad ( $p=0,991$ ).

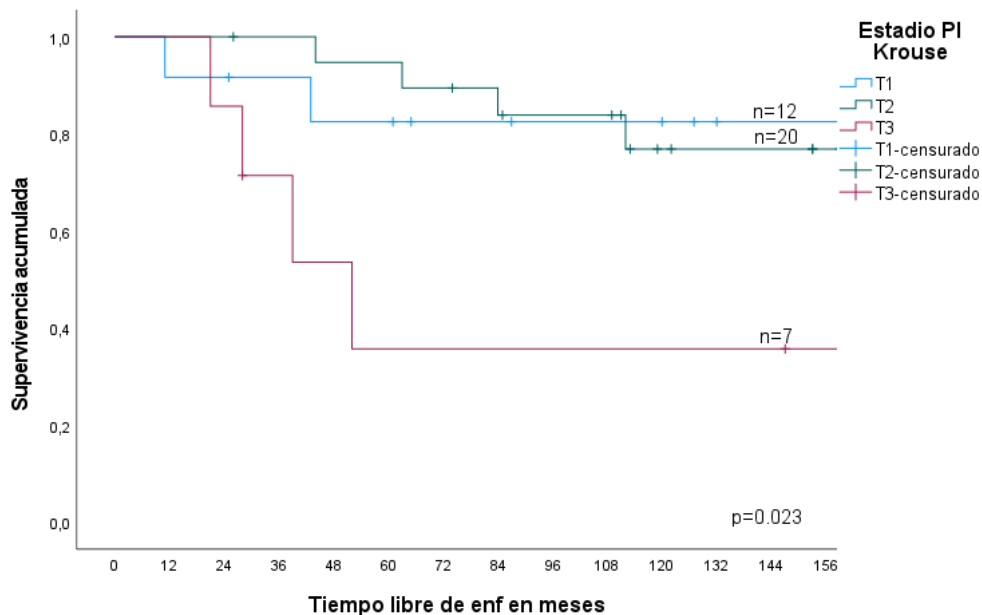


Figura 16. Tiempo libre de enfermedad en los pacientes con PIr según el estadio de Krouse ( $p=0,023$ ).

Las recidivas fueron más frecuentes en el seno frontal respecto a las otras localizaciones, aunque sin alcanzar una diferencia significativa ( $p=0,321$ ).

Al tratarse de una patología benigna ningún paciente falleció a causa de la enfermedad, por lo que no se muestra el análisis de supervivencia global ni específica.

### 5.1.2. Características de PI-CEN

Se incluyeron 11 pacientes con PI-CEN: 7 con PI-CENs y 4 con PI-CENm. Las variables clínico-patológicas de este grupo se resumen en la tabla 10.

En PI-CEN, tanto en el subgrupo PI-CENs como en PI-CENm, predominan las mujeres, sin alcanzar diferencia significativa.

La edad media de PI-CEN fue 60,91 años y la mediana 65 años, con un rango comprendido entre 22-82 años y una desviación típica de 17,39. La edad media fue superior en PI-CENm respecto a PI-CENs sin alcanzar diferencia significativa ( $p=0,122$ ).

La obstrucción nasal y las algias faciales fueron los síntomas más habituales (72,7%). Las algias faciales fueron más frecuentes que en PI, alcanzando valor significativo ( $p<0,001$ ). Se observaron además otros síntomas indicativos de estadios avanzados o enfermedad maligna en 63,6% de los pacientes (exoftalmos, taponamiento ótico, fístula oroantral, edema facial o nódulo cervical), alcanzando diferencia significativa con PI ( $p<0,001$ ). No hubo diferencia significativa entre los subgrupos PI-CENs y PI-CENm.

La localización más frecuente correspondió al seno maxilar (63,6%), seguida por la fosa nasal y el etmoides.

La categoría T predominante fue T4a (36,4%) seguida de T3 y finalmente T2 y T4b. Ningún caso era T1 al diagnóstico. Se vieron metástasis linfáticas (N+) en 3 pacientes (27,3%) y ninguno presentó metástasis a distancia (M0).

En cuanto al grado de diferenciación tumoral, 5 (45,5%) eran poco diferenciados, 2 (18,2%) moderadamente diferenciados y 4 (36,4%) bien diferenciados.

Todos fueron intervenidos quirúrgicamente, la mayoría con cirugía abierta y recibieron radioterapia complementaria el 81,8%.

En 10 pacientes (91%) hubo recidiva del tumor. La supervivencia libre de enfermedad fue 36% en el primer año y 9% a los 5 años (Figura 17).

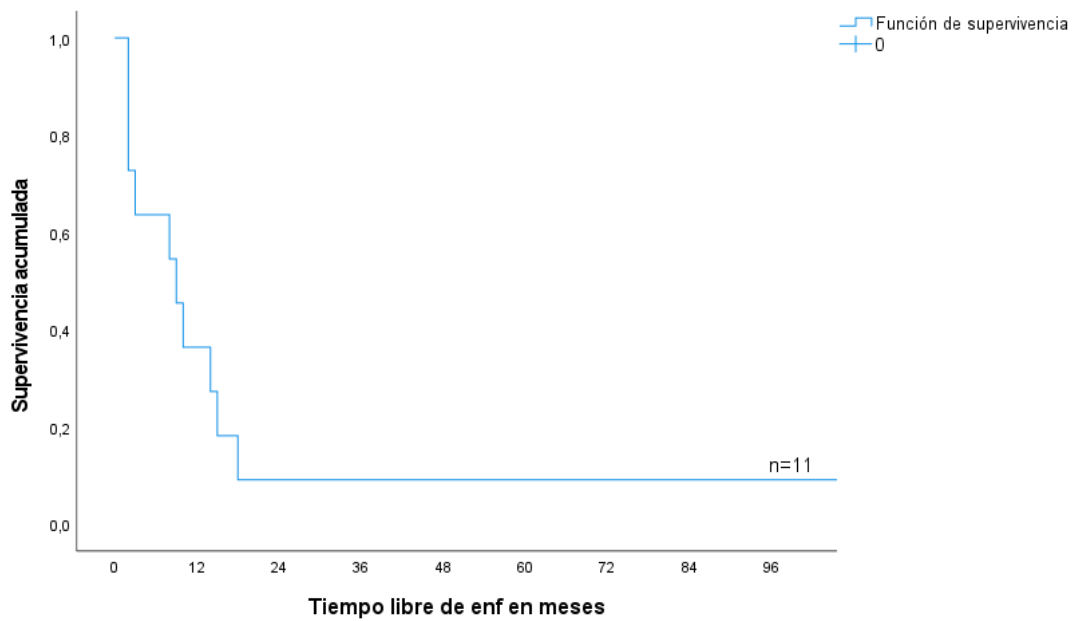


Figura 17. Supervivencia libre de enfermedad en los pacientes con PI-CEN.

La supervivencia global fue 82% al año y 9% a los 5 años (Figura 18). Todos los pacientes murieron a causa de la enfermedad, por lo que los datos de supervivencia global y supervivencia específica se equiparan.

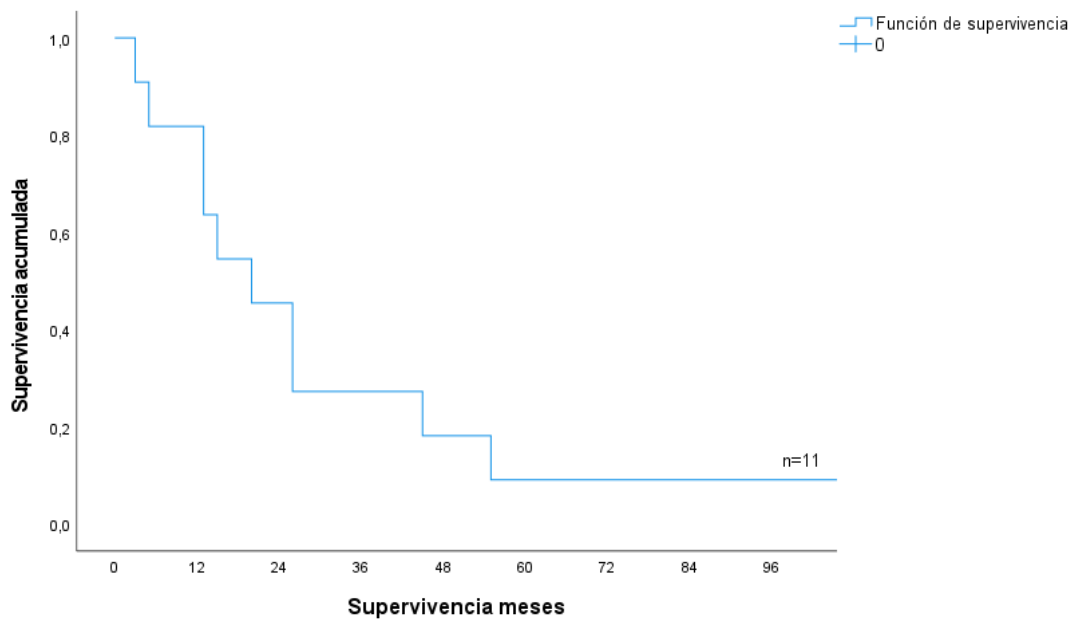


Figura 18. Supervivencia global en los pacientes con PI-CEN.

No se observó relación significativa entre la supervivencia libre de enfermedad y la supervivencia global con las variables clínico-patológicas sexo, estadio y localización del tumor, quizá por el reducido número de casos en este grupo. Se observó que los pacientes con más de 70 años presentaban una supervivencia libre de enfermedad de 12,2 meses, siendo 47,2 meses en los menores de 70 años, aunque esa diferencia no alcanzó valor significativo ( $p=0,077$ ).

### 5.1.3. Características de CEN

Se incluyeron 52 pacientes con diagnóstico de CEN de *novo* (sin antecedente de PI ni PI simultáneo). Este apartado se resume en la última columna de la tabla 10.

En el grupo CEN, al contrario que en PI-CEN, predominan los varones (71,2%). La edad media fue 66,12 años, con una mediana de 66 y un rango entre 42-92 años. La media de edad, superior en este grupo, mostró diferencia significativa respecto a PI-CEN ( $p=0,025$ ).

Los síntomas más habituales fueron las algias faciales (67,7%), seguido de obstrucción nasal (45,2%), epistaxis y rinorrea (29%). Otros síntomas menos frecuentes fueron la aparición de fístula oroantral o edema facial (12,9% ambos), hiposmia, exoftalmos (6,4% ambos) y fístula cutánea (3,2%).

Todos los pacientes tenían diagnóstico histopatológico de carcinoma escamoso con diferente grado de diferenciación (44,2% poco, 38,5% bien y 17,3% moderadamente diferenciado).

En la clasificación TNM la mayoría tenían una categoría T avanzada en el momento del diagnóstico (T3: 30,8%; T4a: 44,2%; T4b: 15,4%), superior a la del grupo PI-CEN, tanto en categoría T como en estadio global (III-IV) (90,4% vs 82%). Las metástasis linfáticas (N+) se presentaron en 21%, valor similar al PI-CEN.

Todos los pacientes fueron intervenidos quirúrgicamente, predominando la cirugía abierta, aunque en los últimos años ya se utilizó la técnica endoscópica (9 casos, 17,3%). En 40 pacientes (76,9%) se hizo tratamiento complementario con radioterapia, y a 2 de ellos (3,8%) se les administró también quimioterapia.

No se realizó tratamiento complementario postquirúrgico a 10 pacientes debido al estadio inicial de la lesión, recidiva precoz o éxitus postoperatorio, por ese orden.

Durante el seguimiento de los pacientes con CEN se observó recidiva en 43 (82,7%). La supervivencia libre de enfermedad fue 31% al año y 8% a los 5 años (Figura 19).

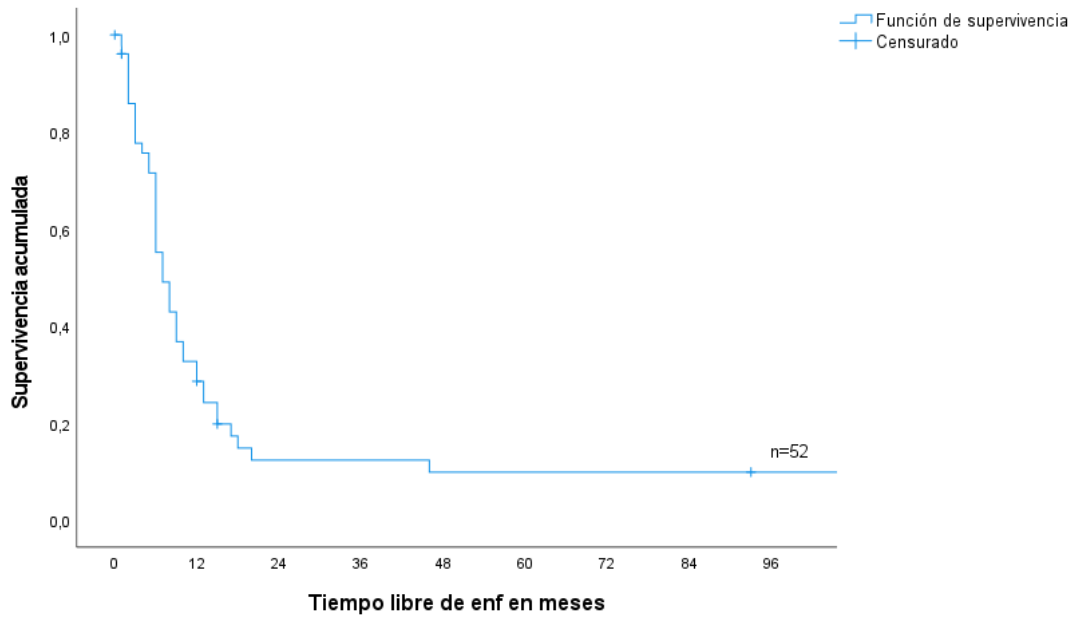


Figura 19. Supervivencia libre de enfermedad en los pacientes con CEN.

Se observó una relación significativa ( $p=0,025$ ) entre la supervivencia libre de enfermedad y la categoría T (Figura 20), diferencia que se mantiene si dividimos la categoría en precoz (T1 y T2) y avanzada (T3, T4a y T4b) ( $p=0,050$ ) (Figura 21). Esta diferencia también se constató con la categoría N ( $p=0,039$ ) (Figura 22) y con el estadio global ( $p=0,021$ ) (Figura 23). No se observó relación significativa entre el tiempo libre de enfermedad con edad, sexo o grado de diferenciación histológica.



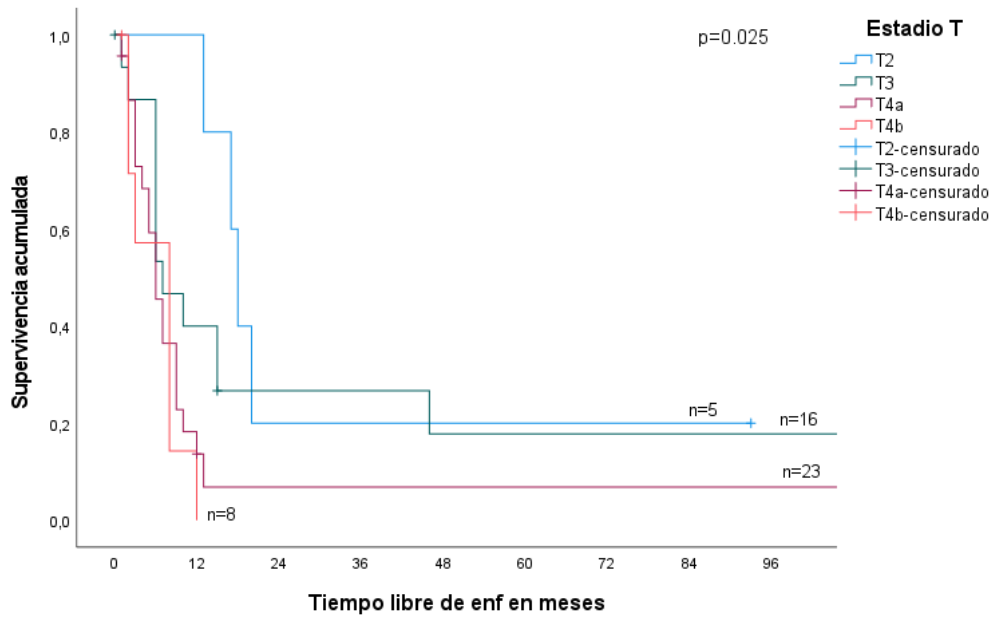


Figura 20. Supervivencia libre de enfermedad en los pacientes con CEN según la categoría T ( $p=0,025$ ).

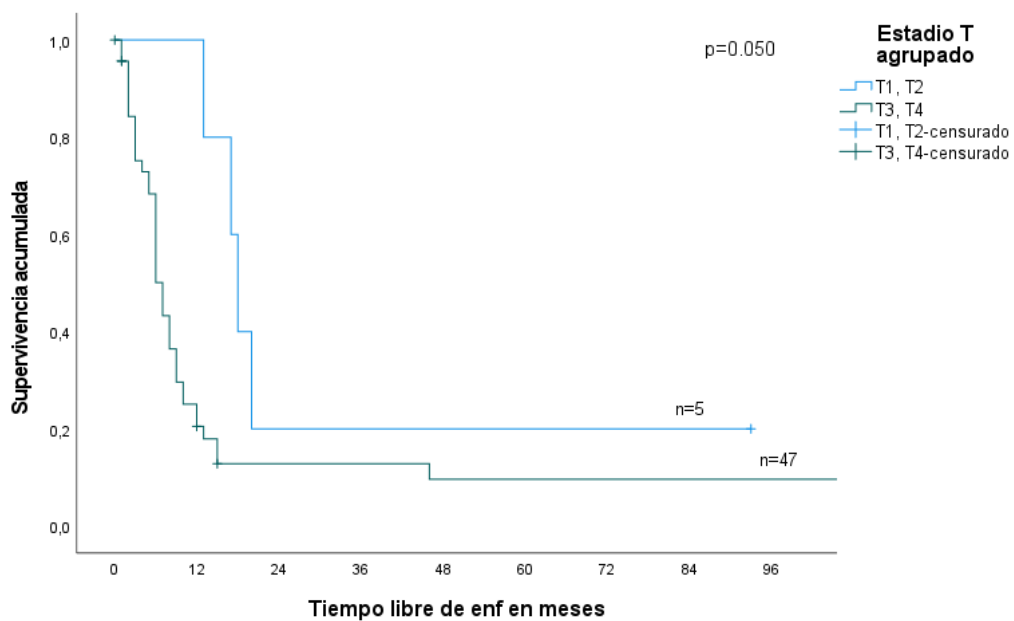


Figura 21. Supervivencia libre de enfermedad en los pacientes con CEN según la categoría T precoz (T1 y T2) y avanzada (T3, T4a y T4b) ( $p=0,050$ ).

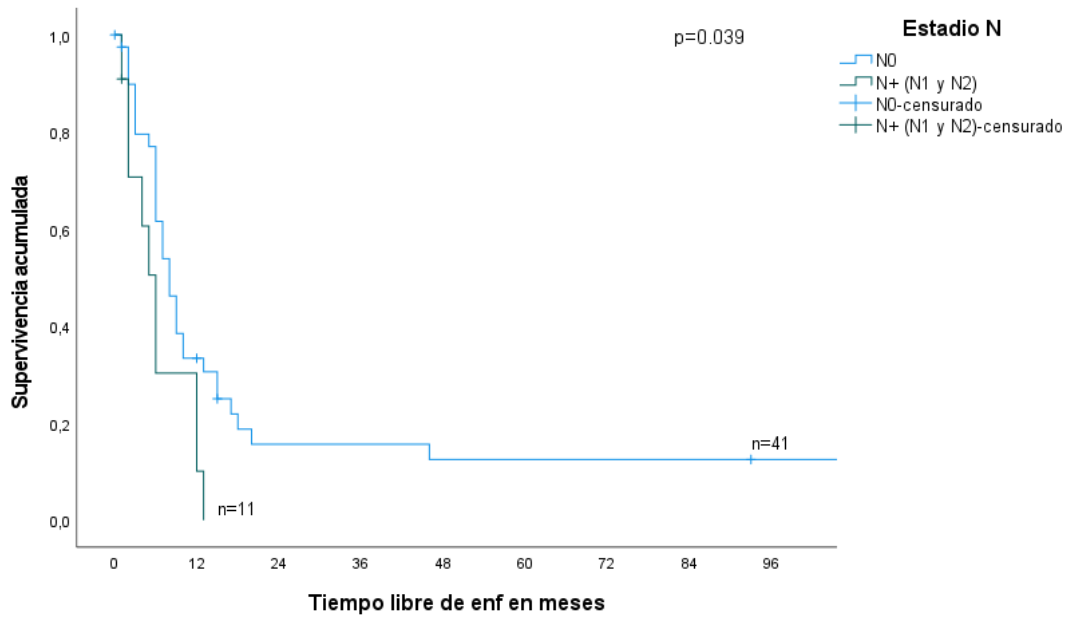


Figura 22. Supervivencia libre de enfermedad en los pacientes con CEN según la categoría N (p=0,039).

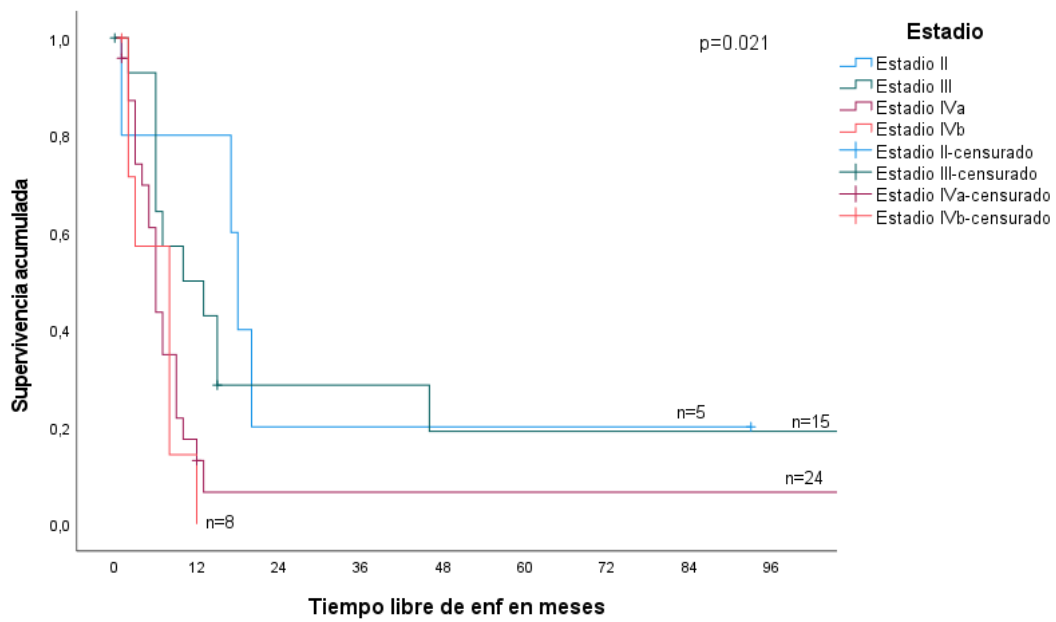


Figura 23. Supervivencia libre de enfermedad en los pacientes con CEN según el estadio (p=0,021).

La supervivencia global fue 61,5% al año y 13% a los 5 años (Figura 24), y la supervivencia específica 65% al año y 17% a los 5 años (Figura 25). La principal causa de muerte fue la recidiva locorregional.

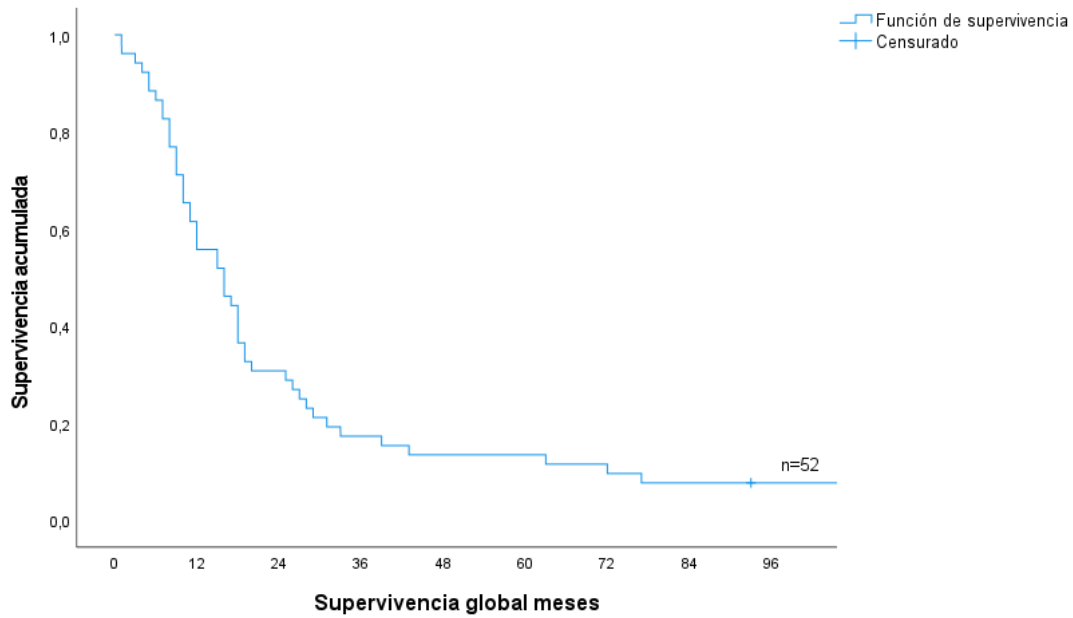


Figura 24. Supervivencia global en los pacientes con CEN.

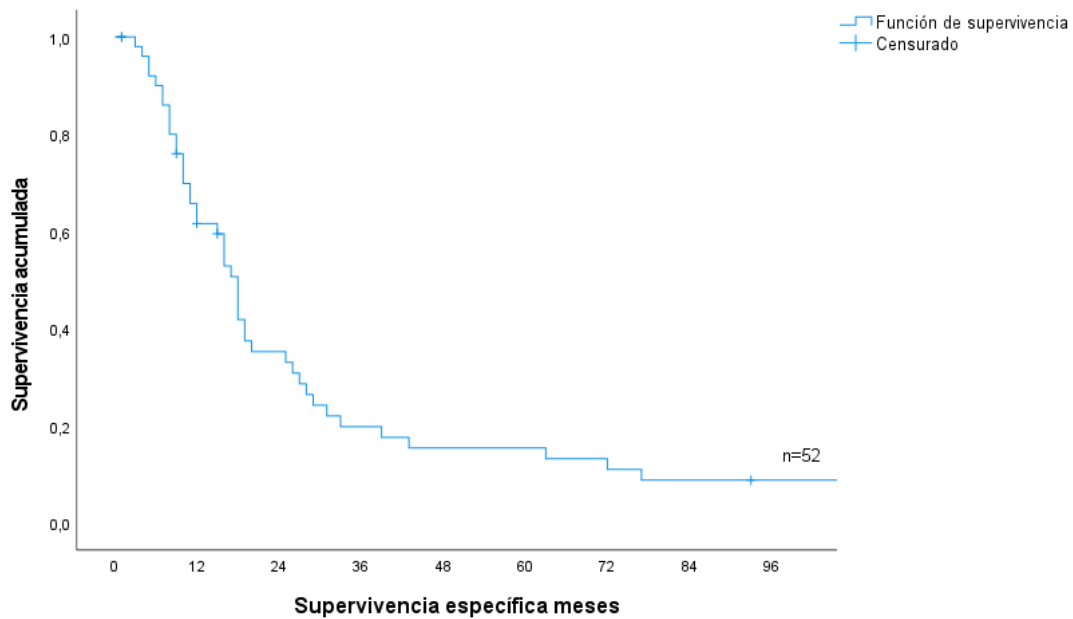


Figura 25. Supervivencia específica para tumor en los pacientes con CEN.

Se observó menor supervivencia global cuanto más avanzada era la categoría T al diagnóstico ( $p=0,057$ ) (Figura 26), pero sin relación con la categoría N ( $p=0,239$ ), ni con el estadio tumoral ( $p=0,061$ ).

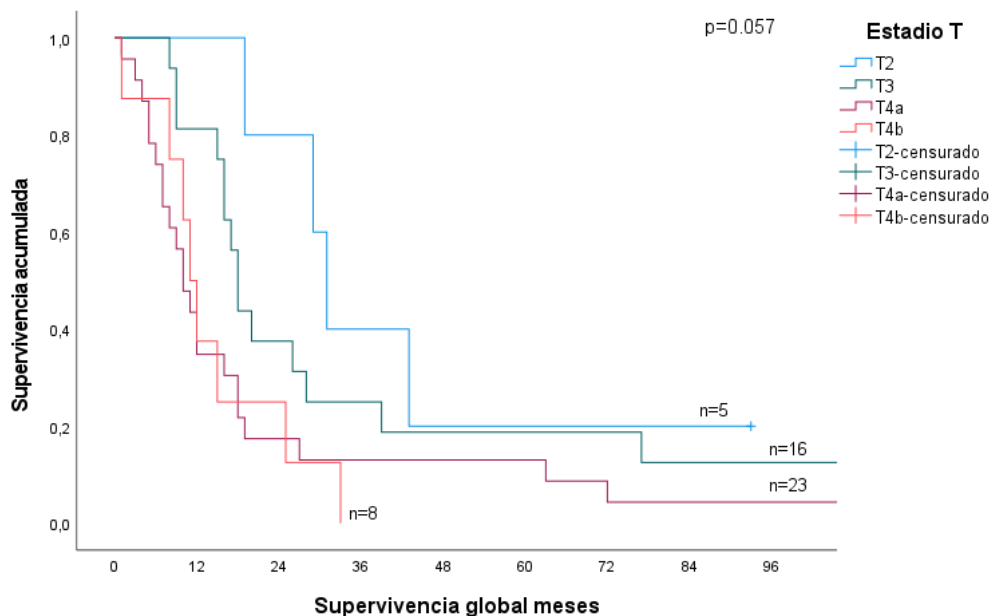


Figura 26. Supervivencia global en los pacientes con CEN según la categoría T ( $p=0,057$ ).

No se obtuvo relación entre la supervivencia global y otras variables clínico-patológicas como sexo, grado histológico y localización tumoral.

## 5.2. Análisis de expresión proteica

En los 102 pacientes incluidos en el estudio se analizaron 116 muestras, ya que algunos tenían más de una. En la tabla 15 se presentan las proteínas estudiadas con IHQ en los tres grupos de pacientes.

Tabla 15. Muestras analizadas con IHQ por cada grupo de pacientes

	p53	p16	pEGFR	EGFR
PI (n=39)	49	49	49	47
PI-CEN (n=11)	15	15	15	6
CEN (n=52)	52	52	52	52
Total (n=102)	116	116	116	105

### 5.2.1. Expresión en PI

#### *Expresión de p53*

Se analizaron 49 muestras correspondientes a los 39 pacientes, 27 del subgrupo PIn y 22 del Plr.

Todas las muestras en las que se estudió p53 fueron adecuadas.

Se observó expresión positiva de p53 en 28 muestras (57,1%), siendo 23 (46,9%) grado 1, 4 (8,2%) grado 2 y 1 (2%) grado 3.

Si separamos las muestras de los subgrupos PIn y Plr, p53 tuvo expresión en 15 PIn (55,5%) y en 13 Plr (59,1%), no existiendo diferencia significativa entre ambos ( $p=0,804$ ).

No se observó relación entre la expresión de p53 y las variables clínico-patológicas estudiadas, el estadio tumoral ni la supervivencia libre de enfermedad ( $p=0,810$ ).

#### *Expresión de p16*

Todas las muestras fueron adecuadas para su estudio.

Se vio expresión de p16 en 45 muestras (91,8%), siendo 5 (10,2%) grado 1 de extensión, 23 (46,9%) grado 2 y 17 (34,7%) grado 3, este último se correspondería con >70% de extensión celular.

Todas las muestras PIn expresaron p16 en algún grado (100%), mientras que la expresión se redujo a 18 (81,8%) en Plr, siendo esta diferencia significativa ( $p=0,021$ ).

Se observó una fuerte relación entre la expresión de p16 y la supervivencia libre de enfermedad, de forma que las muestras negativas se correspondían con pacientes que presentaron recidivas precoces ( $p<0,001$ ) (Figura 27).

Si tenemos en cuenta solo la extensión mayor del 70% o grado 3, se mantiene la tendencia aunque se pierde significación estadística ( $p=0,354$ ).

No se observó relación significativa entre la expresión de p16 y el resto de las variables clínico-patológicas estudiadas.

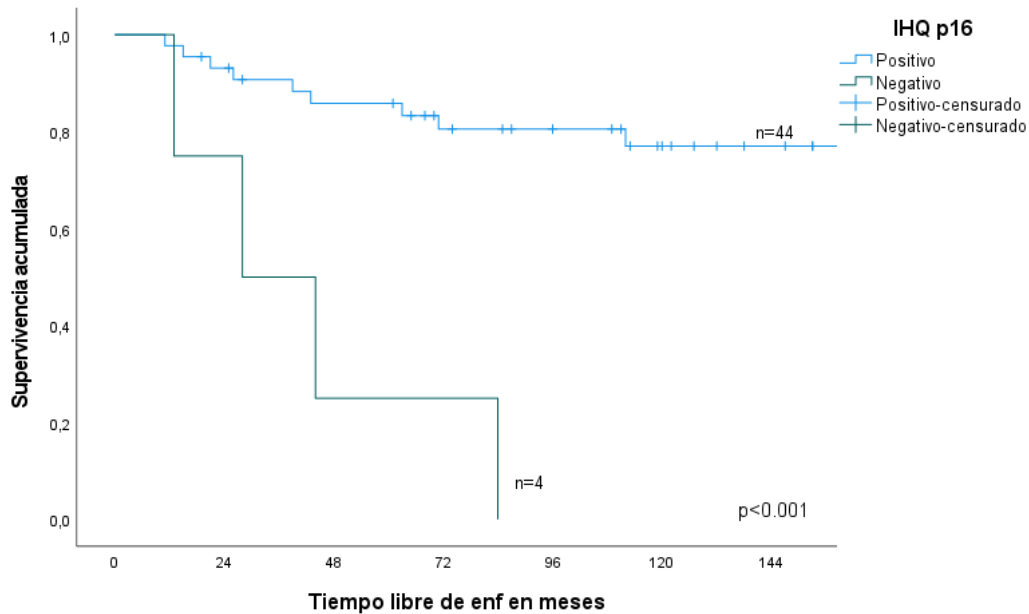


Figura 27. Tiempo libre de enfermedad de los pacientes con PI según la expresión de p16 ( $p < 0,001$ ).

#### *Expresión de pEGFR*

Todas las muestras fueron adecuadas para su estudio.

Se vio expresión de pEGFR en 28 muestras (57,1%), siendo 13 grado 1 (26,5%), 12 grado 2 (24,5%) y 3 grado 3 (6,1%).

No se observó diferencia significativa en la expresión entre PIn y PIr, siendo positiva en 16 PIn (59,2%) y 12 PIr (54,5%) ( $p = 0,740$ ).

No se observó relación significativa entre la expresión de pEGFR y las variables clínico-patológicas estudiadas, ni con la supervivencia libre de enfermedad ( $p = 0,722$ ).

#### *Expresión de EGFR*

Hubo 2 muestras que no fueron adecuadas para el estudio por lo que se estudiaron 47.

Se vio expresión de EGFR en 43 muestras (87,8%), siendo 25 (51%) grado 1, 13 (26,5%) grado 2 y 5 (10,2%) grado 3.

No se observó diferencia significativa en la expresión de EGFR entre PIn y PIr, siendo positivas en 26 PIn (96,3%) y 17 PIr (85%) ( $p = 0,170$ ), ni tampoco se vio relación con las variables clínico-patológicas estudiadas, ni con la supervivencia libre de enfermedad.

### 5.2.2. Expresión en PI-CEN

En este apartado se analizaron 15 muestras, 8 de PI-CENs, y 4 muestras de PI-CENm. Se dispuso además de 2 PI previos al CEN, así como una muestra de metástasis ganglionar de un paciente PI-CENm, que se analizarán por separado respecto al grupo PI-CEN al final del apartado.

#### *Expresión de p53*

Todas las muestras fueron aptas para el estudio con p53, analizando 8 muestras PI-CENs y 4 PI-CENm.

Se observó expresión positiva para p53 en 8 (66,7%), siendo 1 (8,3%) grado 1, 3 (25%) grado 2 y 4 (33,3%) grado 3.

Si separamos las muestras de los subgrupos PI-CENs y PI-CENm, p53 fue positiva en 5 (62,5%) PI-CEN y en 3 (75%) PI-CENm, no observando entre ambos diferencia significativa ( $p=0,665$ ).

Sí se vio relación significativa entre la expresión de p53 y la diferenciación tumoral, expresando positividad el 100% de los tumores bien diferenciados ( $p=0,015$ ). Los pacientes con recidivas expresaban p53 en mayor porcentaje, aunque sin obtener diferencia significativa ( $p=0,140$ ).

La supervivencia libre de enfermedad, supervivencia global y supervivencia específica fueron mayores en los pacientes p53 negativos respecto a los positivos, pero sin alcanzar valores significativos ( $p=0,561$ ,  $p=0,547$  y  $p=0,547$  respectivamente).

No se vio relación entre la expresión de p53 con el resto de variables clínico-patológicas estudiadas.

Se analizaron por separado 3 muestras: 1 metástasis ganglionar de un paciente PI-CENm, que fue p53 positiva+ (igual que el tumor primario) y 2 muestras de PI de pacientes que posteriormente presentaron un PI-CENm, expresando p53 una muestra (50%).

#### *Expresión de p16*

Todas las muestras fueron adecuadas para el estudio con p16.

Se observó expresión positiva en 5 (41,7%) muestras, 1 (8,3%) grado 1, 2 (16,7%) grado 2 y 2 (16,7%) grado 3.

En PI-CENs, hubo positividad en 2 muestras (25%) y en PI-CENm en 3 (75%), aunque esta diferencia no resultó significativa ( $p=0,098$ ). Sin embargo, si tomamos como punto de corte la

expresión del 70%, el 50% de los PI-CENm fueron positivos, mientras que todos los PI-CENs fueron negativos, siendo esta diferencia significativa ( $p=0,028$ ).

Se observa una relación significativa entre la falta de expresión de p16 y la obstrucción nasal ( $p=0,026$ ), diferencia que se acentúa al tener en cuenta el punto de corte  $>70\%$  ( $p=0,011$ ). Se vio también relación significativa entre la expresión de p16 y la categoría T en ambos subgrupos, con categoría T y estadio TNM más avanzados en los tumores que no expresaban p16 ( $p=0,030$  en ambos). Esta significación se perdía si teníamos en cuenta el  $>70\%$  de extensión ( $p=0,187$ ).

No se observó relación entre la expresión de p16 con la supervivencia libre de enfermedad ( $p=0,929$ ), supervivencia global ( $p=0,525$ ) y específica ( $p=0,525$ ), ni con el resto de variables clínico-patológicas estudiadas.

La metástasis cervical analizada fue p16 positiva  $>70\%$ , concordante con el tumor primario del paciente. De los 2 PI analizados que posteriormente presentaron PI-CENm, 1 expresaba p16 (50%).

#### *Expresión de pEGFR*

Todas las muestras fueron adecuadas para el estudio de pEGFR.

Se vio expresión de pEGFR en 6 (50%), 4 (33,3%) con grado de extensión 1, y 2 (16,7%) grado 2.

La expresión de pEGFR fue positiva en 5 PI-CENs (62,5%) y en 1 PI-CENm (25%), sin que esa diferencia resultase significativa ( $p=0,221$ ).

Las algias faciales fueron más frecuentes en tumores pEGFR negativos ( $p=0,026$ ). No se vio relación con el resto de variables clínico-patológicas estudiadas ni con la supervivencia.

La metástasis cervical analizada fue pEGFR negativa, igual que el tumor primario. Ambos PI previos a PI-CENm fueron pEGFR negativos.

#### *Expresión de EGFR*

Solo se pudieron analizar 6 muestras con EGFR (5 PI-CENs y 1 PI-CENm). Se observó expresión de EGFR en 4 muestras (66,7%), 2 con un grado de extensión 1 y 2 grado 2.

No se observó diferencia significativa en la expresión de EGFR entre PI-CENs (60%) y PI-CENm (100%) ( $p=0,439$ ).



Las muestras EGFR positivas fueron más frecuentes en el seno maxilar ( $p=0,014$ ). Se vio relación significativa con la supervivencia libre de enfermedad, teniendo mejor pronóstico aquellas muestras EGFR positivas ( $p=0,018$ ) (Figura 28), pero no con la supervivencia global y específica ( $p=0,224$ ). Dado el reducido número de pacientes que componen este subgrupo estos datos deben ser interpretados con cautela.

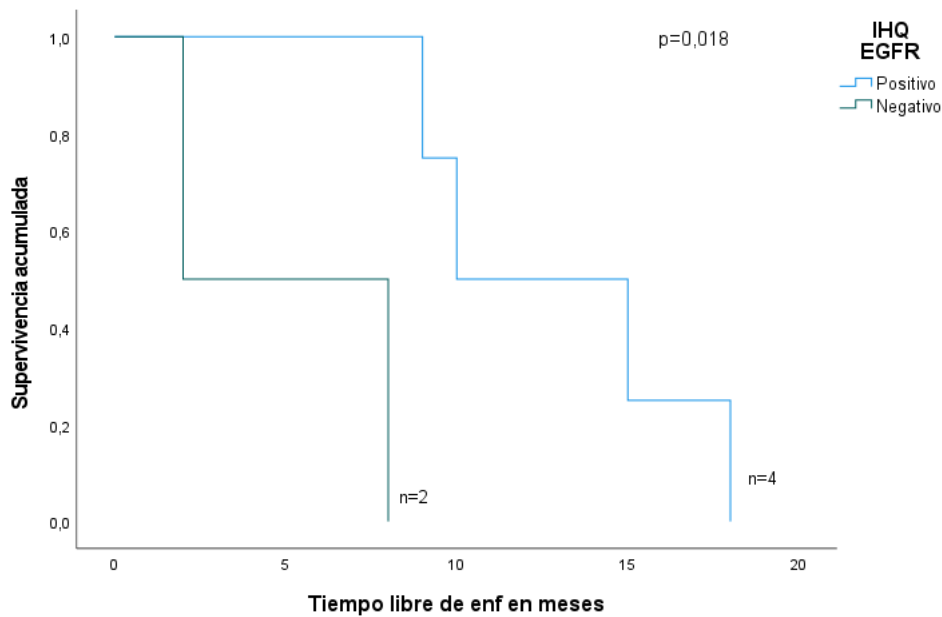


Figura 28. Supervivencia libre de enfermedad en los pacientes PI-CEN según la expresión de EGFR ( $p=0,018$ ).

No se encontró relación entre la expresión de EGFR con el resto de las variables clínico-patológicas estudiadas.

No se pudo analizar EGFR en la metástasis cervical ni en los 2 PI previos a PI-CENm.

### 5.2.3. Expresión en CEN

Se analizaron 52 muestras correspondientes a los 52 pacientes.

#### *Expresión de p53*

Todas las muestras fueron válidas para el estudio de p53. Se observó expresión de p53 en 36 muestras (69,2%), 12 (23%) grado 1, 12 (23%) grado 2 y 12 (23%) grado 3.

La expresión de p53 mostraba relación con la categoría N, con inmunotinción positiva en 10 muestras (100%) con N1 y N2 y en 26 (61%) con N0, alcanzando esta diferencia valor significativo ( $p=0,045$ ), haciéndose mayor esa diferencia al considerar la categoría como N positiva o N negativa ( $p=0,013$ ).

No se vio relación entre la expresión de p53 y el resto de variables clínico-patológicas estudiadas, incluido el grado de diferenciación histológica, supervivencia libre de enfermedad ( $p=0,846$ ), supervivencia global ( $p=0,431$ ) y específica para tumor ( $p=0,446$ ).

### *Expresión de p16*

Todas las muestras fueron adecuadas para su estudio.

Se comprobó la expresión positiva de p16 en 7 (13,5%) muestras, 1 (1,9%) grado 2 y 6 (11,5%) grado 3. Por tanto, si consideramos positivas las muestras con extensión mayor del 70%, el porcentaje de positividad se reduce al 11,5%.

Se observa una relación significativa entre las muestras p16 positivas y el menor grado de diferenciación tumoral ( $p=0,050$ ), aunque sin guardar relación con el estadio tumoral ni con el resto de variables clínico-patológicas.

No se vio relación entre la expresión de p16 y la supervivencia libre de enfermedad ( $p=0,968$ ), global ( $p=0,259$ ) y específica ( $p=0,379$ ).

### *Expresión de pEGFR*

Todas las muestras fueron adecuadas para el estudio.

Se vio expresión de pEGFR en 19 (36,5%) muestras, 6 (11,5%) grado 1, 10 (19,2%) grado 2 y 3 (5,8%) grado 3.

No se vio relación entre la expresión de pEGFR y ninguna de las variables clínico-patológicas estudiadas, aunque la tasa de positividad era del 42% en pacientes con recidiva frente a 11,1% de los que no la presentaron, sin que esta diferencia fuese significativa ( $p=0,082$ ).

El pronóstico fue ligeramente mejor en pacientes pEGFR negativos, sin observar relación significativa entre la expresión de pEGFR y la supervivencia libre de enfermedad ( $p=0,298$ ), global ( $p=0,334$ ) y específica ( $p=0,202$ ).

### *Expresión de EGFR*

Todas las muestras fueron válidas para el estudio.

Se vio expresión de EGFR en 21 (40,4%) muestras.

No se vio relación entre la expresión EGFR y las variables clínico-patológicas estudiadas. EGFR se expresó más en pacientes N+ (63%) respecto a los NO (34,1%), sin que esa diferencia resultase significativa ( $p=0,077$ ).

El pronóstico era ligeramente mejor en pacientes EGFR negativos, sin observar relación significativa entre la expresión de EGFR y la supervivencia libre de enfermedad ( $p=0,179$ ), global ( $p=0,125$ ) y específica ( $p=0,095$ ).

#### 5.2.4. Comparación de expresión proteica entre los grupos

En la tabla 16 se resumen los datos obtenidos en las muestras estudiadas con IHQ para las proteínas p53, p16, pEGFR y EGFR. Posteriormente se expone la relación entre la expresión de dichas proteínas en los tres grupos de pacientes.

**Tabla 16. Resumen de resultados obtenidos por IHQ en todas las muestras**

	PI			PI-CEN			CEN
	PI <sub>n</sub> (n27) (%)	PI <sub>r</sub> (n22) (%)	Total PI (n49) (%)	PI-CEN <sub>s</sub> (n8) (%)	PI-CEN <sub>m</sub> (n4) (%)	Total PI-CEN (n12) (%)	CEN (n52) (%)
p16+	27 (100)	18 (81,2)	45 (91,8)	2 (25)	3 (75)	5 (41,7)	7 (13,5)
p53+	15 (55,5)	13 (59,1)	28 (57,1)	5 (62,5)	3 (75)	8 (66,6)	36 (69,2)
pEGFR+	16 (59,2)	12 (54,5)	28 (57,1)	5 (62,5)	1 (25)	6 (50)	19 (36,5)
EGFR+	26 (96,3) <sup>1</sup>	17 (85,7) <sup>2</sup>	43 (87,8) <sup>3</sup>	3 (60) <sup>4</sup>	1 (100) <sup>5</sup>	4 (66,7) <sup>6</sup>	21 (40,4)

<sup>1</sup>n=27, <sup>2</sup>n=20, <sup>3</sup>n=47, <sup>4</sup>n=5, <sup>5</sup>n=1, <sup>6</sup>n=6.

### *Expresión de p53*

La expresión de p53 no mostró diferencia significativa comparando las muestras en los tres grupos de pacientes, con expresión de 57,1% en PI, 50% en PI-CEN y 69,2% en CEN ( $p=0,439$ ).

Tampoco se vio diferencia significativa entre PI y PI-CEN ( $p=0,548$ ), entre PI-CEN y CEN ( $p=0,863$ ), ni entre PI y CEN ( $p=0,208$ ).

### *Expresión de p16*

La expresión de p16 mostró diferencia significativa entre los tres grupos de pacientes, siendo de 91,8% en PI, 41,7% en PI-CEN y 13,5% en CEN ( $p < 0,001$ ). Esta diferencia se mantenía, aunque con menor fuerza, si se considera como positividad el grado 3 de extensión (>70%), con 34,6% en PI, 20% en PI-CEN y 11,5% en CEN ( $p = 0,010$ ).

La diferencia fue significativa si comparamos los grupos PI y PI-CEN ( $p < 0,001$ ), aunque se perdía al tener en cuenta solo la extensión grado 3 ( $p = 0,227$ ). También encontramos diferencia significativa entre la expresión PI-CEN y CEN ( $p = 0,024$ ), perdiéndose al tomar como referencia el grado 3 de extensión ( $p = 0,628$ ). La diferencia fue significativa al comparar PI y CEN ( $p < 0,001$ ), manteniéndose con la extensión grado 3 ( $p < 0,001$ ).

Por último, si comparamos el grupo PI ( $n = 49$ ), con los PI de los pacientes que posteriormente presentaron PI-CENm ( $n = 2$ ), la expresión de p16 es mayor en el primer grupo (91,8%) respecto al segundo (50%), siendo esta diferencia significativa ( $p = 0,050$ ).

### *Expresión de pEGFR*

La expresión de pEGFR fue 57,1% en PI, 47,6% en PI-CEN y 36,5% en CEN. No se observó diferencia significativa cuando se comparan los tres grupos de pacientes ( $p = 0,116$ ).

No se observan diferencias entre PI y PI-CEN ( $p = 0,655$ ), ni entre PI-CEN y CEN ( $p = 0,389$ ), aunque sí se alcanza valor significativo entre PI y CEN ( $p = 0,038$ ).

### *Expresión de EGFR*

La expresión de EGFR fue 87,8% en PI, 66,7% en PI-CEN y 40,4% en CEN. Esta diferencia entre los tres grupos de pacientes fue significativa ( $p < 0,001$ ).

Se observó diferencia de expresión entre PI y PI-CEN, sin alcanzar valor significativo ( $p = 0,071$ ), al igual que entre PI-CEN y CEN ( $p = 0,218$ ). Sí se observó diferencia significativa entre PI y PI-CENs ( $p = 0,036$ ) y entre PI y CEN ( $p < 0,001$ ), pero no entre PI y PI-CENm ( $p = 0,761$ ).

Analizando la muestra completa, se vio relación significativa entre la expresión de EGFR y la de pEGFR ( $p = 0,002$ ). Si analizamos por grupos, en el grupo PI se mantiene esta relación ( $p = 0,020$ ), pero no en PI-CEN ( $p = 0,221$ ), ni en CEN ( $p = 0,172$ ).

## 5.3. Aspectos genéticos

Vamos a referirnos por un lado al análisis de las ganancias/pérdidas en el número de copias para los genes *TP53*, *CDKN2A* y *EGFR* con MLPA, para continuar con el estudio de las mutaciones en *EGFR* y *KRAS*.

### 5.3.1. Análisis de ganancia/pérdida de *TP53*, *CDKN2A* y *EGFR*

Se analizaron con MLPA las ganancias y pérdidas génicas de *TP53* y *CDKN2A* en 47 muestras (19 PI (6 PIn y 13 Pir), 6 PI-CEN (2 PI-CENs y 4 PI-CENm) y 22 CEN); y de *EGFR* en 57 muestras (19 PI (6 PIn y 13 Pir), 7 PI-CEN (3 PI-CENs y 4 PI-CENm) y 31 CEN).

Se demostró pérdida de *TP53* en 2 muestras (4,2%) y de *CDKN2A* en 8 muestras (17%), pero sin observar ganancias en dichos genes. Se confirmó ganancia de *EGFR* en 10 muestras (17,5%).

Desglosamos estos resultados según el grupo de estudio.

#### *Ganancia/pérdida de TP53, CDKN2A y EGFR en PI*

Se analizaron 19 muestras de PI (6 PIn y 13 Pir).

Se demostró pérdida de *CDKN2A* en 1 muestra del subgrupo PIn (16,6%). *EGFR* presentó ganancia en dos muestras (10,5%), una del subgrupo PIn y otra del Pir. No se observaron pérdidas ni ganancias en *TP53*.

Entre los subgrupos PIn y Pir no se observó diferencia significativa en ganancias y pérdidas de *EGFR* y *CDKN2A*.

La supervivencia libre de enfermedad fue mayor en el paciente con pérdida de *CDKN2A*, pero sin alcanzar valor significativo ( $p=0,446$ ), al igual que en los pacientes con ganancias en *EGFR* ( $p=0,358$ ).

No se observó relación entre la pérdida y las ganancias en *CDKN2A* y *EGFR* con el resto de variables clínico-patológicas estudiadas.

#### *Ganancia/pérdida de TP53, CDKN2A y EGFR en PI-CEN*

Se analizaron 6 muestras de PI-CEN (2 PI-CENs y 4 PI-CENm) con *TP53* y *CDKN2A* y 7 muestras (3 PI-CENs y 4 PI-CENm) con *EGFR*.

Se observó pérdida de *TP53* en una muestra de PI-CEN (16,6%), perteneciente a PI-CENs (50%), y pérdida de *CDKN2A* en dos muestras PI-CEN (33,3%), del subgrupo PI-CENm (50%).

En PI-CENs observamos además ganancia *EGFR* en dos muestras (66,6%).

No se vio relación entre ganancia/pérdida génica y las variables clínico-patológicas estudiadas, ni tampoco entre los subgrupos PI-CENs y PI-CENm en el número de copias de *TP53* ( $p=0,121$ ) y *CDKN2A* ( $p=0,221$ ). Sí se observó diferencia significativa en el número de copias de *EGFR*, siendo su ganancia más frecuente en PI-CENs (66%) que en PI-CENm (0%) ( $p=0,050$ ). No se vieron diferencias significativas entre las ganancias/pérdidas génicas y la supervivencia libre de enfermedad, global y específica.

#### *Ganancia/pérdida de TP53, CDKN2A y EGFR en CEN*

Se analizaron 22 muestras para *TP53* y *CDKN2A* y 31 muestras para *EGFR*.

Se observó pérdida de *TP53* en 1 muestra (4,5%) y de *CDKN2A* en 5 muestras (22,7%). No se observó ganancia ni amplificación en ninguna de ellas. *EGFR* presentó ganancia en 6 muestras (19,3%).

No se vio relación entre la pérdida/ganancia de *TP53*, *CDKN2A* y *EGFR* y las variables clínico-patológicas estudiadas, a excepción de la ganancia en *EGFR* que era más frecuente en pacientes con categoría N + (44%) en comparación con los N - (9%) ( $p=0,024$ ).

No se observó relación entre las alteraciones de *TP53*, *CDKN2A* y *EGFR* con la supervivencia libre de enfermedad, global y específica.

#### *Relación entre ganancias/pérdidas de TP53, CDKN2A y EGFR y los grupos de pacientes*

Los resultados de los tres grupos de pacientes se resumen en la tabla 17.

La pérdida en *TP53* fue más frecuente PI-CEN (16%) que en CEN (4,5%) y PI (0%), aunque sin alcanzar diferencias significativas ( $p=0,210$ ).

La pérdida de *CDKN2A* fue también más frecuente en PI-CEN (30%), seguida de CEN (22,7%) y menos en PI (5,2%), aunque si comparamos los tres grupos esta diferencia no fue significativa ( $p=0,174$ ).

La ganancia en *EGFR* se observó en 28,5% de PI-CEN, 19,3% de CEN y 5,2% de PI, sin alcanzar tampoco diferencia significativa ( $p=0,521$ ).

En todas estas relaciones debe tenerse en cuenta el limitado número de muestras con alteraciones MLPA que se comparan.

Tabla 17. Resultados de MLPA para **TP53**, **CDKN2A** y **EGFR**.

	PI			PI-CEN		CEN	
	PI <sub>n</sub> (n=6) (%)	PI <sub>r</sub> (n=13) (%)	Total (n=19) (%)	PI-CENs (n=3) (%)	PI-CENm (n=4) (%)	Total (n=7) (%)	CEN (n=31) (%)
Pérdida <i>TP53</i>	-	-	-	1 <sup>1</sup> (50)	-	1 <sup>2</sup> (16,6)	1 <sup>3</sup> (4,5)
Ganancia <i>TP53</i>	-	-	-	-	-	-	-
Pérdida <i>CDKN2A</i>	1 (16,6)	-	1 (5,2)	-	2 (50)	2 <sup>2</sup> (33,3)	5 <sup>3</sup> (22,7)
Ganancia <i>CDKN2A</i>	-	-	-	-	-	-	-
Pérdida <i>EGFR</i>	-	-	-	-	-	-	-
Ganancia <i>EGFR</i>	1 (16,6)	1 (7,6)	2 (10,5)	2 (66,6)	-	2 (28,5)	6 (19,3)

<sup>1</sup>n=2, <sup>2</sup>n=6, <sup>3</sup>n=22.

**Relación entre ganancias/pérdidas de TP53, CDKN2A y EGFR con la expresión proteica**

Si comparamos los datos de *TP53*, *CDKN2A* y *EGFR* con las proteínas que expresan dichos genes (p53, p16 y EGFR) observamos que la pérdida *TP53* fue similar en muestras p53 positivas (3,2%) respecto a p53 negativas (6,2%) (p=0,626).

La pérdida *CDKN2A* fue más frecuente en muestras p16 negativas (22,2%) que en p16 positivas (10%), aunque sin alcanzar un valor significativo (p=0,270).

No se observó relación entre la ganancia *EGFR* con la expresión EGFR (p=0,814) ni pEGFR (p=0,415).

### 5.3.2. Análisis de mutaciones en *EGFR* y *KRAS*

Se analizó la mutación *KRAS* en 76 muestras (12 PIn, 13 PIr, 7 PI-CENs, 4 PI-CENm y 40 CEN). La mutación *EGFR* se analizó solo en 42 muestras (9 PIn, 8 PIr, 4 PI-CENs, 7 PI-CENm y 14 CEN), debido al agotamiento del ADN en el resto de las muestras.

#### *Mutaciones EGFR en PI*

En las 17 muestras de PI analizadas se observó mutación de *EGFR* en 7 (41,2%), 4 (44,4%) en PIn y 3 (37,5%) en PIr, sin diferencia significativa entre ambos subgrupos ( $p=0,772$ ).

No se vio relación entre la presencia o ausencia de mutación *EGFR* y las variables clínico-patológicas estudiadas ni con el tiempo libre de enfermedad ( $p=0,973$ ).

No se observó relación de la mutación *EGFR* con la expresión de p53, p16, pEGFR y EGFR.

La mutación *EGFR* fue más frecuente en las muestras VPH + de alto riesgo (100%) respecto a las VPH - (33,3%), aunque la diferencia no fue significativa ( $p=0,078$ ).

No se observó relación entre la mutación de *EGFR* y las ganancias/pérdidas génicas, ya que ninguna muestra mutada presentó alteraciones en MLPA.

#### *Mutaciones de EGFR en PI-CEN*

De las 11 muestras de PI-CEN (7 PI-CENs y 4 PI-CENm) se observó mutación *EGFR* en 6 (54,5%): 4 PI-CENs (57,1%) y 2 PI-CENm (50%), sin diferencia significativa entre ambos subgrupos ( $p=0,819$ ).

No se observó relación significativa entre la presencia de mutación *EGFR* y las variables clínico-patológicas estudiadas. Los pacientes con recidiva presentaron mutación *EGFR* en el 60%, sin poder demostrarla en los que no la tuvieron, aunque la diferencia no fue significativa ( $p=0,251$ ). La supervivencia libre de enfermedad, global y específica fueron mayores en los pacientes sin mutación *EGFR*, sin alcanzar tampoco valores significativos ( $p=0,235$ ,  $p=0,109$  y  $p=0,109$  respectivamente).

La mutación *EGFR* se observó con más frecuencia en las muestras con expresión pEGFR negativa- (83,3%) ( $p=0,036$ ). No se vio relación entre la mutación *EGFR* y la expresión de EGFR, p16, p53, infección VPH, ni con las ganancias/pérdidas génicas.



### *Mutaciones de EGFR en CEN*

En las 14 muestras de CEN analizadas se observó mutación *EGFR* en un caso (7,1%).

No se vio relación con ninguna de las variables clínico-patológicas estudiadas, ni con la supervivencia libre de enfermedad ( $p=0,376$ ), global ( $p=0,725$ ) y específica ( $p=0,820$ ). Tampoco con la expresión de p16, p53, *EGFR*, p*EGFR*, infección VPH, ni con las ganancias/pérdidas génicas.

### *Comparación de mutaciones de EGFR entre los grupos de pacientes*

Si comparamos los tres grupos de pacientes (PI, PI-CEN y CEN), observamos una diferencia significativa en cuanto a la presencia de mutación *EGFR*, siendo más frecuente en PI-CEN (54,5%) seguido de PI (41,2%) y CEN (7,1%) ( $p=0,030$ ).

Si comparamos PI-CEN con CEN, la diferencia aumenta ( $p=0,009$ ), mientras que si lo hacemos entre PI y PI-CEN, la diferencia pierde significación ( $p=0,488$ ).

En la tabla 18 se resumen los resultados obtenidos para la mutación *EGFR* en todos los grupos.

Tabla 18. Mutaciones de *EGFR* en todos los grupos.

	PI			PI-CEN			CEN
	PI	PIr	Total	PI-CENs	PI-CENm	Total	CEN
	(n9) (%)	(n8) (%)	(n17) (%)	(n7) (%)	(n4) (%)	(n11) (%)	(n14) (%)
Mutación <i>EGFR</i>	4 (44,4)	3 (37,5)	7 (41,2)	4 (57,1)	2 (50)	6 (54,5)	1 (7,1)

### *Relación entre la mutación de EGFR y la expresión proteica en todos los grupos*

Se observó relación entre la presencia de mutación *EGFR* y la expresión negativa de p*EGFR* ( $p=0,047$ ). No se vio relación con la expresión de *EGFR* ( $p=0,418$ ), p53 ( $p=0,813$ ) y p16 ( $p=0,190$ ).

### *Relación entre la mutación de EGFR y la infección por VPH en todos los grupos*

Se vio relación entre la mutación *EGFR* y VPH+ ( $p=0,007$ ). Si separamos por subtipos VPH, se relaciona con la infección VPH de alto riesgo ( $p=0,004$ ), pero no con los VPH de bajo riesgo ( $p=0,651$ ).

#### *Relación entre la mutación de EGFR y el número de copias EGFR*

No se vio relación entre la mutación *EGFR* y la ganancia de número de copias de *EGFR* ( $p=0,105$ ).

#### *Mutaciones de KRAS*

No se encontraron mutaciones *KRAS* en ninguna de las 76 muestras analizadas.

## 5.4. Infección por Virus del Papiloma Humano

Se estudió la infección por VPH en 93 de las 115 muestras: 36 PI (20 PI<sub>n</sub> y 16 PI<sub>r</sub>), 11 PI-CEN (7 PI-CENs y 4 PI-CENm) y 46 CEN. VPH fue positivo (+) en 7 (7,5%) de las 93 muestras, con subtipos de alto riesgo en 4 (4,3%), y de bajo en las 3 (3,2%) restantes.

### 5.4.1. VPH en PI

Se demostró VPH en 2 (5,5%) de las 36 muestras, siendo ambas VPH 16 y pertenecientes al grupo PI<sub>n</sub>, aunque sin obtener diferencia significativa con PI<sub>r</sub> ( $p=0,193$ ).

No se vio relación entre VPH 16 + con las variables clínico-patológicas ni con el estadio de Krouse. Se vio tendencia a mayor tiempo libre de enfermedad en los pacientes sin infección por VPH, aunque no resultó significativo ( $p=0,340$ ).

### 5.4.2. VPH en PI-CEN

Se demostró infección VPH en 5 (45,5%) de las 11 muestras, siendo 2 (18,2%) por VPH 16 y las 3 (27,3%) restantes por VPH 42, VPH 56 y VPH 61. No se vio diferencia significativa en la expresión de VPH + entre PI-CENs (43%) y PI-CENm (50%) ( $p=0,819$ ). En PI-CENs los subtipos hallados fueron VPH 16, 42 y 61, mientras que en PI-CEN se encontraron VPH 16 y 56 (Tabla 19).

No se observó relación entre la expresión de VPH y las variables clínico-patológicas, aunque todas las muestras VPH + correspondían a categorías T ( $p=0,154$ ) y estadios TNM ( $p=0,154$ ) avanzados. Ningún caso VPH + presentó metástasis ganglionares (N+) ( $p=0,064$ ).

En PI-CEN con VPH + se observó menor supervivencia libre de enfermedad, pero sin alcanzar diferencia significativa ( $p=0,071$ ). Esta diferencia se hacía significativa al considerar sólo los

subtipos de bajo riesgo ( $p=0,007$ ) (Figura 29), y perdía la significación con el de alto riesgo (VPH 16) ( $p=0,835$ ). Se vio relación entre VPH + y peor supervivencia global y específica ( $p=0,048$ ) (Figura 30), perdiendo significación de ambas si separamos los subtipos de alto ( $p=0,148$ ) y bajo ( $p=0,247$ ) riesgo oncogénico.

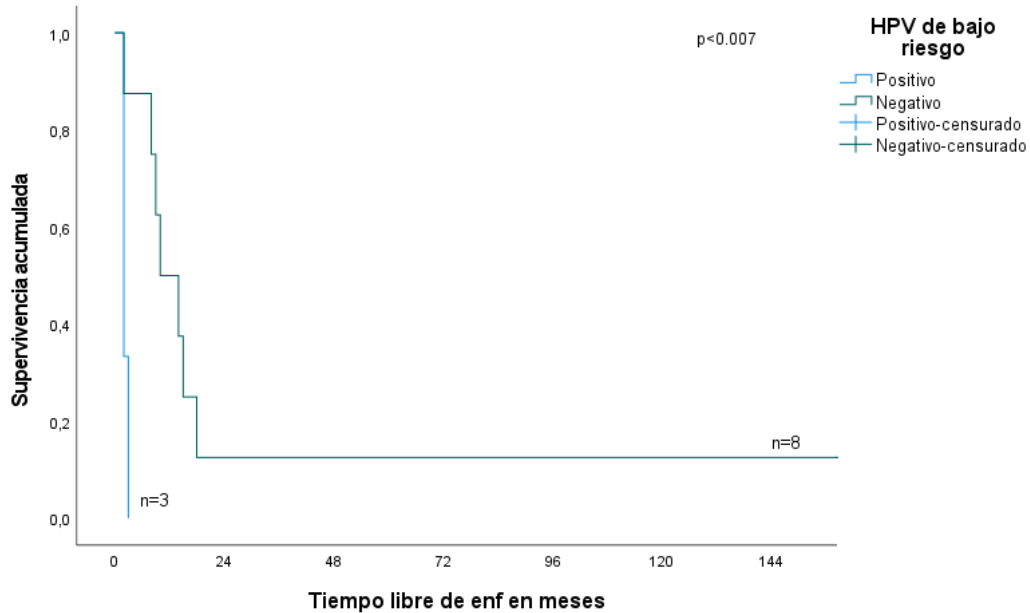


Figura 29. Supervivencia libre de enfermedad en los pacientes con PI-CEN según la infección por VPH de bajo riesgo oncogénico ( $p=0,007$ ).

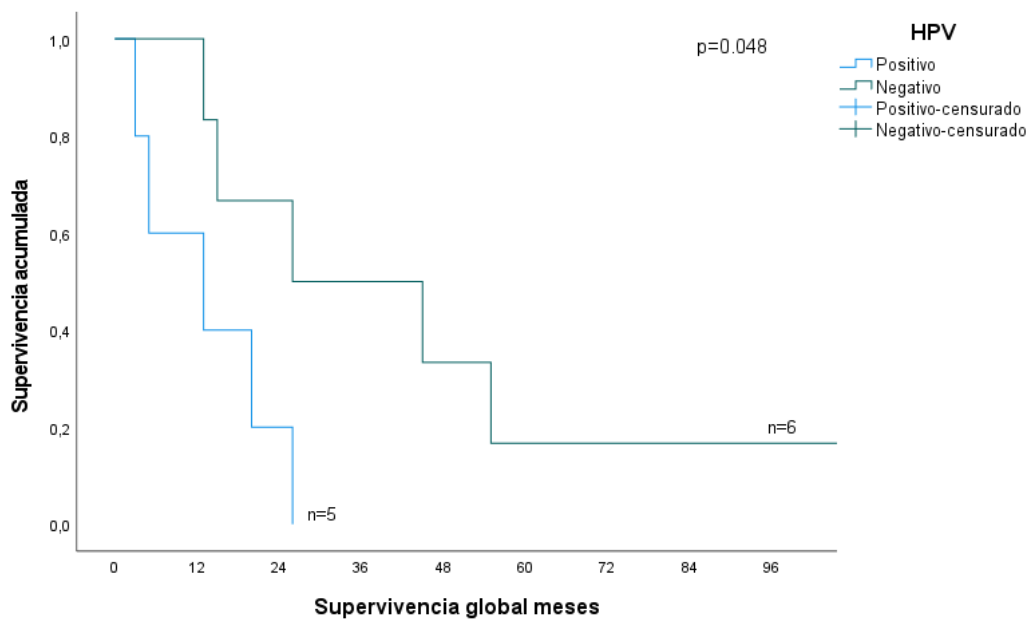


Figura 30. Supervivencia global y específica para enfermedad en pacientes con PI-CEN según la infección por VPH ( $p=0,048$ ).

### 5.4.3. VPH en CEN

Ninguna de las 46 muestras de CEN resultó positiva para VPH.

### 5.4.4. Comparación de infección por VPH entre los grupos

En la tabla 19 se resumen los datos obtenidos en las 93 muestras con el estudio de infección por VPH en los grupos de pacientes.

Tabla 19. Resumen de infección por VPH en todas las muestras

	PI		Total	PI-CEN		Total	CEN
	PI (n20) (%)	PIr (n16) (%)		PI-CENs (n7) (%)	PI-CENm (n4) (%)		
VPH 16	2 (10)	-	2 (5,5)	1 (14,3)	1 (25)	2 (18,2)	-
VPH 42	-	-	-	1 (14,3)	-	1 (9,1)	-
VPH 56	-	-	-	-	1 (25)	1 (9,1)	-
VPH 61	-	-	-	1 (14,3)	-	1 (9,1)	-

La infección por VPH fue 5,5% en PI, 45,5% en PI-CEN y 0% en CEN, alcanzando diferencia significativa ( $p < 0,00$ ). Entre PI y PI-CEN la diferencia fue significativa ( $p = 0,001$ ), manteniéndose en los VPH de bajo riesgo ( $p = 0,001$ ), pero se pierde en el de alto riesgo ( $p = 0,189$ ).

Si comparamos PI-CEN y CEN, la diferencia fue también significativa ( $p < 0,001$ ), tanto en el serotipo de alto riesgo ( $p = 0,003$ ) como en el de bajo riesgo ( $p < 0,001$ ).

### 5.4.5. Relación entre VPH y la expresión de p53, p16, pEGFR y EGFR

La mayoría de las muestras VPH + fueron p53 positivas (86%) ( $p = 0,223$ ) y p16 positivas (57%) ( $p = 0,362$ ), aunque ninguna con una expresión  $> 70\%$  (límite inferior predictivo de infección VPH), pEGFR negativas (86%) ( $p = 0,110$ ) y EGFR positivas (75%) ( $p = 0,573$ ), sin alcanzar estas tendencias valores significativos en ninguna de las proteínas estudiadas.

Si separamos la infección por VPH de alto y bajo riesgo oncogénico, las muestras VPH de alto riesgo fueron p53 positivas (100%) ( $p = 0,129$ ), p16 positivas (50%) (todas  $< 70\%$  de expresión) ( $p = 0,704$ ), pEGFR negativas (100%) ( $p = 0,076$ ) y EGFR positivas (100%) ( $p = 0,164$ ). Las muestras con VPH de bajo riesgo fueron p53 positivas (66%) ( $p = 0,937$ ), p16 positivas (66%, todas  $< 70\%$

de expresión) ( $p=0,355$ ), pEGFR negativas (66%) ( $p=0,731$ ), y a diferencia de las de alto riesgo, EGFR negativas (100%) ( $p=0,202$ ), aunque en esta última relación sólo se analizó una muestra.

Resumiendo, se observa que la infección VPH tiene un perfil de sobreexpresión para p53, p16 (<70%) y EGFR, mostrando negatividad para pEGFR, aunque sin alcanzar significación estadística, posiblemente por el escaso porcentaje de infección VPH en las muestras estudiadas.



## 6. DISCUSIÓN





## 6.1. Justificación

PI es el tumor benigno nasosinusal más frecuente, aunque puede presentar un comportamiento agresivo, con alta tasa de recidivas y posibilidad de transformación maligna. Algunos autores han sugerido que PI es la lesión preinvasiva de CEN, ratificando este dato al observar los dos procesos en el mismo paciente, incluso de manera simultánea en la muestra de tejido tumoral (Figura 7A). A pesar de las evidencias clínicas y patológicas que indican esa progresión, se desconocen las etapas del proceso de transformación maligna en los PI, ¿cuáles son los factores predisponentes?, ¿qué lesiones tienen más riesgo de recidivar y/o transformarse?...Todas estas cuestiones han sido en esencia los motivos que me han impulsado a desarrollar esta investigación.

Utilizamos una muestra heterogénea de pacientes, integrada por tres grupos que podrían representar las secuencias del proceso de transformación/progresión sobre los que hicimos diferentes valoraciones clínico-histopatológicas, génicas y de expresión, estimando especialmente la significación etiológica de VPH.

Se van a discutir los resultados obtenidos siguiendo este esquema, contrastándolos con los datos publicados con una mayor evidencia.

## 6.2. Aspectos clínico-patológicos

En relación a la muestra estudiada hay que considerar que tanto PI como CEN son lesiones con baja incidencia, siendo necesario utilizar periodos muy largos de tiempo para recoger un número suficiente de pacientes y muestras que aporten datos de interés.

La población estudiada de 102 pacientes con lesiones nasosinuales, distribuidos en tres grupos (39 PI, 11 PI-CEN y 52 CEN), puede considerarse amplia, completa y representativa, similar en número a otras series publicadas como la de Udager *et al* (50 PI, 20 PI-CEN y 20 CEN) (86), la de Sahnane *et al* (18 PI, 19 PI-CEN y 12 CEN) (93) o la de Rooper *et al* (30 PI, 7 PI con displasia, 16 PI-CEN (14 PI-CENs y 2 PI-CENm) y 7 CEN) (124). Esta última es una excepción a las anteriores, ya que en general no se diferencia entre PI-CENs y PI-CENm.

**En el grupo PI** predominan los varones sobre las mujeres, con una ratio de 1,6:1 que es algo menor a lo publicado (2-5:1). La media de edad fue de en 62,5 años, similar a lo presentado en otras series (10,11,19).

Las características clínicas más frecuentes como el síntoma de obstrucción nasal, la localización en fosa nasal y seno maxilar, el estadio II de Krouse, así como el resto de aspectos clínico-patológicos coinciden con lo publicado por otros autores (13,17).

Las recidivas se observaron en 30% de los pacientes, algo más que lo publicado en otras series (61,125), aunque las tasas de recidiva son muy variables, entre 0-78% (42). Debe tenerse en cuenta que esto puede deberse a un sesgo en la selección de los pacientes, ya que no se realizó de forma consecutiva y se derivaron al centro pacientes con recidivas previas. La supervivencia libre de enfermedad en nuestra serie fue menor en estadios más avanzados, en concordancia con otros trabajos previos (49,65). Llama la atención que aunque sí existe una disminución del tiempo libre de enfermedad significativa al pasar del estadio II al III, no observamos esta diferencia entre los estadios I y II. Esto ya ha sido descrito por autores previos, siendo uno de los defectos señalados del sistema de estadificación de Krouse (50,65).

**En el grupo PI-CEN**, predominan las mujeres con una ratio de 1,75:1. Este dato contrasta con publicaciones previas en las que preveían los varones (8), aunque hay autores que observan mayor número de mujeres (126). La edad media era de 61 años, ligeramente inferior a la de PI. Es posible que el reducido número de pacientes de este grupo pueda condicionar la precisión de los datos obtenidos.

La obstrucción nasal fue el síntoma más frecuente al diagnóstico junto con las algias faciales, observando además numerosos síntomas indicativos de enfermedad extensa, siendo este dato coincidente con lo publicado (17). La localización más frecuente fue el seno maxilar y la mayor parte de los pacientes se diagnosticaron en estadios avanzados, con una tasa de recidiva del 91%, siendo la supervivencia a los 5 años del 9%, datos peores a los recogidos en la bibliografía (127). Hay que considerar el reducido número de pacientes de este grupo y que la mayoría se diagnosticaron con categoría T3-4 (82%) y estadio tumoral III-IV (84%), justificando el peor pronóstico. De manera muy general, si tenemos en cuenta el número total de CEN y los que tenían el antecedente previo de PI, podemos decir que 17,4% de los pacientes con CEN habían sido diagnosticados con anterioridad de PI.

**En el grupo CEN**, predominan los varones con una ratio de 2,5:1. La edad media fue 66,12 años, superior a los otros grupos, y significativamente mayor respecto al grupo PI-CEN, sugiriendo una etapa más avanzada en la progresión. Estos datos son concordantes con estudios previos (93,113). La localización más frecuente sigue siendo el seno maxilar, como también ha sido descrito en la bibliografía (1).

La mayoría de los pacientes de nuestra serie se diagnosticaron en etapas avanzadas de la enfermedad, con valores ligeramente superiores a los del grupo PI-CEN en la categoría T3-4 y estadio tumoral III-IV (90,4%), porcentajes más altos que los publicados (128). Hay que tener en cuenta que el HUCA es centro de referencia para el tratamiento de esta patología, y a él se derivan pacientes de otras áreas geográficas, especialmente en estadios avanzados. Esto también explica que el 83% de los pacientes con CEN hayan presentado recidivas, porcentaje elevado en relación a revisiones previas (129), y que la supervivencia específica a los 5 años sea de sólo 17%, peor a lo publicado (20). Se pudo constatar una relación significativa entre la categoría T y el estadio tumoral con la supervivencia, en consonancia con lo observado por otros autores (21,105).

Hemos visto una alta tasa de cirugías abiertas en los pacientes con CEN, sobre todo en los 15 primeros años del estudio, invirtiéndose esta tendencia hacia la cirugía endoscópica en la última década. Los motivos que condicionaron el abordaje quirúrgico se explican por el alto número de pacientes en estadios avanzados que requirieron cirugía agresiva y reconstructiva. Las técnicas quirúrgicas se han ido modificando, haciéndose más conservadoras, sobre todo desde la introducción de cirugía endoscópica, con similares resultados oncológicos y mejor funcionalidad y estética, como publican también otros autores (1).

### 6.3. Aspectos de expresión proteica y genéticos

En los últimos años se ha impulsado la investigación y se han publicado muchos trabajos sobre las alteraciones genéticas que caracterizan los PI y los CEN, pero los datos obtenidos hasta el momento proporcionan una información limitada y en ocasiones contradictoria. A continuación se comentan los hallazgos en cuanto a la expresión proteica con IHQ, presencia de mutaciones en los genes *EGFR* y *KRAS*, así como alteraciones en el número de copias de los genes *TP53*, *CDKN2A* y *EGFR*.

#### 6.4.1. Expresión proteica de p16 y alteraciones en *CDKN2A* en PI, PI-CEN y CEN

**En el grupo PI** encontramos una elevada expresión de **p16** (91,8%), mayor en el subgrupo PI<sub>n</sub> (100%) que en el PI<sub>r</sub> (81,8%), siendo esta diferencia significativa, habiendo además relación con la supervivencia libre de enfermedad. A la vista de este resultado p16 podría ser predictor de recidiva cuando pierde su expresión. Otros autores obtienen también una expresión alta en PI, menor de lo observado por nosotros, con valores entre 82-88% (99,130). En otros estudios no se observó esta relación, quizás por no especificar el punto de corte en el grado de extensión (131). Cohen *et al* sí comprobaron la relación entre recidivas y pérdida de expresión de p16, tomando como positivas sólo las extensiones de >70% (102).

**En el grupo PI-CEN p16** estaba sobreexpresada en 41,7% de las muestras (25% en PI-CENs y 75% en PI-CENm), siendo esta diferencia significativa cuando consideramos positiva la extensión >70%. En la bibliografía previa referente a p16 no se distingue entre PI-CENs y PI-CENm, por lo que no podemos contrastar nuestros resultados.

En nuestro estudio se observó una relación significativa e inversa entre la expresión de p16 y el estadio tumoral de los PI-CEN, a menor expresión mayor estadio y, por tanto, peor pronóstico. Así, la pérdida de expresión de p16 podría interpretarse como marcador pronóstico y de crecimiento tumoral.

La diferencia en la expresión de p16 entre PI y PI-CEN resultó también significativa, coincidiendo con otros artículos publicados donde se sugiere que la pérdida de expresión no se produce durante la formación de PI, sino en la progresión hacia displasia y transformación maligna (104,124,131,132). Esa misma pérdida de expresión de p16, con valor significativo, la hemos observado al comparar el grupo PI con muestras de PI de pacientes que posteriormente desarrollaron un PI-CENm, indicando que la pérdida de p16 podría ayudar a reconocer PI con potencial maligno. Como ya se ha comentado, no hay referencias previas que comparen estos dos tipos de muestras, por lo que no podemos contrastar nuestros datos.

**En el grupo CEN** se vio expresión de **p16** en 13,5%, porcentaje similar a lo publicado (133). Se vio relación entre la mayor expresión de p16 y el menor grado de diferenciación tumoral, sin encontrar relación con otras variables clínico-patológicas.

En nuestro estudio ha quedado bien reflejado el descenso progresivo de expresión de p16 entre los tres grupos, con una expresión máxima en PI, intermedia en PI-CEN y mínima en CEN, siendo significativas las diferencias entre los tres grupos. Otros autores han observado también que la expresión de p16 desciende de manera progresiva desde las lesiones benignas,

la aparición de displasia, hasta el tumor maligno, aunque no de manera tan evidente como nosotros (99). En un estudio donde se comparaba la expresión de p16 en PI, PI-CEN y CEN, se vio una expresión máxima en PI, descenso en PI-CEN, y aumento en CEN respecto a PI-CEN (124). En otros trabajos en CEN se vio también relación entre la pérdida de expresión de p16 y la aparición de recidivas y disminución de la supervivencia libre de enfermedad (102), aunque nosotros no observamos estas relaciones.

Recopilando todos nuestros datos y cotejándolos con los de la bibliografía podemos señalar que la pérdida de expresión de p16 estaría relacionada con peor pronóstico, tanto en lesiones benignas como malignas, actuando como predictor de recidivas en PI e indicando tumores más avanzados en PI-CEN.

Hay que destacar también la diferencia encontrada entre los PI y aquellos PI que posteriormente malignizaron hacia PI-CENm, resaltando aún más la importancia de p16 como marcador de potencial maligno y su posible utilidad en la práctica clínica.

En nuestro estudio no se analizó la presencia de mutaciones en *CDKN2A*, aunque publicaciones recientes han demostrado mutaciones inactivantes en PI-CEN del 33-42% (112,134), lo que podría explicar la pérdida de expresión proteica de p16 respecto a los PI.

**En el grupo PI-CEN** se demostró pérdida en el número de copias ***CDKN2A*** en 33,3%, mientras que se vio en el 16,6% **del grupo PI**. *CDKN2A* es el gen más mutado en tumores humanos después de *TP53*, incluido el CECC (96). En estudios previos también se vio pérdida en el número de copias de *CDKN2A* en porcentaje similar, observando en muestras pareadas de PI y PI-CEN que solo existía pérdida en el número de copias en el segundo. Las alteraciones en *CDKN2A* podrían considerarse, junto con las alteraciones en *TP53*, un evento precoz en la transformación maligna (134).

**En el grupo CEN** se vio pérdida en el número de copias *CDKN2A* en 22,7%. Nuestros datos permiten comprobar que la pérdida en el número de copias es más frecuente en tumores malignos (PI-CEN y CEN) respecto a los PI. En estudios previos se ha visto que la mayoría de los tumores malignos (72,4%) mostraban alteraciones en el número de copias de *CDKN2A*, y el 96,6% tenían alteraciones en *CDKN2A* o *TP53*, aunque no incluyeron en el estudio pacientes con diagnóstico de PI (134).

El gen *CDKN2A* es el gen más frecuentemente inactivado en algunos tumores como el melanoma, y aparece también en otros tumores sólidos. La función principal de p16, codificada por *CDKN2A* es, a través de CDK4 y CDK6, impedir la fosforilación de la proteína Rb, regulando negativamente el ciclo celular y deteniendo la proliferación celular, por lo que inhibidores de CDK4/6 se podrían utilizar para restaurar esta vía de control celular (97,135). En concreto, se utilizan Palbociclib, Ribociclib y Abemaciclib (135). Estos fármacos todavía no están estudiados ni tienen indicación en CEN ni PI-CEN, pero podrían en un futuro ser una diana terapéutica.

#### 6.4.2. Expresión proteica de p53 y alteraciones en *TP53* en PI, PI-CEN y CEN

**En el grupo PI** la proteína **p53** estaba sobreexpresada en 57% de las muestras, siendo este valor ligeramente superior en PIr (59,1%) respecto a PIc (55,5%), sin alcanzar diferencia significativa, no pudiendo relacionar su sobreexpresión con la recidiva. Este resultado está en consonancia con otras publicaciones en las que no se vio relación entre p53 y la recidiva de las lesiones (132). Hay que tener en cuenta que el estudio IHQ de p53 puede tener limitaciones ya que no existe anticuerpo específico para la isoforma mutada de la proteína, sino que reacciona con ambas (mutada y salvaje). Sin embargo, la acumulación de p53 hasta niveles detectables por IHQ suele asociarse con mutaciones del gen (99,136).

**En el grupo PI-CEN** la expresión de **p53** aumentó ligeramente (66,7%) respecto al grupo PI, sin alcanzar diferencia significativa. Otros autores sí observan diferencia entre esos dos grupos, con mayor expresión de p53 en PI-CEN que en PI, sugiriendo que p53 podría relacionarse con la progresión hacia PI-CEN, e incluso que podría ayudar a reconocer PI con riesgo de progresión (79,104). Por contra, otros autores afirman que no existe relación entre la expresión de p53 y los cambios displásicos que ocurren en la mucosa nasal (132).

**En el grupo CEN** la expresión de **p53** fue 69,2%, sin diferencia significativa con los grupos anteriores, al contrario de lo publicado por otros autores que sí la observaron, con falta de expresión en PI y aumento progresivo en PI-CEN y CEN (99,119,120). No obstante, nuestro estudio sí demostró en CEN que la sobreexpresión de p53 se relaciona con la categoría N, factor de mal pronóstico. No se ha descrito con anterioridad esta relación.

**En el grupo PI** no se encontraron alteraciones en el número de copias **TP53**.

**En el grupo PI-CEN** se observó la pérdida en el número de copias **TP53** en 16% de las muestras estudiadas.

**En el grupo CEN** se observó pérdida en el número de copias **TP53** en 4,5%. No se observaron diferencias significativas al comparar los valores obtenidos entre los grupos estudiados.

Se ha comentado ampliamente que la mutación **TP53** es la alteración génica más frecuente en tumores humanos. Otros autores han observado tasas elevadas de dicha mutación en CEN (33-100%), así como en PI-CEN, pero no en el PI asociado, sugiriendo que puede ser un evento precoz en la transformación maligna de PI a PI-CEN (134). No hemos podido obtener bibliografía que analice **TP53** con MLPA en tumores nasosinuales, por lo que no podemos contrastar nuestros datos. En nuestro estudio no se ha analizado la presencia de mutaciones en **TP53**.

#### 6.4.3. Expresión proteica de EGFR y pEGFR y alteraciones en *EGFR* en PI, PI-CEN Y CEN

**En el grupo PI** se demostró expresión de **pEGFR** en 57,1% de PI, con un porcentaje similar en PIn (59,2%) y PIr (54,5%). **EGFR** se expresó en 87,8%, sin observar tampoco diferencias entre los subgrupos PIn (96,3%) y PIr (85%), no encontrando relación con las recidivas, como observaron otros autores (137). Los datos publicados con anterioridad son muy dispares, con tasas de positividad de EGFR en PI entre 20-80% (104,114,137). No hay publicaciones respecto a pEGFR que permitan contrastar nuestros resultados.

**En el grupo PI-CEN** la proteína **pEGFR** estaba sobreexpresada en 50%, más en PI-CENs (62,5%) que en PI-CENm (25%), aunque la diferencia no fue significativa, probablemente debido al reducido número de pacientes de este grupo. **EGFR** se expresó en 66,7% de los PI-CEN, sin diferencias entre subgrupos (60% en PI-CENs y 100% en PI-CENm). La expresión de EGFR se relacionó con la supervivencia libre de enfermedad en PI-CENs, teniendo mejor pronóstico los tumores que la expresaban. No hemos encontrado en la bibliografía referencias específicas de EGFR ni de pEGFR en PI-CEN, por lo que no se pudieron contrastar nuestros datos con los de otros autores.

**En el grupo CEN**, se vio expresión de **pEGFR** en 36,5%. Esta expresión aumentaba en pacientes con recidivas respecto a los que no las tuvieron (42% vs 11,1%), aunque sin valor significativo. Se vio expresión de **EGFR** en el 40,4% de las muestras, porcentaje similar a publicaciones previas (105). Se obtuvo un valor próximo a la significación al relacionar su sobreexpresión y la presencia de metástasis ganglionares, como también fue descrito por otros autores (105). En otros trabajos se relacionó la expresión de EGFR en tumores de seno maxilar con su recidiva (138). En otra localización del CECC, como es el cáncer de orofaringe, se vio que los pacientes EGFR negativos tenían mejor supervivencia global, aunque sin encontrar relación con la expresión de pEGFR (139). Otros autores siguiendo la línea de cáncer oral relacionaron la expresión de pEGFR con peor supervivencia específica y libre de enfermedad (140). Como ya se ha comentado, no hay publicaciones que estudien la expresión de pEGFR en patología nasosinusal.

Contrastando todos los datos obtenidos en nuestro estudio con lo hasta ahora publicado se puede interpretar que la expresión de EGFR y pEGFR en CEN tiene interés pronóstico, aunque sería necesario ampliar el número de pacientes para confirmar las tendencias observadas.

No se observaron diferencias en la expresión de pEGFR entre los distintos grupos de pacientes. Por el contrario, sí observamos diferencia en la expresión de EGFR entre los tres grupos, entre PI y PI-CENs y entre PI y CEN, estando más sobreexpresado en lesiones benignas. Esto contrasta con una publicación previa donde la expresión de EGFR en PI era 80%, en PI-CENs 100% y en PI-CENm 90%, con diferencias significativas entre grupos, pero mostrando más positividad en lesiones malignizadas (114).

Los resultados obtenidos en la expresión de EGFR son por tanto contradictorios, y deben ser corroborados en posteriores investigaciones, más teniendo en cuenta que 11 muestras de nuestro estudio no fueron adecuadas.

**En el grupo PI** la **mutación EGFR** se demostró en 41%, siendo menos frecuente en pacientes con recidivas, sin relación significativa. El porcentaje de mutaciones es algo menor al recogido en estudios previos, entre 72-100% (86,93,109). Las mutaciones observadas en nuestro estudio fueron más frecuentes en pacientes con infección VPH de alto riesgo, sin alcanzar valores significativos. Esta relación contrasta con lo publicado por otros autores, que observaron relación negativa entre las mutaciones *EGFR* y la infección VPH, tanto en PI como en PI-CEN (113). Se ha descrito que la ausencia de mutación *EGFR* en PI podría ser predictor de malignización (93), pero nosotros no hemos podido contrastar esta afirmación.



**En el grupo PI-CEN** se observó **mutación EGFR** aproximadamente en la mitad de las muestras de PI-CEN, al igual que en sus subgrupos. La mutación *EGFR* ha sido estudiada en muchos tipos de tumores ya que su proteína sobreexpresada podría utilizarse como diana terapéutica (110).

Los artículos publicados hasta la fecha han demostrado tasas de mutación mayores a las observadas por nosotros. Así, se ha observado mutación *EGFR* en 88% PI y 77-80% PI-CEN, detectando mutaciones idénticas en muestras pareadas de ambos grupos, estableciendo así un posible modelo de progresión (86,125). Nuestro estudio no ha podido demostrar la concordancia en las mutaciones *EGFR* en muestras pareadas.

En esta misma línea otros autores observan una tasa de mutación en PI-CEN del 72%, sugiriendo que esta alta tasa indica un patrón molecular diferente al de otros CECC (134). Sin embargo, en otros estudios la tasa de mutación *EGFR* en PI-CEN baja al 30%, afirmando que los pacientes con PI no mutado tienen mayor probabilidad de desarrollar PI-CENm (93).

**En el grupo CEN** se observó **mutación EGFR** en 7,1% de las muestras, existiendo diferencia significativa respecto al grupo PI-CEN. Resultados similares han sido descritos con anterioridad, observando mutación *EGFR* en 83-93% de PI-CEN y en 6-30% de CEN (109,111), localizándose sobre todo en el exón 20 en PI-CEN (93,111).

El estudio de las mutaciones en *EGFR* en estos tumores ha ganado importancia en los últimos años debido al desarrollo de la medicina de precisión y personalizada, y de fármacos cuya diana son estas alteraciones.

Nosotros hemos analizado la mutación *EGFR* en el exón 20 por ser la localización más frecuente en PI-CEN y CEN (86,109). En el cáncer de pulmón no microcítico se ha comprobado que esta mutación se relacionaba con resistencia a tratamiento con inhibidores reversibles de tirosina quinasa (TKI) como Gefitinib y Erlotinib, a diferencia de los que portan mutaciones en el exón 19 (110), y los estudios previos en CEN han mostrado resultados limitados. En este sentido otros autores publicaron el efecto producido por Gefitinib y Erlotinib (TKI reversibles) y Neratinib, Afatinib y Dacomitinib (TKI no reversibles) en líneas celulares de PI-CEN, observando mejor respuesta con el segundo grupo de fármacos (109), lo que podría explicarse por la elevada prevalencia de esta mutación. Por otro lado, nuevos tratamientos como el Amivantamab y el Mobocertinib se han aprobado en el cáncer de pulmón no microcítico con mutaciones en el exón 20 de *EGFR* (141).

La presencia en nuestra investigación de la mutación *EGFR* en la mitad de los PI-CEN y en menor medida en los CEN, será una línea a investigar en el futuro con el fin de complementar el tratamiento y mejorar el pronóstico de los pacientes.

Para nosotros es llamativa la relación inversa entre la mutación *EGFR* y la expresión de pEGFR, sugiriendo que la fosforilación y activación de EGFR puede ocurrir por diferentes vías. Se ha descrito que si la mutación *EGFR* afecta al exón 19 provoca dimerización y autofosforilación de la proteína sin necesidad de ligando (142), mientras que si afecta al exón 20 produce un cambio en la conformación proteica que induce una señal de activación independiente de la dimerización y autofosforilación (143), apoyando nuestro hallazgo.

#### 6.4.4. Alteraciones en *KRAS*

No hemos observado mutación de *KRAS*. La presencia de esta mutación es considerada un predictor de mala respuesta a terapias anti-*EGFR*. En la mayoría de estudios previos tampoco se ha podido encontrar dicha mutación (109,115,116), aunque algún autor sí ha podido demostrarla en PI-CEN (134) y también se ha descrito en CEN asociado a papiloma oncocítico (117,125). La ausencia de mutación *KRAS* podría ser indicativo de buena respuesta a la terapia con fármacos anti-*EGFR*, como otros autores han señalado en los carcinomas nasosinuales, estando ausentes en CEN y siendo muy escasas en adenocarcinomas nasosinuales (115).

En otros tumores como el carcinoma colorrectal, donde la mutación en *KRAS* es más frecuente, se estudia la mutación en pacientes susceptibles de tratamiento con terapias anti-*EGFR* (115). Sin embargo, en CEN dado que se ha demostrado una baja prevalencia de estas mutaciones, no parece necesario su análisis de rutina.

## 6.4. Infección por VPH

Encontramos infección por VPH en el 7,5% de las muestras estudiadas.

**En el grupo PI** se demostró infección VPH en el 5,6%, todos los casos del subtipo VPH16 y en el subgrupo PIn, sin relación por tanto con el desarrollo de recidivas aunque con tendencia a

menor tiempo libre de enfermedad. La tasa de infección observada es muy baja, encontrando en la bibliografía datos muy dispares al respecto, entre 0-100% (91,103,124,130). Este hecho puede deberse a la variabilidad geográfica en la prevalencia del virus, así como a la diversidad de métodos de detección utilizados. En una serie publicada de PI en España y Polonia, se vio que en la cohorte española la tasa de infección por VPH era de 4,3% y 6,1% en la polaca, todos por VPH 11 (144).

No está claro en nuestro entorno que la infección VPH tenga un papel activo en la progresión de la enfermedad, como otros autores también afirman. En un estudio, aunque observaron una tasa de infección del 100% en PI, todas las células infectadas presentaban muy baja actividad transcripcional, sin poder establecer relación con progresión, recidiva y transformación maligna (87). La baja tasa de infección observada por nosotros podría indicar que VPH no tiene un papel activo como factor etiológico, como otros autores sostienen (28), aunque cabría interpretar también que su papel etiológico podría estar limitado a un reducido subgrupo de pacientes.

**En el grupo PI-CEN** se encontró VPH en el 45,5%, estando representados en este subgrupo todos los subtipos estudiados (Tabla 20), y siendo la infección por VPH de alto riesgo en el 18% de los pacientes. VPH es más frecuente en PI-CENm (50%) que en PI-CENs (43%), sin alcanzar diferencia significativa. Además, se observó que los pacientes con infección VPH no presentaban metástasis ganglionares (N-), sin alcanzar valores significativos. Sin embargo, la supervivencia libre de enfermedad fue menor en VPH+ de bajo riesgo oncogénico, y la supervivencia global también era peor en pacientes VPH+ considerando todos los subtipos. Estos datos son contradictorios, ya que aunque existe relación entre infección VPH y menor supervivencia, la presencia de metástasis ganglionares indica una tendencia contraria al ser un factor de mal pronóstico. A la vista de estos datos podemos decir que los PI-CEN con VPH+ parecen tener peor pronóstico, pero son necesarios estudios con mayor número de pacientes para confirmar esa tendencia.

Se encontró diferencia significativa en la infección VPH entre PI y PI-CEN al considerar todos los subtipos de VPH y al analizar por separado los subtipos de bajo riesgo, no observando esa diferencia en los subtipos de alto riesgo.

En los últimos años se han publicado varios metaanálisis que indican la posible asociación entre infección VPH y transformación maligna en PI. Hay que tener en cuenta, como ya se indicó en el apartado anterior, que muchos artículos no diferencian entre subtipos de bajo y

alto riesgo, y la técnica de detección de VPH varía de unos estudios a otros (16,145). Por el contrario, otros autores han demostrado una reducción en las tasas de infección por VPH en PI con displasia respecto a PI que no la presentaban (130).

**En el grupo CEN** no se encontró ningún caso con infección por VPH, siendo la diferencia con PI-CEN significativa, tanto para subtipos de bajo como de alto riesgo. Las tasas de infección VPH en CEN publicadas son variables, con valores que oscilan entre 20-45% (94,102,124), incluyendo estudios en los que se estudió VPH biológicamente activo (124). En una serie amplia que nos sirve de referencia compuesta por 770 CEN se observó VPH en 31,7% (89). El subtipo predominante es VPH 16, con una tasa de infección muy superior en CEN respecto a PI y PI-CEN (94). Este último dato está en contradicción con lo observado por nosotros, con 46% de infección en PI-CEN y ningún caso en CEN.

En nuestro estudio las muestras VPH + mostraban tendencia a presentar un patrón de expresión p53+, p16+, pEGFR- y EGFR+, pero sin relación significativa con ninguna de las proteínas estudiadas. La falta de relación es especialmente llamativa entre p16 (tinción nuclear) y VPH, relación por otro lado ampliamente aceptada en CECC como orofaringe, o en cérvix uterino (146), pero no en la localización nasosinusal, confirmando así nuestros resultados (99,103). Otros autores apuntan también en esta dirección observando una tasa de infección VPH de 5% con expresión p16 de 69% y 100%, en PI y epitelio respectivamente, concluyendo que p16 es un marcador indirecto órgano-específico de la infección por VPH, y no debería aplicarse en PI (103,130,144). No obstante, hay estudios que discrepan de esta observación y sí le atribuyen una fuerte relación (94,102,124).

Debemos tener en cuenta, como decíamos al principio de este apartado, la gran variabilidad geográfica del VPH. En una revisión en la que se estimó la prevalencia de infección VPH en distintos países europeos, se vio que España se encuentra dentro de los países con menor prevalencia (menor al 3% para subtipos de alto riesgo en España y Grecia en comparación con más de un 15% en Dinamarca, Reino Unido, Irlanda, Francia y Bélgica) (147). En estudios previos publicados en el norte de España sobre prevalencia de VPH en CECC, se vio también una tasa de infección muy inferior que en otras áreas geográficas: 3,2% en cáncer orofaríngeo, 1,6% en laríngeo e hipofaríngeo, aunque es cierto que la tasa de infección ha sufrido un incremento en las últimas décadas (100,148). En otro estudio más reciente se vio que los

tumores de orofaringe atribuibles a infección por VPH eran menos frecuentes en el sur de Europa con respecto a zonas del centro y norte, y menos aún que en Norteamérica, aunque se habían incrementado en los últimos años (149).

Por otro lado, la variabilidad en los métodos de detección hace que la disparidad en los datos observados sea aún mayor. La presencia de ADN de VPH, utilizada en la mayoría de estudios, no indica necesariamente la presencia de un virus biológicamente activo, por lo que no se puede asumir su contribución al desarrollo o progresión tumoral. En cambio, el análisis de la expresión de ARN de VPH en forma de oncogenes E6/E7 parece ser una prueba más fiable para establecer la relación entre VPH y cáncer (148). Se ha visto incluso en estudios norteamericanos que la tasa de detección de VPH de alto riesgo activo (ISH de E6/E7) en PI y PI-CEN fue del 0% en ambos grupos, a pesar de ser un área geográfica con mayor prevalencia de infección (124).



## 7. LIMITACIONES Y PERSPECTIVAS





## 7.1. Limitaciones

La muestra estudiada con tres grupos de pacientes es amplia y representa las fases del proceso básico de transformación maligna (PI, PI-CEN y CEN), modelo que ya ha sido utilizado por otros autores. No obstante, esta serie no es adecuada para obtener valores epidemiológicos de incidencia/prevalencia ya que tiene algunos sesgos. En primer lugar, es posible que buen número de PI se hayan diagnosticado y tratado en otros hospitales de nuestra comunidad, ya que se suelen confundir con otros procesos benignos frecuentes, como la poliposis nasosinusal, no teniendo constancia del PI hasta la confirmación histopatológica. Por tanto, esos pacientes no van a ser contabilizados en nuestra serie y la incidencia real probablemente sea más alta. Por otro lado, el HUCA recibe la totalidad de CEN de la comunidad, a los que se añaden otros procedentes de comunidades limítrofes, remitidos al HUCA por ser centro de referencia para tumores de base de cráneo. En el caso de los PI-CEN el dato de su incidencia es más próximo a la realidad, ya que el antecedente de PI consta en la historia, bien sea de la comunidad asturiana o venga de fuera. Hay que tener en cuenta que en la mayoría de las ocasiones, salvo que el paciente sea del área sanitaria de Oviedo, las muestras del PI previo no están clasificadas y almacenadas en el banco de tumores del HUCA, dependencia de donde proceden todas las muestras analizadas. Por ese motivo no se han podido estudiar todos los PI pareados del grupo PI-CEN.

Otro factor limitante de este trabajo es que algunas inmunotinciones no se pudieron realizar. Nos referimos particularmente al estudio de la proteína EGFR en la que se excluyeron 11 muestras debido a la imposibilidad para obtener cortes histológicos viables en los TMA de algunos pacientes. El agotamiento del material histopatológico no permitió realizar los estudios genéticos y de VPH en todas las muestras, siendo un factor limitante para conocer la presencia de mutaciones y la prevalencia real de infección por VPH.

Otra limitación en el estudio de VPH es la técnica de detección, ya que en este caso se realizó mediante PCR del ADN viral. Como se comentó en la discusión, dicha técnica no aporta información sobre la actividad VPH, por lo que tendrían más valor técnicas que analicen la expresión de ARN, como la detección de la expresión de mRNA de los genes E6/E7.

Por último, en este estudio no se analizó la presencia de mutaciones en el gen *CDKN2A* como posible causa de la reducción de expresión de p16 en PI-CEN y CEN.

## 7.2. Perspectivas

Los tumores estudiados en este trabajo son poco frecuentes y, aunque nuestro centro es referencia en el tratamiento de estas lesiones, las series resultantes son siempre pequeñas para establecer conclusiones fidedignas. Por ello, una perspectiva interesante sería la creación de una red de bancos de tumores, utilizando los mismos protocolos y técnicas diagnósticas, para ampliar el tamaño muestral, tanto en esta patología como en otras poco frecuentes.

Por otro lado, en la era de la medicina personalizada y de precisión, conocer las alteraciones genéticas y moleculares de estos tumores, y la posible implicación de otros factores como el VPH en su patogénesis, permitiría incrementar el arsenal terapéutico disponible. Hay que considerar que los CEN se suelen diagnosticar en estadios avanzados y su pronóstico es malo, con pocas posibilidades de tratamiento curativo. Además, la cirugía puede provocar secuelas importantes, tanto estéticas como funcionales. Posiblemente en un futuro las alteraciones génicas se incluyan dentro del protocolo diagnóstico, tal como ya se está haciendo en otras patologías donde los tratamientos dirigidos están más desarrollados e implantados. Se ha demostrado en este y en estudios previos la presencia de alteraciones genéticas en genes como *EGFR*, de forma más prevalente en PI-CEN que en CEN. Estas mutaciones son diana terapéutica en otros tumores sólidos, por lo que en un futuro podría estar implicado en el su tratamiento.





## 8. CONCLUSIONES



1. Los pacientes estudiados son en su mayoría varones (64%), salvo en PI-CEN con predominio de mujeres. La edad media se sitúa alrededor de 60 años en PI y PI-CEN, siendo 66 años en CEN. Los síntomas predominantes son obstrucción nasal en PI, seguido de dolor facial en PI-CEN, siendo este último el más frecuente en CEN. La localización habitual en PI es la fosa nasal mientras que en PI-CEN y CEN es el seno maxilar. En PI predomina el estadio II de Krouse (51%), mientras que en PI-CEN y CEN los estadios III y IV y las categorías T 3 y 4 (82 y 91%), con N+ en el 20% de los pacientes. Las recidivas ocurrieron en el 30% de PI y en más del 80% de PI-CEN y CEN. La supervivencia libre de enfermedad fue 74% en PI a los 5 años, mientras que descendía al 36% en PI-CEN y 8% en CEN, equiparándose la supervivencia global y específica en PI-CEN (9%) y CEN (13% y 17%). El 17% de los tumores malignos tenían el antecedente de haber tenido con anterioridad un PI.
2. La proteína p16 se expresó en 100% de PI<sub>n</sub>, 82% PI<sub>r</sub>, 72% PI-CEN<sub>m</sub>, 29% PI-CEN<sub>s</sub> y 14% CEN, relacionando su pérdida de expresión en PI con el desarrollo de recidivas y transformación maligna y en PI-CEN con el estadio tumoral más avanzado. En CEN su expresión se realacionó con menor grado de diferenciación.
3. La proteína p53 se expresó en 57% de las muestras PI, 67% PI-CEN y 69% CEN, relacionando su expresión con mayor grado de diferenciación tumoral en PI-CEN y con la presencia de metástasis ganglionares en CEN.
4. La proteína pEGFR se expresó en 57% de PI, 46% PI-CEN y 37% CEN, sin observar relación con otras variables salvo con la mutación *EGFR*.
5. La proteína EGFR se expresó en 96% de PI<sub>n</sub>, 88% PI<sub>r</sub>, 67% PI-CEN y 40% CEN, sin observar relación con otras variables.
6. La mutación *EGFR* se demostró en 41% de las muestras PI, sobre todo con VPH 16 y pacientes con recidivas, 50% PI-CEN y 7,1% CEN. La mutación *EGFR* se observó con más frecuencia en muestras con expresión pEGFR negativas. No se detectaron mutaciones de *KRAS*.
7. La pérdida del número de copias de *CDKN2A* en PI se demostró en 16,6% y la ganancia *EGFR* en 10,5%. En PI-CEN hubo pérdida de *TP53* en 16%, pérdida *CDKN2A* en 33% y ganancia *EGFR* en 28%. En CEN pérdida *TP53* en 5%, pérdida *CDKN2A* en 23% y ganancia *EGFR* en 19%. La ganancia *EGFR* era más frecuente en los pacientes N +.
8. La presencia de alteraciones genéticas susceptibles de tratamientos dirigidos, como la mutación *EGFR*, podría en el futuro abrir una nueva vía de tratamiento con el objetivo de mejorar el pronóstico y supervivencia, especialmente en el caso de los PI-CEN.

9. La infección por VPH se detectó en 7,5% de las muestras, siendo VPH+ en 5,6% de los PI (todos VPH 16), y 45,5% de PI-CEN (VPH 16 y bajo riesgo por igual). No se demostró VPH en CEN. En PI-CEN la supervivencia libre de enfermedad y la global fue menor en VPH +.







## 9. BIBLIOGRAFÍA



1. Llorente JL, López F, Suárez C, Hermsen MA. Sinonasal carcinoma: Clinical, pathological, genetic and therapeutic advances. *Nat Rev Clin Oncol*. 2014;11(8):460–72.
2. El-Naggar AK, Chan JKC, Grandis JR, Takata T, Slootweg PJ. Tumours of the nasal cavity, paranasal sinuses and skull base. In: *WHO classification of head and neck tumours*. 2017. p. 11–62.
3. Hyams VJ. Papillomas of the Nasal Cavity and paranasal sinuses. A clinicopathological study of 315 cases. *Ann Otol Rhinol Laryngol*. 1971;80(2):192–206.
4. Zhao L, Li CW, Jin P, Ng CL, Lin Z bin, Li YY, et al. Histopathological features of sinonasal inverted papillomas in Chinese patients. *Laryngoscope*. 2016;126(4):141–7.
5. Re M, Gioacchini FM, Bajraktari A, Tomasetti M, Kaleci S, Rubini C, et al. Malignant transformation of sinonasal inverted papilloma and related genetic alterations: a systematic review. *Eur Arch Otorhinolaryngol*. 2017;274(8):2991–3000.
6. Califano J, Koch W, Sidransky D, Westra WH. Inverted sinonasal papilloma: A molecular genetic appraisal of its putative status as a precursor to squamous cell carcinoma. *Am J Pathol*. 2000;156(1):333–7.
7. Ward N. A mirror of the practice of medicine and surgery in the hospitals of London: London Hospital. *The Lancet*. 1854;2:480–2.
8. Eggers G, Mühling J, Hassfeld S. Inverted papilloma of paranasal sinuses. *J Craniomaxillofac Surg*. 2007;35(1):21–9.
9. Ringertz N. Pathology of malignant tumors arising in nasal and paranasal cavities and maxilla. *Acta Otolaryngol*. 1938;27:31–42.
10. Llorente-Pendás J, Suárez V, Suárez C. Papilomas invertidos nasosinusales. *Acta Otorrinolaringol Esp*. 2007;58(1):78–83.
11. Barnes L, Eveson JW, Reichart P, Sidransky D. *Pathology and Genetics of Head and Neck Tumours. WHO Classification of Tumour*. 2005.
12. Lund VJ, Clarke PM, Swift AC, McGarry GW, Kerawala C, Carnell D. Nose and paranasal sinus tumours: United Kingdom National Multidisciplinary Guidelines. *J Laryngol Otol*. 2016;130(S2):S111–8.
13. Bonfils P, Laccourreye O, Halimi P. Tumores benignos de las cavidades nasosinusales - papiloma invertido nasosinusal. *EMC - Otorrinolaringología*. 2015;44(1):1–9.
14. Lawson W, Schlecht NF, Brandwein-Gensler M. The role of the human papillomavirus in the pathogenesis of schneiderian inverted papillomas: An analytic overview of the evidence. *Head Neck*. 2008;2(2):49–59.

15. Karligkiotis A, Lepera D, Volpi L, Turri-Zanoni M, Battaglia P, Lombardi D, et al. Survival outcomes after endoscopic resection for sinonasal squamous cell carcinoma arising on inverted papilloma. *Head Neck*. 2016;38(11):1604–14.
16. Zhao RW, Guo ZQ, Zhang RX. Human papillomavirus infection and the malignant transformation of sinonasal inverted papilloma: A meta-analysis. *J Clin Virol*. 2016;79:36–43.
17. Nicolai P, Castelnuovo P. Benign tumors of the sinonasal tract. In: Cummings Otolaryngology Head and Neck Surgery. 2014. p. 740–51.
18. Anari S, Carrie S. Sinonasal inverted papilloma: narrative review. *J Laryngol Otol*. 2010;124(7):705–15.
19. Lisan Q, Laccourreye O, Bonfils P. Sinonasal inverted papilloma: From diagnosis to treatment. *Eur Ann Otorhinolaryngol Head Neck Dis*. 2016;133(5):337–41.
20. Al-Qurayshi Z, Smith R, Walsh JE. Sinonasal squamous cell carcinoma presentation and outcome: a national perspective. *Ann Otol Rhinol Laryngol*. 2020;129(11):1049–55.
21. López F, Llorente J, García-Inclán C, Alonso-Guervós M, Cuesta-Albalad M, Fresno M, et al. Genomic profiling of sinonasal squamous cell carcinoma. *Head Neck*. 2011;33(2):145–53.
22. Mckaig RG, Baric RS, Olshan AF. Human papillomavirus and head and neck cancer: epidemiology and molecular biology. *Head Neck*. 1998;20(3):250–65.
23. Pähler Vor der Holte A, Fangk I, Glombitza S, Wilkens L, Welkoborsky H. Prognostic factors and risk factors for development and recurrence of sinonasal papillomas: potential role of different HPV subtypes. *Eur Arch Otorhinolaryngol*. 2020;277(3):767–75.
24. Díaz Molina JP, Llorente Pendas JL, Rodrigo Tapia JP, Alvarez Marcos C, Obeso Agüera S, Suárez Nieto C. Papilomas invertidos rinosinusales. Revisión de 61 casos. *Acta Otorrinolaringol Esp*. 2009;60(6):402–8.
25. Münger K, Baldwin A, Edwards KM, Hayakawa H, Nguyen CL, Owens M, et al. Mechanisms of Human Papillomavirus-Induced Oncogenesis. *J Virol*. 2004;78(21):11451–60.
26. Werness BA, Levine AJ, Howley PM. Association of Human Papillomavirus Types 16 and 18 E6 Proteins with p53. *Science*. 1990;248(4951):56–9.
27. Akerman GS, Tolleson WH, Brown KL, Zyzak LL, Mourateva E, Engin TSW, et al. Human papillomavirus type 16 E6 and E7 cooperate to increase epidermal growth factor receptor (EGFR) mRNA levels, overcoming mechanisms by which excessive EGFR signaling shortens the life span of normal human keratinocytes. *Cancer Res*. 2001;61(9):3837–43.
28. Scheel A, Lin G, McHugh J, Komarck C, Walline H, Prince M, et al. Human Papillomavirus Infection and Biomarkers in Sinonasal Inverted Papillomas: Clinical Significance and Molecular Mechanisms. *Int Forum Allergy Rhinol*. 2015;5(8):701–7.

29. Altavilla G, Staffieri A, Busatto G, Canesso A, Giacomelli L, Marioni G. Expression of p53, p16INK4A, pRb, p21WAF1/CIP1, p27KIP1, cyclin D1, Ki-67 and HPV DNA in sinonasal endophytic Schneiderian (inverted) papilloma. *Acta Otolaryngol.* 2009;129(11):1242–9.
30. Sanghvi S, Khan MN, Patel NR, Yeldandi S, Baredes S, Eloy JA. Epidemiology of Sinonasal Squamous Cell Carcinoma: A Comprehensive Analysis of 4994 Patients. *Laryngoscope.* 2014;124(1):76–83.
31. Chawla A, Shenoy J, Chokkappan K, Chung R. Current Problems in Diagnostic Radiology Imaging Features of Sinonasal Inverted Papilloma: A Pictorial Review. *Curr Probl Diagn Radiol.* 2016;45(5):347–53.
32. Dammann F, Pereira P, Laniado M, Plinkert P, Löwenheim H, Claussen C. Inverted papilloma of the nasal cavity and the paranasal sinus: using CT for primary diagnosis and follow-up. *ARJ Am J Roentgenol.* 1999;172(2):543–8.
33. Lee DK, Chung SK, Dhong H, Kim H, Bok KH. Focal Hyperostosis on CT of Sinonasal Inverted Papilloma as a Predictor of Tumor Origin. *AJNR Am J Neuroradiol.* 2007;28(4):618–21.
34. Maroldi R, Farina D, Palvarini L, Lombardi D, Tomenzoli D, Nicolai P. Magnetic resonance imaging findings of inverted papilloma: differential diagnosis with malignant sinonasal tumors. *Am J Rhinol.* 2004;18(5):305–10.
35. Jeon TY, Kim HJ, Chung SK, Dhong HJ, Kim HY, Yim YJ, et al. Sinonasal Inverted Papilloma: Value of Convoluted Cerebriform Pattern on MR Imaging. *AJNR Am J Neuroradiol.* 2008;29(8):1556–60.
36. Ramkumar S, Ranjbar S, Ning S, Lal D, Zwart CM, Wood CP, et al. MRI-based texture analysis to differentiate sinonasal squamous cell carcinoma from inverted papilloma. *Am J Neuroradiol.* 2017;38(5):1019–25.
37. Lamarre ED, Batra PS, Lorenz RR, Citardi MJ, Adelstein DJ, Srinivas SM, et al. Role of positron emission tomography in management of sinonasal neoplasms—a single institution’s experience. *Am J Otolaryngol.* 2012;33(3):289–95.
38. Hermans R, de Vuysere S, Marchal G. Squamous cell carcinoma of the sinonasal cavities. *Semin Ultrasound CT MR.* 1999;20(3):150–61.
39. Fujima N, Shimizu Y, Yoshida D, Kano S, Mizumachi T, Homma A, et al. Machine-learning-based prediction of treatment outcomes using MR imaging-derived quantitative tumor information in patients with sinonasal squamous cell carcinomas: A preliminary study. *Cancers (Basel).* 2019;11(6):800.
40. Jeon TY, Kim HJ, Choi JY, Lee IH, Kim ST, Jeon P, et al. 18F-FDG PET/CT findings of sinonasal inverted papilloma with or without coexistent malignancy: Comparison with MR imaging findings in eight patients. *Neuroradiology.* 2009;51(4):265–71.
41. Schwartz JS, Brooks SG, Stubbs V, Ghosh A, Tajudeen BA, Khalili S, et al. Temporal patterns of 18F-fluorodeoxyglucose positron emission

- tomography/computed tomography sinonasal uptake after treatment of sinonasal malignancy. *Int Forum Allergy Rhinol.* 2016;6(12):1301–7.
42. Mirza S, Bradley P, Acharya A, Stacey M, Jones N. Sinonasal inverted papillomas: Recurrence, and synchronous and metachronous malignancy. *J Laryngol Otol.* 2007;121(9):857–64.
  43. Sauter A, Matharu R, Hörmann K, Naim R. Current advances in the basic research and clinical management of sinonasal inverted papilloma (Review). *Oncol Rep.* 2007;17(3):495–504.
  44. Miyahara GI, Simonato LE, Mattar NJ, João D, Jr C, Biasoli ER. Correlation between koilocytes and human papillomavirus detection by PCR in oral and oropharynx squamous cell carcinoma biopsies. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2011;106(2):166–9.
  45. Katori H, Nozawa A, Tsukuda M. Histopathological parameters of recurrence and malignant transformation in sinonasal inverted papilloma. *Acta Otolaryngol.* 2006;126(2):214–8.
  46. Cortés Lambea L, Manzarbeitia Arambarri F. Anatomía patológica de los tumores de fosas nasales y senos paranasales. In: *Tratado de Otorrinolaringología y cirugía de cabeza y cuello.* 2008. p. 3115–24.
  47. Thompson LDR, Bishop JA. Update from the 5th Edition of the World Health Organization Classification of Head and Neck Tumors: Nasal Cavity, Paranasal Sinuses and Skull Base. *Head Neck Pathol.* 2022 Mar 1;16(1):1–18.
  48. Ackall FY, Issa K, Barak I, Teitelbaum J, Jang DW, Jung SH, et al. Survival Outcomes in Sinonasal Poorly Differentiated Squamous Cell Carcinoma. *Laryngoscope.* 2021 Apr 1;131(4):1040–8.
  49. Krouse JH. Development of a staging system for inverted papilloma. *Laryngoscope.* 2000;110(6):965–8.
  50. Cannady SB, Batra PS, Sautter NB, Roh HJ, Citardi MJ. New staging system for sinonasal inverted papilloma in the endoscopic era. *Laryngoscope.* 2007;117(7):1283–7.
  51. Kim D, Hong S, Lee CH, Jin HR, Kang JM, Lee BJ, et al. Inverted papilloma of the nasal cavity and paranasal sinuses—a Korean multicenter study. *Laryngoscope.* 2012;122(3):487–94.
  52. Llorente JL, Deleyiannis F, Rodrigo JP, Núñez F, Ablanado P, Melón S, et al. Minimal invasive treatment of the nasal inverted papilloma. *Am J Rhinol.* 2003;17(6):335–41.
  53. Goudakos JK, Blioskas S, Nikolaou A, Vlachtsis K, Karkos P, Markou KD. Endoscopic resection of sinonasal inverted papillomas: systematic review and meta-analysis. *Am J Rhinol.* 2018;23(3):167–74.
  54. Karkos P, Frympas G, Carrie S, Swift A. Endoscopic versus open surgical interventions for inverted nasal papilloma: a systematic review. *Clin Otolaryngol.* 2006;31(6):499–503.



55. Healy DY, Chhabra N, Metson R, Holbrook EH, Gray ST. Surgical risk factors for recurrence of inverted papilloma. *Laryngoscope*. 2016;126(4):796–801.
56. Gomez JA, Mendenhall WM, Pannehill SP, Stringer SP, Cassisi NJ. Radiation Therapy in inverted papillomas of the nasal cavity and paranasal sinuses. *Am J Otolaryngol*. 2000;21(3):174–8.
57. Adriaensen GFJPM, Lim KH, Georgalas C, Reinartz SM, Fokkens WJ. Challenges in the management of inverted papilloma: A review of 72 revision cases. *Laryngoscope*. 2016;126(2):322–8.
58. Sánchez-Fernández P, Riobello C, Costales M, Vivanco B, Cabal VN, García-Marín R, et al. Next-generation sequencing for identification of actionable gene mutations in intestinal-type sinonasal adenocarcinoma. *Sci Rep*. 2021 Dec 1;11(1):2247.
59. Ferrari M, Taboni S, Carobbio ALC, Emanuelli E, Maroldi R, Bossi P, et al. Sinonasal squamous cell carcinoma, a narrative reappraisal of the current evidence. *Cancers (Basel)*. 2021 Jun 1;13(11):2835.
60. Minovi A, Kollert M, Draf W, Bockmühl U. Inverted papilloma: feasibility of endonasal surgery and long-term results of 87 cases. *Rhinology*. 2006;44(3):205–10.
61. Xiao-Ting W, Peng L, Xiu-Qing W, Hai-Bo W, Wen-Hui P, Bing L, et al. Factors affecting recurrence of sinonasal inverted papilloma. *Eur Arch Otorhinolaryngol*. 2013;270(4):1349–53.
62. Busquets JM, Hwang PH. Endoscopic Resection of Sinonasal Inverted Papilloma: A Meta-analysis. *Otolaryngol Head Neck Surg*. 2006;134(3):476–82.
63. Peng P, Har-el G. Management of inverted papillomas of the nose and paranasal sinuses. *Am J Otolaryngol*. 2006;27(4):233–7.
64. Gamrot-Wrzoł M, Sowa P, Lisowska G, Ścierański W, Misiołek M. Risk factors of recurrence and malignant transformation of sinonasal inverted papilloma. *Biomed Res Int*. 2017;2017.
65. Lisan Q, Moya-Plana A, Bonfils P. Association of Krouse classification for sinonasal inverted papilloma with recurrence: A systematic review and meta-analysis. *JAMA Otolaryngol Head Neck Surg*. 2017;143(11):1104–10.
66. Jardine AH, Davies GR, Birchall MA. Recurrence and malignant degeneration of 89 cases of inverted papilloma diagnosed in a non-tertiary referral population between 1975 and 1995 : clinical predictors and p53 studies. *Clin Otolaryngol Allied Sci*. 2000;25(5):363–9.
67. Roh H jung, Mun SJ, Cho K sup, Hong S lyong. Smoking, not human papilloma virus infection, is a risk factor for recurrence of sinonasal inverted papilloma. *Am J Rhinol Allergy*. 2016;30(2):79–82.
68. Sun Q, An L, Zheng J, Zhu D. Advances in recurrence and malignant transformation of sinonasal inverted papillomas. *Oncol Lett*. 2017;13(6):4585–92.

69. Katori H, Nozawa A, Tsukuda M. Markers of malignant transformation of sinonasal inverted papilloma. *Eur J Surg Oncol*. 2005;31(8):905–11.
70. Yaun Y, Meng X, Wu X. Expression and significance of C/ERPa and CK10 in nasal inverted papilloma. *J Clin Otorhinolaryngol Head Neck Surg*. 2015;29(5):437–40.
71. Gunia S, Liebe D, Koch S. Loss of basal cell keratin 14 reflects increased risk of recurrence in surgically resected sinonasal inverted papilloma. *J Clin Pathol*. 2008;61(6):707–12.
72. Tsou YA, Huang HJ, Wang TC, Tai CJ, Chen CM, Chen CYC. Evaluation of correlation of cell cycle proteins and Ki-67 interaction in paranasal sinus inverted papilloma prognosis and squamous cell carcinoma transformation. *Biomed Res Int*. 2015;2014.
73. Zhang W, Wen S, Zhang T, Wang B, Gao W, Li L. Expression and significance of PTEN and HIF-1a proteins in sinonasal inverted papilloma. *Chin J Otorhinolaryngol Head Neck Surg*. 2014;49(5):399–403.
74. Yamashita Y, Uehara T, Hasegawa M, Deng Z, Matayoshi S, Kiyuna A, et al. Squamous cell carcinoma antigen as a diagnostic marker of nasal inverted papilloma. *Am J Rhinol Allergy*. 2016;30(2):122–7.
75. Kim JS, Kwon SH. Recurrence of sinonasal inverted papilloma following surgical approach: A meta-analysis. *Laryngoscope*. 2017;127(1):52–8.
76. Yasumatsu R, Nakashima T, Sato M, Nakano T, Kogo R, Hashimoto K, et al. Clinical management of squamous cell carcinoma associated with sinonasal inverted papilloma. *Auris Nasus Larynx*. 2017;44(1):98–103.
77. Nudell J, Chiosea S, Thompson LDR. Carcinoma Ex-Schneiderian Papilloma (Malignant Transformation): A Clinicopathologic and Immunophenotypic Study of 20 Cases Combined with a Comprehensive Review of the Literature. *Head Neck Pathol*. 2014;8(3):269–86.
78. Cheung FMF, Lau TWS, Cheung LKN, Li ASM, Chow SK, Lo AWI. Schneiderian papillomas and carcinomas : A retrospective study with special reference to p53 and p16 tumor suppressor gene expression and association with HPV. *Ear Nose Throat J*. 2010;89(10):E5–12.
79. Katori H, Nozawa A, Tsukuda M. Relationship between p21 and p53 expression, Human Papilloma Virus infection and malignant transformation in sinonasal-inverted papilloma. *Clin Oncol*. 2006;18(4):300–5.
80. Strojjan P, Ferlito A, Lund V, Kennedy D, Silver C, Rinaldo A, et al. Sinonasal inverted papilloma associated with malignancy : The role of human papillomavirus infection and its implications for radiotherapy. *Oral Oncol*. 2012;48(3):216–8.
81. Koo B, Jung B, Kim S, Liang Z, Yeong M, Rha K. Altered expression of E-cadherin and B-catenin in malignant transformation of sinonasal inverted papillomas. *Rhinology*. 2011;49(4):479–85.

82. Jung Y, Lee H, Kim M, Dhong H, Cho K, Roh H. Role of Wnt signaling pathway in progression of sinonasal inverted papilloma to squamous cell carcinoma. *Am J Rhinol Allergy*. 2015;29(3):81–6.
83. Suh JD, Palma-Díaz F, Bhuta S, Want MB. COX-2 overexpression in sinonasal inverted papilloma. *Int Forum Allergy Rhinol*. 2013;3(12):997–1000.
84. Pajor AM, Danilewicz M, Stasikowska-Kanicka O, Józefowicz-Korczyńska M. The immunoexpression of CD34, Bcl-2, and Ki-67 antigens in sinonasal inverted papillomas. *Am J Rhinol Allergy*. 2014;28(1):31–4.
85. Yu HX, Liu G. Malignant transformation of sinonasal inverted papilloma: A retrospective analysis of 32 cases. *Oncol Lett*. 2014;8(6):2637–41.
86. Udager AM, Rolland DCM, McHugh JB, Betz BL, Murga-Zamalloa C, Carey TE, et al. High-frequency targetable EGFR mutations in sinonasal squamous cell carcinomas arising from inverted sinonasal papilloma. *Cancer Res*. 2015;75(13):2600–6.
87. Stoddard DG, Keeney MG, Gao G, Smith DI, García JJ, O’Brien EK. Transcriptional activity of HPV in inverted papilloma demonstrated by in situ hybridization for E6/E7 mRNA. *Otolaryngol Head Neck Surg*. 2015 Apr 7;152(4):752–8.
88. Chowdhury N, Alvi S, Kimura K, Tawfik O, Manna P, Beahm D, et al. Outcomes of HPV-related nasal squamous cell carcinoma. *Laryngoscope*. 2017;127(7):1600–3.
89. Kılıç S, Kılıç SS, Kim ES, Baredes S, Mahmoud O, Gray ST, et al. Significance of human papillomavirus positivity in sinonasal squamous cell carcinoma. *Int Forum Allergy Rhinol*. 2017;7(10):980–9.
90. Frasson G, Cesaro S, Cazzador D, Traverso G, Emanuelli E, Borsetto D, et al. High prevalence of human papillomavirus infection in sinonasal inverted papilloma: a single-institution cohort of patients. *Int Forum Allergy Rhinol*. 2020;10(5):629–35.
91. Syrjänen K, Syrjänen S. Detection of human papillomavirus in sinonasal papillomas: Systematic review and meta-analysis. *Laryngoscope*. 2013 Jan;123(1):181–92.
92. Elgart K, Faden DL. Sinonasal Squamous Cell Carcinoma: Etiology, Pathogenesis, and the Role of Human Papilloma Virus. *Curr Otorhinolaryngol Rep*. 2020;8(2):111–9.
93. Sahnane N, Ottini G, Turri-Zanoni M, Furlan D, Battaglia P, Karligiotis A, et al. Comprehensive analysis of HPV infection, EGFR exon 20 mutations and LINE1 hypomethylation as risk factors for malignant transformation of sinonasal-inverted papilloma to squamous cell carcinoma. *Int J Cancer*. 2019;144(6):1313–20.
94. Alos L, Moyano S, Nadal A, Alobid I, Blanch JL, Ayala E, et al. Human papillomaviruses are identified in a subgroup of sinonasal squamous cell carcinomas with favorable outcome. *Cancer*. 2009;115(12):2701–9.

95. Zanoni DK, Patel SG, Shah JP. Changes in the 8th Edition of the American Joint Committee on Cancer (AJCC) Staging of Head and Neck Cancer: Rationale and Implications. *Curr Oncol Rep*. 2019 Jun 1;21(6):52.
96. Serra S, Chetty R. p16. *J Clin Pathol*. 2018 Oct;71(10):853–8.
97. Wadsworth B, Bumpous JM, Martin AW, Nowacki MR, Jenson AB, Farghaly H. Expression of p16 in Sinonasal Undifferentiated Carcinoma (SNUC) Without Associated Human Papillomavirus (HPV). *Head Neck Pathol*. 2011;5(4):349–54.
98. Bishop JA, Guo TW, Smith DF, Wang H, Ogawa T, Pai SI, et al. Human Papillomavirus-Related Carcinomas of the Sinonasal Tract. *Am J Surg Pathol*. 2013;37(2):185–92.
99. Yamashita Y, Hasegawa M, Deng Z, Maeda H, Kondo S, Kyuna A, et al. Human papillomavirus infection and immunohistochemical expression of cell cycle proteins pRb, p53, and p16INK4a in sinonasal diseases. *Infect Agent Cancer*. 2015;10(1):23.
100. Rodrigo JP, Heideman DAM, García-Pedrero JM, Fresno MF, Brakenhoff RH, Díaz Molina JP, et al. Time trends in the prevalence of HPV in oropharyngeal squamous cell carcinomas in northern Spain (1990-2009). *Int J Cancer*. 2014;134(2):487–92.
101. Mehrad M, Stelow EB, Bishop JA, Wang X, Haynes W, Oliver D, et al. Transcriptionally Active HPV and Targetable EGFR Mutations in Sinonasal Inverted Papilloma. *Am J Surg Pathol*. 2020;44(3):340–6.
102. Cohen E, Coviello C, Menaker S, Martinez-Duarte E, Gomez C, Lo K, et al. P16 and human papillomavirus in sinonasal squamous cell carcinoma. *Head Neck*. 2020;42(8):2021–9.
103. Holm A, Allard A, Eriksson I, Laurell G, Nylander K, Olofsson K. Absence of high-risk human papilloma virus in p16 positive inverted sinonasal papilloma. *Eur Ann Otorhinolaryngol Head Neck Dis*. 2020 May 1;137(3):201–6.
104. Lin GC, Scheel A, Akkina S, Chinn S, Graham M. P16, EGFR, Cyclin D1, and p53 Staining Patterns for Inverted Papilloma. *Int Forum Allergy Rhinol*. 2013;3(11):885–9.
105. López F, Llorente JL, Oviedo CM, Vivanco B, Marcos CÁ, García-Inclán C, et al. Gene amplification and protein overexpression of EGFR and ERBB2 in sinonasal squamous cell carcinoma. *Cancer*. 2012;118(7):1818–26.
106. Helin K, Beguinot L. Internalization and down-regulation of the human epidermal growth factor receptor are regulated by the carboxyl-terminal tyrosines. *J Biol Chemistry*. 1991;266(13):8363–8.
107. Bianco R, Gelardi T, Damiano V, Ciardiello F, Tortora G. Rational bases for the development of EGFR inhibitors for cancer treatment. *Int J Biochemistry Cell Biol*. 2007;39(7–8):1416–31.

108. Rogers SJ, Harrington KJ, Rhys-Evans P, O-Charoenrat P, Eccles SA. Biological significance of c-erbB family oncogenes in head and neck cancer. *Cancer Metastasis Rev.* 2005;24(1):47–69.
109. Sasaki E, Nishikawa D, Hanai N, Hasegawa Y, Yatabe Y. Sinonasal squamous cell carcinoma and EGFR mutations: a molecular footprint of a benign lesion. *Histopathology.* 2018 Dec 1;73(6):953–62.
110. Pacini L, Cabal VN, Hermsen MA, Huang PH. EGFR Exon 20 Insertion Mutations in Sinonasal Squamous Cell Carcinoma. *Cancers (Basel).* 2022 Jan 1;14(2):394.
111. Hongo T, Yamamoto H, Jiromaru R, Nozaki Y, Yasumatsu R, Hashimoto K, et al. Clinicopathologic significance of EGFR mutation and HPV infection in sinonasal squamous cell carcinoma. *Am J Surg Pathol.* 2021;45(1):108–18.
112. Uchi R, Jiromaru R, Yasumatsu R, Yamamoto H, Hongo T, Manako T, et al. Genomic Sequencing of Cancer-related Genes in Sinonasal Squamous Cell Carcinoma and Coexisting Inverted Papilloma. *Anticancer Res.* 2021;41(1):71–9.
113. Udager AM, McHugh JB, Goudsmit CM, Weigelin HC, Lim MS, Elenitoba-Johnson KSJ, et al. Human papillomavirus (HPV) and somatic EGFR mutations are essential, mutually exclusive oncogenic mechanisms for inverted sinonasal papillomas and associated sinonasal squamous cell carcinomas. *Ann Oncol.* 2018;29(2):466–71.
114. Chao JC, Fang SY. Expression of epidermal growth factor receptor in the inverted papilloma and squamous cell carcinoma of nasal cavity. *Eur Arch Otorhinolaryngol.* 2008;265(8):917–22.
115. Lopez F, Garcia Inclan C, Pérez-Escudero J, Álvarez Marcos C, Scola B, Suárez C, et al. KRAS and BRAF mutations in sinonasal cancer. *Oral Oncol.* 2012;48(8):692–7.
116. Wang H, Li H, Hu L, Zhou J, Zhai C, Wang D, et al. EGFR and KRAS mutations in Chinese patients with sinonasal inverted papilloma and oncocytic papilloma. *Histopathology.* 2019;75(2):274–81.
117. Udager AM, McHugh JB, Betz BL, Montone KT, Livolsi VA, Seethala RR, et al. Activating KRAS mutations are characteristic of oncocytic sinonasal papilloma and associated sinonasal squamous cell carcinoma. *J Pathol.* 2016;239(4):394–8.
118. Trovato M, Ruggeri R, Guzzo E, Certo R, Alibrandi A, Scifo S, et al. Expression of P53 and isoforms in benign and malignant lesions of the head and neck. *Histol Histopathol.* 2017;32(4):371–7.
119. Wang X, Lv W, Qi F, Gao Z, Yang H. Clinical effects of p53 overexpression in squamous cell carcinoma of the sinonasal tract. *Medicine (Baltimore).* 2017;96(12):1–8.
120. Oncel S, Cosgul T, Calli A, Calli C, Pinar E. Evaluation of P53, P63, P21, P27, Ki-67 in Paranasal Sinus Squamous Cell Carcinoma and Inverted Papilloma. *Indian J Otolaryngol Head Neck Surg.* 2011;63(2):172–7.

121. Brown JP, Chandra A. Science made simple: Tissue microarrays (TMAs). *BJU Int.* 2014;114(2):294–5.
122. Uprety D, Adjei AA. KRAS: From undruggable to a druggable Cancer Target. *Cancer Treat Rev.* 2020 Sep 1;89.
123. Harrison PT, Vyse S, Huang PH. Rare epidermal growth factor receptor (EGFR) mutations in non-small cell lung cancer. *Semin Cancer Biol.* 2020 Apr 1;61:167–79.
124. Rooper LM, Bishop JA, Westra WH. Transcriptionally Active High-Risk Human Papillomavirus is Not a Common Etiologic Agent in the Malignant Transformation of Inverted Schneiderian Papillomas. *Head Neck Pathol.* 2017;11(3):346–53.
125. Maisch S, Mueller SK, Traxdorf M, Weyerer V, Stoehr R, Iro H, et al. Sinonasal papillomas: A single centre experience on 137 cases with emphasis on malignant transformation and EGFR/KRAS status in “carcinoma ex papilloma.” *Ann Diagn Pathol.* 2020;46.
126. Sbrana MF, Borges RFR, Pinna F de R, Neto DB, Voegels RL. Sinonasal inverted papilloma: rate of recurrence and malignant transformation in 44 operated patients. *Braz J Otorhinolaryngol.* 2021 Jan 1;87(1):80–4.
127. Liang QZ, Li DZ, Wang XL, Huang H, Xu ZG, Wu YH. Survival Outcome of Squamous Cell Carcinoma Arising from Sinonasal Inverted Papilloma. *Chin Med J (Engl).* 2015;128(18):2457–61.
128. Nazar G, Rodrigo JP, Llorente JL, Baragaño L, Suárez C. Prognostic factors of maxillary sinus malignancies. *Am J Rhinol.* 2004;18(4):233–8.
129. Dulguerov P, Jacobsen MS, Allal AS, Lehmann W, Calcaterra T. Nasal and Paranasal Sinus Carcinoma: Are We Making Progress? A Series of 220 Patients and a Systematic Review. *Cancer.* 2001;92(12):3012–29.
130. Mohajeri S, Lai C, Purgina B, Almutairi D, Baghai T, Dimitroulakos J, et al. Human papillomavirus: An unlikely etiologic factor in sinonasal inverted papilloma. *Laryngoscope.* 2018 Nov 1;128(11):2443–7.
131. Zydroń R, Marszałek A, Bodnar M, Kosikowski P, Greczka G, Wierzbicka M. The analysis of expression of p16 protein in group of 53 patients treated for sinonasal inverted papilloma. *Braz J Otorhinolaryngol.* 2018 May 1;84(3):338–43.
132. Cengiz BP. Prognostic significance of p16, VEGF, and p53 expression patterns, Krouse stage, and smoking status in sinonasal inverted papillomas. *Indian J Pathol Microbiol.* 2022 Oct 1;65(4):750–4.
133. Quan H, Yan L, Wang S, Wang S. Clinical relevance and significance of programmed death-ligand 1 expression, tumor-infiltrating lymphocytes, and p16 status in sinonasal squamous cell carcinoma. *Cancer Manag Res.* 2019;11:4335–45.
134. Brown NA, Plouffe KR, Yilmaz O, Weindorf SC, Betz BL, Carey TE, et al. TP53 mutations and CDKN2A mutations/deletions are highly recurrent molecular

- alterations in the malignant progression of sinonasal papillomas. *Modern Pathol.* 2021 Jun 1;34(6):1133–42.
135. Kreuger IZM, Slieker RC, van Groningen T, van Doorn R. Therapeutic Strategies for Targeting CDKN2A Loss in Melanoma. Vol. 143, *J Investigative Dermatol.* Elsevier B.V.; 2023. p. 18–25.
  136. Slade N, Moll UM. Mutational analysis of p53 in human tumors: immunohistochemistry. *Methods Mol Biol.* 2003;231–43.
  137. Elliot A, Nasman A, Westman M, Hammarstedt-Nordenvall L, Stjarne P, Marklund L. Stathmin and EGFR correlates to HPV status and clinical outcome in sinonasal inverted papilloma. *Rhinology.* 2020;58(1):74–9.
  138. Miyaguchi M, Sakai S, Olofsson J, Kuwabara H, Sakamoto H. Oto-Rhino-Laryngology Prognostic significance of epidermal growth factor receptor in squamous cell carcinoma of the maxillary sinus. *Eur Arch Otorhinolaryngol.* 1993;249(8):478–81.
  139. Taberna M, Torres M, Alejo M, Mena M, Tous S, Marquez S, et al. The use of HPV16-E5, EGFR, and PEGFR as prognostic biomarkers for oropharyngeal cancer patients. *Front Oncol.* 2018;8:589.
  140. Monteiro LS, Ricardo S, Delgado ML, Garcez F, do Amaral B, Lopes C. Phosphorylated EGFR at tyrosine 1173 correlates with poor prognosis in oral squamous cell carcinomas. *Oral Dis.* 2014 Mar;20(2):178–85.
  141. Esposito A, Stucchi E, Baronchelli M, Di Mauro P, Ferrari M, Lorini L, et al. Molecular Basis and Rationale for the Use of Targeted Agents and Immunotherapy in Sinonasal Cancers. *J Clin Med.* 2022 Nov 1;11(22):6787.
  142. Vyse S, Huang PH. Targeting EGFR exon 20 insertion mutations in non-small cell lung cancer. *Signal Transduct Target Ther.* 2019 Dec 1;4:5.
  143. Cho J, Kim S, Du J, Meyerson M. Autophosphorylation of the carboxyl-terminal domain is not required for oncogenic transformation by lung-cancer derived EGFR mutants. *Int J Cancer.* 2018 Aug 1;143(3):679–85.
  144. Fulla M, Szafarowski T, Frias-Gomez J, Quiros B, Clavero O, Gomà M, et al. Human Papillomavirus and Factors Associated with Recurrence in Sinonasal Inverted Papillomas from Poland and Spain. *Head Neck Pathol.* 2020 Sep 1;14(3):758–67.
  145. Stepp WH, Farzal Z, Kimple AJ, Ebert CS, Senior BA, Zanation AM, et al. HPV in the malignant transformation of sinonasal inverted papillomas: A meta-analysis. *Int Forum Allergy Rhinol.* 2021 Oct 1;11(10):1461–71.
  146. El-Naggar AK, Westra WH. p16 expression as a surrogate marker for HPV-related oropharyngeal carcinoma: a guide for interpretative relevance and consistency. *Head Neck.* 2012;34(4):459–61.
  147. De Vuyst H, Clifford G, Li N, Franceschi S. HPV infection in Europe. *Eur J Cancer.* 2009 Oct;45(15):2632–9.

148. Rodrigo JP, Hermsen MA, Fresno MF, Brakenhoff RH, García-Velasco F, Snijders PJ, et al. Prevalence of human papillomavirus in laryngeal and hypopharyngeal squamous cell carcinomas in northern Spain. *Cancer Epidemiol.* 2015;39(1):37–41.
149. Castellsagué X, Mena M, Alemany L. Epidemiology of HPV-positive tumors in Europe and in the world. *Recent Results Cancer Res.* 2017 Oct 1;206:27–35.







# 10. ANEXOS



# EGFR mutation and HPV infection in sinonasal inverted papilloma and squamous cell carcinoma\*

Virginia N. Cabal<sup>1</sup>, Marta Menéndez<sup>2</sup>, Blanca Vivanco<sup>3</sup>, Sira Potes-Ares<sup>1</sup>, Cristina Riobello<sup>1</sup>, Laura Suárez-Fernández<sup>1</sup>, Rocío García-Marín<sup>1</sup>, Verónica Blanco-Lorenzo<sup>3</sup>, Fernando López<sup>2</sup>, César Álvarez-Marcos<sup>2</sup>, José Luis Llorente<sup>2</sup>, Mario A. Hermsen<sup>1</sup>

**Rhinology** 58: 4, 368 - 376, 2020  
<https://doi.org/10.4193/Rhin19.371>

\*Received for publication:  
 October 24, 2019

Accepted: January 23, 2020

<sup>1</sup> Dept Head and Neck Oncology, Instituto de Investigación Sanitaria del Principado de Asturias, Oviedo, Spain

<sup>2</sup> Dept Otolaryngology, Hospital Universitario Central de Asturias, Oviedo, Spain

<sup>3</sup> Dept Pathology, Hospital Universitario Central de Asturias, Oviedo, Spain

## Abstract

**Background:** To evaluate the involvement of EGFR signalling and HPV infection in a cohort of inverted sinonasal papilloma (ISP) and sinonasal squamous cell carcinoma (SNSCC) and their value for prognosis and clinical treatment.

**Methods:** We analysed 55 ISP, 14 SNSCC associated with ISP (SNSCC-isp) and 60 SNSCC not associated with ISP (SNSCC-novo) for EGFR gene mutation and copy number gain, protein expression of EGFR and phosphorylated EGFR (pEGFR), and HPV-infection and KRAS mutation. Findings were correlated to clinico-pathological and follow-up data.

**Results:** We found EGFR exon 20 mutations in 38% (7/18) ISP, in 50% (6/12) SNSCC-isp and in 5% (1/19) SNSCC-novo. EGFR was expressed in 92% of ISP, while pEGFR was observed in 54% (21/39). SNSCC-isp and SNSCC-novo demonstrated comparable expression of EGFR (57% and 33%) and of pEGFR (44% and 38%). We observed an inverse relation between EGFR exon 20 mutation and pEGFR expression. Four of 39 (10%) ISP carried HPV-16. Oncogenic HPV was detected in 3/12 (25%) SNSCC-isp and in 1/8 (13%) SNSCC-novo. KRAS mutations were not detected in any of the samples. HPV infection was inversely correlated with pEGFR expression but not with EGFR mutation. ISP with EGFR activation by mutation or by phosphorylation had longer ISP-free survival, however, neither EGFR exon 20 mutation, pEGFR expression nor HPV infection demonstrated prognostic value in SNSCC.

**Conclusions:** EGFR exon 20 mutation is frequent in ISP and SNSCC-isp, while activation of EGFR through phosphorylation also plays an important role. Our data indicate that a large proportion of SNSCC patients could benefit from therapy with modern EGFR inhibitors.

**Key words:** sinonasal squamous cell carcinoma, inverted sinonasal papilloma, EGFR mutation, HPV infection, treatment

## Introduction

Sinonasal squamous cell carcinoma (SNSCC) represents approximately 50% of all sinonasal malignancies. The incidence is less than 1 case per 100,000 inhabitants per year, occurring predominantly among men with a mean age of presentation of 50 to 60 years<sup>(1,2)</sup>. SNSCC occurs predominantly in the respiratory epithelium of the maxillary sinus and the nasal cavity and approximately 30% of cases are etiologically related to professional exposure to textile, leather, wood or aluminium<sup>(3,4)</sup>, whereas tobacco does not appear to play a key role. Histological changes

that precede the development of SNSCC include squamous metaplasia and subsequent dysplasia<sup>(5)</sup>. In addition, inverted sinonasal papilloma (ISP) has been associated with an estimated 5-15% of SNSCC<sup>(6,7)</sup>. Although distant and lymph node metastasis are exceptional, SNSCC carry a poor prognosis, with an overall 5-year survival at 30–50%<sup>(1,2,8,9)</sup> and new therapeutic options are needed.

Genetic data on these rare tumours are limited. Frequent TP53 mutation and p53 overexpression has been reported in up to 70% of SNSCC<sup>(10,11)</sup>. HPV infection has been described in 38%

of benign and 31% malignant tumours<sup>(6,7,12)</sup>. In addition, 21% of SNSCC overexpressed p16INK4A (cyclin-dependent kinase inhibitor 2A), often used as surrogate marker of HPV-positive cases. However, the finding of many non-oncogenic or low-risk HPV subtypes made a clear role in malignant transformation less likely<sup>(6,7,12,13)</sup>. Other indications for ISP as precursor to invasive SNSCC came from X chromosome inactivation analysis, although in one case where both ISP and synchronous SNSCC could be analysed, the two samples showed X inactivation of different alleles, indicating that they arose from different clones<sup>(14)</sup>. Finally in 2015, Udager et al were the first to positively demonstrate a clonal relationship between ISP and synchronous and metachronous SNSCC by detecting identical EGFR mutations<sup>(15)</sup>. Moreover, they reported a high frequency of mutations, especially affecting EGFR exon 20, in 88% of ISP and in 77% of SNSCC-isp. Two later studies confirmed the clonal EGFR mutations in pairs of ISP and SNSCC-isp, albeit in varying frequencies, from 30% up to 91% of tumours<sup>(16,17)</sup>.

It is possible that EGFR mutation and HPV infection represent two different pathways of progression from ISP to SNSCC. As the number of cases studied are still low, it remains uncertain whether EGFR mutation or HPV infection can predict the progression of ISP into SNSCC, or whether SNSCC with and without EGFR mutation or HPV infection carry a different prognosis.

Our aim was to study EGFR pathway activation and HPV infection in a series of ISP and SNSCC, and to correlate the findings to clinico-pathological characteristics and follow-up data. EGFR pathway activation was evaluated either through EGFR gene mutation, EGFR gene copy number gain, phosphorylation of EGFR protein or, alternatively, by mutation of KRAS in the pathway downstream of EGFR itself.

## Material and methods

### Samples and clinical data

Our cohort is composed of 129 patients treated between 1989 and 2017 at the department of Otolaryngology, Hospital Universitario central de Asturias (Oviedo, Spain). Tumour samples were recollected retrospectively from the biobank archives of our hospital. All patients had signed an informed consent for the collection, analysis and storage of their biological material and the study was approved by the ethical committee (approval number 66/15 for the project PI15/01629 and 07/16 for project CICPF16008HERM). All specimens were primary tumours, being 55 inverted papillomas (ISP), 14 SNSCC associated with ISP (SNSCC-isp) and 60 SNSCC without ISP association (SNSCC-novo). All SNSCC were of the keratinizing type. Treatment and follow-up data for all cases are described in Table 1. Of 55 ISP patients, 19 were female (35%) and 36 male (55%). Mean age was 60 years (range 27-81). According with the Krouse T Stage there were 18 T1 (33%), 29 T2 (53%) and 8 T3 (14%).

None presented T4 stage. Eighteen originated in the maxillary sinus (33%), 3 frontal sinus (5%), 10 ethmoid (18%) and 24 nasal cavity (44%). Mean follow-up time was 141 months (range: 5-402). Recurrent disease in the form of a new ISP was observed during follow-up in 16 (29%) cases. None of the 55 developed a SNSCC.

The SNSCC-isp group consisted of 6 metachronous and 8 synchronous cases. Nine were women (64%) and 5 men (36%). Mean age was 58 years (22-82 range). Eight tumours were located in the maxillary sinus (57%), 4 ethmoid (29%) and 2 nasal cavity (14%). Two carcinomas were T2 (13%), 4 T3 (29%), 4 T4a (29%) and 4 T4b (29%). At the time of diagnosis, 3/14 (21%) patients harboured lymph node metastasis. Mean follow-up time was 33 months (range: 3-159). During follow-up, 12/14 (86%) developed recurrent SNSCC.

Among the 60 SNSCC-novo patients, 16 were female (26%) and 44 male (74%), with a mean age of 66 years (42-92 range). Forty-seven tumours were localized in maxillary sinus (78%), 1 sphenoid sinus (2%), 10 ethmoid (17%) and 2 nasal cavity (3%). One case was tumour stage T1 (2%), 5 T2 (8%), 16 T3 (27%), 30 T4a (50%) and 8 T4b (13%), and 48 N0 (80%), 10 N1 (17%) and 2 N2 (3%). At the time of diagnosis, 10 (21%) patients harboured lymph node metastasis. Mean follow-up time was 28 months (range: 1-216). During follow-up, 48/60 (80%) developed recurrent SNSCC.

### DNA extraction

DNA was extracted from paraffin-embedded tissues with DNA QIAmp DNA Mini KIT (Qiagen GmbH, Hilden, Germany), according to the manufacturer's recommendations using an elaborate deparaffinization and lysis protocol published previously<sup>(18)</sup>. Normal blood DNA used as reference in the MLPA analysis was isolated with Roche High Pure Template Preparation Kit (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany), following the supplier's guidelines.

### EGFR and KRAS mutation analysis

Mutation in EGFR exon 20 and KRAS exon 2 (codons 12 and 13) were analysed by direct sequencing. While it is true that activating mutations may also occur in EGFR exons 18, 19 and 21, and in KRAS exon 3, the great majority occur in EGFR exon 20 and KRAS exon 2. Therefore, we decided to analyse only these regions. Amplification was carried out in a Simplicon Thermal Cycler VXA24811 in standard conditions. PCR Primers and cycling conditions are detailed in Supplementary Table 1. PCR products were purified with Exo-BAP Mix (EURx Ltd, Gdansk, Poland) in accord with the manufacturer's specifications, and analysed by Sanger sequencing using the ABI PRISM 3100 and 3730 Genetic Analyser, (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). PCR conditions were as follows: EGFR exon 20: (5min/95°C + (15" 95°C / 30" 57°C / 1min 72°C) x 35 cycles + 7min/72°C +

Table 1. Clinical and follow-up data of all tumours.

		55 ISP	14 SNSCC-isp	60 SNSCC-novo
Gender	Female	19/55(35%)	9/14 (64%)	16/60 (26%)
	Male	36/55 (65%)	5/14 (36%)	44/60 (74%)
Age at Diagnosis	Range	27-81 years	22-82 years	42-92 years
	Mean	60 years	58 years	66 years
Differentiation	Poor	n.a	6/14 (42%)	25/60 (42%)
	Moderate	n.a	4/14 (29%)	12/60 (20%)
	Well	n.a	4/14 (29%)	23/60 (38%)
T Stage	T1	n.a	0 (0%)	1/60 (2%)
	T2	n.a	2/14 (13%)	5/60 (8%)
	T3	n.a	4/14 (29%)	16/60 (27%)
	T4a	n.a	4/14 (29%)	30/60 (50%)
	T4b	n.a	4/14 (29%)	8/60 (13%)
N Stage	N0	n.a	11/14 (79%)	48/60 (80%)
	N1	n.a	3/14 (21%)	10/60 (17%)
	N2	n.a	0 (0%)	2 (3%)
Krouse ISP T Stage	T1	18/55 (33%)	n.a	n.a
	T2	29/55 (53%)	n.a	n.a
	T3	8/55 (14%)	n.a	n.a
	T4	0 (0%)	n.a	n.a
Localization	Maxillary sinus	18/55 (33%)	8/14 (57%)	47/60 (78%)
	Frontal sinus	3/55 (5%)	0 (0%)	0 (0%)
	Sphenoid sinus	0 (0%)	0 (0%)	1/60 (2%)
	Ethmoid	10/55 (18%)	4/14 (29%)	10/60 (17%)
	Nasal cavity	24/55 (44%)	2/14 (14%)	2/60 (3%)
Treatment	None	1/55 (2%)	0(0%)	0 (0%)
	Surgery	54/55 (98%)	2/14 (14%)	15/60 (25%)
	Surgery+RT	0 (0%)	11/14 (79%)	42/60 (70%)
	Surgery+CRT	0 (0%)	1/14 (7%)	1/60 (2%)
	CRT	0 (0%)	0(0%)	2/60 (3%)
Surgery	Open	6/54 (11%)	10/14 (71%)	57/58 (98%)
	Endoscopic	48/54 (89%)	4/14 (29%)	1/58 (2%)
Recurrence	ISP	16/55 (29%)	n.a	n.a
	SNSCC	n.a	12/14 (86%)	48/60 (80%)
Follow-up	Median	115 months	20 months	15 months
Status	NED	42/55 (76%)	2/14 (14%)	5/60 (8%)
	DOD	0/55 (0%)	12/14 (86%)	47/60 (79%)
	DOC	13/55 (24%)	0 (%)	8/60 (13%)

n.a.: not applicable, NED: no evidence of disease, DOD: died of disease, DOC: died of other causes.

4°C) and KRAS: (5min/95°C + (30" 95°C / 45" 60°C / 1min 72°C) x 30 cycles + 7min/72°C + 4°C).

#### Immunohistochemistry

Immunohistochemistry (IHC) was performed on an automatic staining workstation (Dako Autostainer Plus; DakoCytomation).

The antibodies used for IHC were: anti-EGFR clone 2-18C9 (DAKO, Glostrup, Denmark) and anti-pEGFR clone D7A5 (Cell Signaling Technology, Cambridge, UK). The immunostaining was evaluated by two experienced investigators (MM and BV). EGFR and pEGFR immunostaining was considered positive when moderate to strong membranous, cytoplasmic, or both staining

Table 2. Genotype of the EGFR exon 20 mutations and HPV status.

Patient	Tumour Type	Mutation	Described before	HPV infection
8	SNSCC-isp Synchronous	p.S778_D770 dup SVD / c.2303_2311 dup GTGTGGACA	ref 15,21	Negative
69	SNSCC-isp Synchronous	p.D770_N771 ins G / c.2310_2311 ins GGT	ref 15,21	Negative
77	SNSCC-isp Synchronous	p.D770_N771 ins GL / c.2310_2311 ins GGGTTA	ref 15,21	HPV 16
126	ISP	p.D770_N771 ins SVD / c.2311_2312 ins GCGTGGACA	ref 21	n.d.
33	ISP	p.D770_N771 ins SVD / c.2311_2312 ins GCGTGGACA	ref 21	n.d.
18	ISP	p.D770_N771 ins SVD / c.2311_2312 ins GCGTGGACA	ref 21	Negative
16	ISP	p.N771 delins GS / c.2310_2311 AA > GGGTC	NO	n.d.
5	ISP and SNSCC-isp Metachronous	p.N771 delins GY / c.2310_2311 A>GGGT	ref 15	Negative
4	SNSCC-isp Synchronous	p.N771 delins GY / c.2310_2311 A>GGGT	ref 15	HPV 42
22	ISP	p.N771_P772 ins V / c.2313_2314 ins GTC	ref 15	Negative
76	SNSCC-novo	p.P772_H773 dup PDN / c.2315_2323 dup GGACAACCC	NO	HPV 16
6	SNSCC-isp Metachronous	p.H773_V774 ins NPH / c.2319_2320 ins AACCCAC	ref 21	HPV 16
30	ISP	p.H773_V774 ins NPH / c.2319_2320 ins AACCCAC	ref 21	HPV 16
31	ISP	p.H773_V774 ins NPH / c.2319_2320 ins AACCCAC	ref 21	n.d.

ref: reference; n.d.: no data.

was observed in at least 10% of tumour cells; tumours with no or weak staining were regarded as negative.

#### Multiplex Ligation-dependent probe amplification (MLPA)

MLPA was performed as described in detail previously<sup>(19)</sup> using SALSA P105D-2 Glioma-2 (MRC-Holland, Amsterdam, The Netherlands) that contains 56 probes (including 10 for reference and 4 as internal control). This mix allows the detection of aberrant copy number of EGFR using 11 specific probes. Relative copy number values, including standard deviation, higher than 1.25 were considered as gains and 2.0 or higher as amplifications.

#### HPV DNA detection

The quality of the extracted DNA was checked by PCR amplification of  $\beta$ -globin (forward primer 5'-ACACAATTG-TGTGTTCACTAGC-3' and reverse primer 5'-CAAATTCATC-CACGTTACC-3'). PCR with MY11/GP6+ primers (site-directed L1 fragment of HPV) was performed in order to detect a broad spectrum of HPV genotypes<sup>(11,20)</sup>. Briefly, the PCR was performed in 25  $\mu$ l of reaction mixture containing 1x PCR buffer, 2 mmol/L MgCl<sub>2</sub>, 50  $\mu$ mol/L of each deoxynucleoside, 0.5  $\mu$ mol/L of sense and antisense primers, 10  $\mu$ l of DNA sample and 1 U Taq DNA polymerase (Promega Biotech Iberica S.L. Madrid, Spain), by thermal profile of 35 cycles: denaturation at 94°C for 30 sec, annealing at 55°C for 30 sec and extension at 72°C for 1 min, with an initial denaturation at 94°C for 5 min and a final extension at 72°C for 10 min. The amplified DNA fragments of approximately 200 bp were identified by electrophoresis in 1.5% agarose gel with ethidium bromide. All positive specimens for L1 fragment

were tested by hybridization assays using type-specific probes for HPV (Supplementary Table 1).

#### Statistical analysis

SPSS 12.0 software (SPSS Inc., Chicago, IL, USA) was used to analyse correlations existent between clinical and genetic factors using Pearson chi-square and Fisher tests. Continuous variables were analysed with Student's t test. Kaplan-Meier curves were undertaken for the evaluation of survival by application of logarithmic range test (Log-range test) considering significance for values under  $p=0.05$ .

## Results

#### Genetic alterations in EGFR, KRAS, and HPV detection

DNA was extracted from all 129 samples included in this study. Unfortunately, interpretable EGFR exon 20 sequences were only obtained in 49 cases due to the bad quality and low quantity of DNA obtained from paraffin-embedded tumour material. In total 14 samples, 7/18 (39%) ISP, 6/12 (50%) SNSCC-isp and 1/19 (5%) SNSCC-novo, carried mutations in EGFR (Supplementary Table 2). All mutations exclusively concerned in-frame insertions affecting the region S768-V774 in exon 20 (Table 2). To our knowledge, two mutations had not been described before in the literature on sinonasal tumours (Supplementary Figure 1). EGFR gene copy number gain as evaluated by MLPA was very infrequent, observed in only 1/17 (6%) ISP, 1/5 (20%) SNSCC-isp and 6/32 (19%) of SNSCC-novo (Supplementary Table 2). EGFR protein expression was observed in 34/37 (92%) ISP, 6/10 (60%) SNSCC-isp and in 24/54 (44%) SNSCC-novo, while EGFR activation by phosphorylation (pEGFR) was observed in 21/39



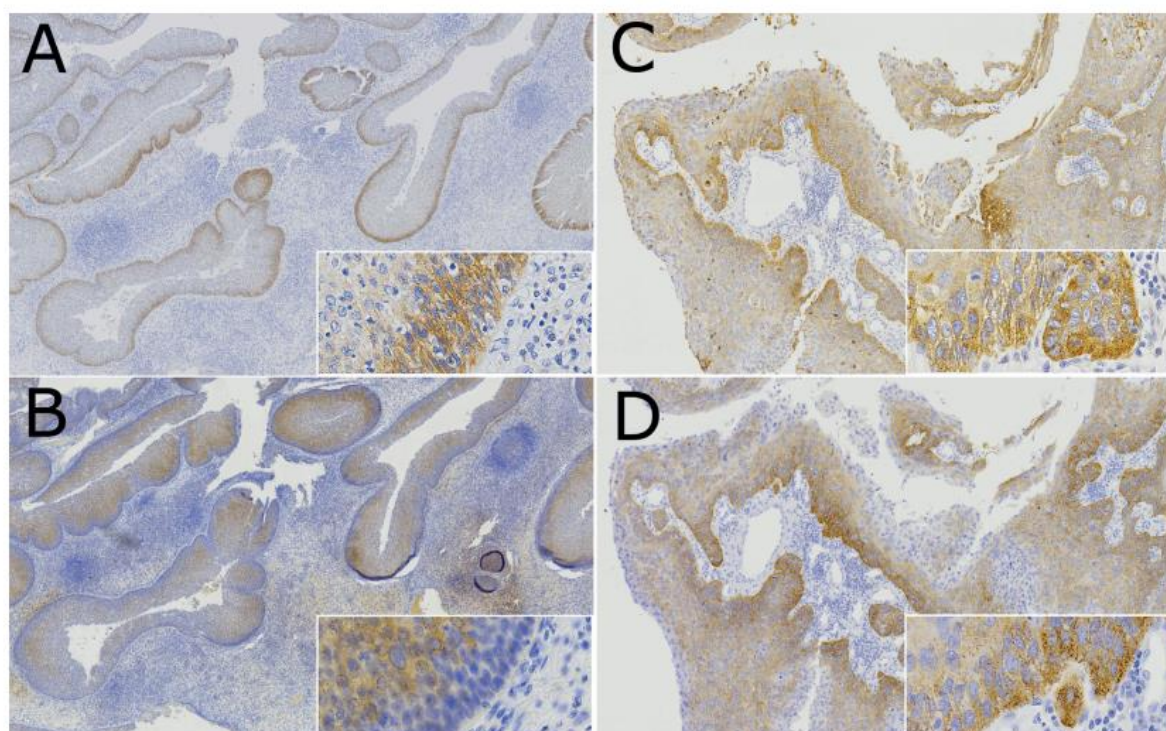


Figure 1. Photomicrographs of immunohistochemical expression of EGFR (A and C) and pEGFR (B and D) detected in the cytoplasm and the cell membrane of an ISP (A and B; original magnification 4x and insert 40x) and a SNSCC-novo (C and D; original magnification 10x and insert 40x).

(54%) ISP, 4/12 (33%) SNSCC-isp and 20/52 (38%) SNSCC-novo (Figure 1). Four of 40 (10%) ISP samples harboured HPV-16 and no low-risk HPV types were detected. Among the 13 analysed SNSCC-isp, two cases showed presence of HPV type 16, one type 18 and two low-risk types 42 and 61. In contrast, only 1/50 (2%) SNSCC-novo was found positive with HPV type 16 (Supplementary Table 2 and Figure 2). No KRAS mutations were detected in all of the analysed ISP, SNSCC-isp and SNSCC-novo samples (Supplementary Table 2).

#### Correlations between genetic alterations and clinical data

Univariate analysis of clinical and genetic characteristics of 14 SNSCC-isp and 60 SNSCC-novo showed that the former occurred more frequently in women (64% versus 26%, Fisher exact  $\chi^2$ ,  $p=0.012$ ), at a younger age of onset (58 years versus 66 years, Student's  $t$ -test,  $p=0.031$ ) and more often (though not significantly) in the ethmoid sinus than SNSCC de novo (29% versus 15%). There were no significant differences in T stage, N-stage, degree of differentiation, nor in clinical treatment or clinical course (Table 1). EGFR exon 20 mutations were found significantly more frequently in SNSCC-isp than SNSCC-novo, respectively 6/12 (50%) versus 1/19 (5%) (Fisher exact  $\chi^2$ ,  $p=0.007$ ), whereas EGFR and pEGFR expression and also EGFR copy number gains were similar in the two groups of tumours.

HPV infection (all subtypes) occurred significantly more frequent in SNSCC-isp than in SNSCC-novo, respectively 5/13 (38%) versus 1/50 (2%) (Fisher exact  $\chi^2$ ,  $p=0.001$ ). This difference was also significant considering only the oncogenic subtypes, respectively 3/13 (38%) versus 1/50 (2%) (Fisher exact  $\chi^2$ ,  $p=0.025$ ). Multivariate logistic regression analysis (Table 3) of the four variables that were significantly different in univariate analysis showed only EGFR mutation as an independent significant factor differentiating SNSCC-isp and SNSCC-novo (adjusted odds ratio 25.953,  $p=0.033$ ).

Analysing all 74 SNSCC, we found no correlation between EGFR mutation and T stage, N stage, grade of differentiation, tumour localization, age, or overall, disease-specific or disease-free survival. Also EGFR or pEGFR expression and HPV infection were not related to any of the clinical parameters or survival. Similarly among the 55 ISP, there was no relation between EGFR mutation, EGFR or pEGFR expression or HPV infection and Krouse T stage, tumour localization, age, or gender. However, Kaplan Meier analysis showed longer ISP-free survival in cases with EGFR pathway activation, either by mutation or by phosphorylation (Log rank 3.636,  $p=0.057$ ) (Figure 3A). Longer ISP-free survival was also observed in cases with HPV infection (Log rank 1.043,  $p=0.307$ ) (Figure 3B).

Finally, including all 55 ISP and all 74 SNSCC cases, we analysed

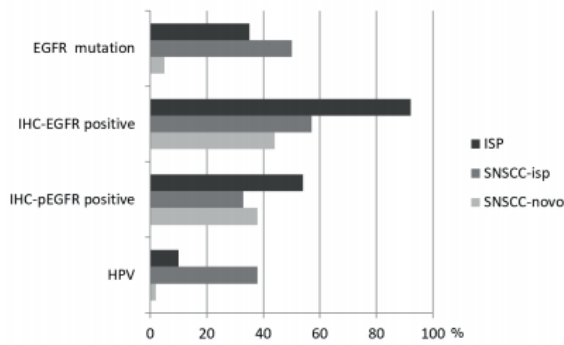


Figure 2. Graphic representation of the frequencies of EGFR mutation, EGFR and pEGFR protein expression, and HPV infection according to type of tumour sample.

possible relations between the genetic data. We observed an inverse (although not completely exclusive) relation between EGFR mutation and pEGFR expression, with 3/12 (25%) EGFR mutated cases versus 18/27 (67%) EGFR wildtype cases also expressing pEGFR (Fisher exact Chi<sup>2</sup>, p=0.035). Also the presence of oncogenic HPV occurred exclusively in cases with no pEGFR expression (0/4 (0%) HPV-positive cases versus 34/82 (67%) HPV-negative cases expressing pEGFR, Fisher exact Chi<sup>2</sup>, p=0.149). However, we found oncogenic HPV-positivity co-occurring with EGFR mutation in two ISP and also two SNSCC-isp (Table 2 and Supplementary Figure 2).

**Discussion**

In the present study we found EGFR exon 20 insertion mutations in an elevated proportion of ISP and SNSCC-isp, but not in SNSCC-novo, confirming previous studies<sup>(15-17,21)</sup>. However, in contrast to these studies, HPV infection was infrequent and did not occur mutually exclusive with EGFR mutation. In addition, we found few cases with EGFR copy number gains, however, activated pEGFR expression occurred frequent in ISP and SNSCC-isp and does appear mutually exclusive with EGFR mutation. The number of cases SNSCC-isp in this study is relatively small, however, it must be taken into account that SNSCC is a rare tumour and, within this group of tumours, those associated with inverted papillomas are even less frequent. Comparable series in the literature included 17-23 cases<sup>(15-17)</sup>. The clinical features of our cohort of ISP and SNSCC were similar, to those published in previous studies<sup>(15-17,21)</sup>. Our data confirm the earlier age of onset of SNSCC-ISP compared to SNSCC-novo (p=0.031)<sup>(16,22)</sup>. We also found a higher proportion of women in the SNSCC-isp group (64%) as opposed to the other groups, however, this was not observed in other studies. The frequency of EGFR mutations in ISP (39%) was notably less than in previous studies that reported 72-91% of mutated tumours<sup>(15-17,21)</sup>. Among the SNSCC-isp this was different; we identified 50% of tumours with mutation,

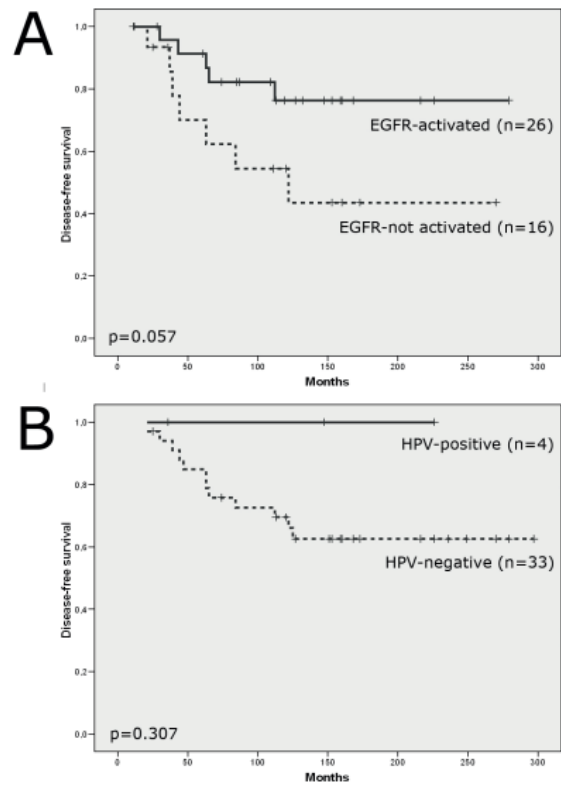


Figure 3. A) Disease-free survival of inverted sinonasal papillomas, 26 with and 16 without EGFR activation. B) Disease-free survival of inverted sinonasal papillomas, 4 with and 33 without HPV infection.

while a Japanese study found 30%<sup>(17)</sup> and American and Italian studies respectively 77% and 72%<sup>(16,22)</sup>. We have no explanation for these differences. Sasaki et al.<sup>(17)</sup> investigated possible geographic or ethnic factors, also taking into consideration frequencies of EGFR mutation in lung cancer, but concluded that there is no evidence for that.

Protein expression of EGFR and the activated form pEGFR was not studied before in ISP or SNSCC-isp. Our data showed that 92% ISP, 60% SNSCC-isp and 44% SNSCC-novo expressed EGFR. A proportion of these tumours also showed pEGFR positivity. Interestingly, the activation of EGFR by mutation and by phosphorylation appeared inversely correlated, suggesting that the EGFR pathway plays an important role both in SNSCC-isp and SNSCC-novo, although activation of the pathway may occur through different mechanisms.

Wild-type EGFR needs binding of its ligand for homo- or heterodimerization and subsequent autophosphorylation to become activated and regulate cell migration, proliferation and survival. EGFR mutations in exon 19 and L858R can cause constitutive dimerization and autophosphorylation without the need of ligand binding<sup>(23)</sup>, however, exon 20 insertion mutations lead to a pro-



Table 3. Multivariate logistic regression analysis of variables in SNSCC-isp and SNSCC-novo.

	SNSCC-isp	SNSCC-novo	Univariate		Multivariate	
			Statistical test	Significance	Adjusted odds ratio	Significance
EGFR-mutation	6/12 (50%)	1/19 (5%)	Fisher Exact Chi <sup>2</sup>	p=0.007	25.953	p=0.033
Gender (female/male)	9/5	16/44	Fisher Exact Chi <sup>2</sup>	p=0.012	12.847	p=0.057
Age (years)	58	66	Student t-test	p=0.031	1.016	p=0.641
HPV-infection	5/13 (38%)	1/50 (2%)	Fisher Exact Chi <sup>2</sup>	p=0.001	0.533	p=0.650

tein conformation change that activates signalling independent of dimerization and autophosphorylation<sup>(24)</sup>. This may explain our finding that EGFR exon 20 mutation and expression of phosphorylated EGFR occur in a mutually exclusive manner. We also found that EGFR gene copy number gain never co-occurred with EGFR mutation, while it was more frequent in cases with EGFR and pEGFR immunopositivity, suggesting that gains partly may be responsible for the elevated expression.

HPV infection has long time been considered as an important oncogenic factor in SNSCC<sup>(7,12-13)</sup>. High risk HPV subtypes have been related with SNSCC-novo, while lower risk subtypes would be more frequent in ISP or SNSCC-isp<sup>(16,22)</sup>. Moreover, the existence of HPV infection and EGFR mutation was considered almost exclusive<sup>(22)</sup>. The results from our cohort are not in agreement with these studies. We found that 100% (4 of 4) ISP and 60% (3 of 5) SNSCC-isp to be HPV-positive with subtypes 16 or 18, while 1 SNSCC-novo case harboured HPV type 16. In fact, only two samples were found with low-risk HPV (subtypes 42 and 61) and these were SNSCC-isp. In addition, we did not find that HPV infection and EGFR mutation were mutually exclusive. In four samples (two SNSCC-isp and two ISP), we detected simultaneous HPV-16 and EGFR exon 20 mutation. We believe that a role for oncogenic HPV in the tumorigenesis of SNSCC, either through premalignant ISP or in SNSCC-novo, still remains to be demonstrated.

The presence of EGFR mutation in ISP has been correlated with a lower risk of developing SNSCC<sup>(16,22)</sup>. Although our study did not include ISP samples of patients that later developed SNSCC, we did find that cases with EGFR pathway activation (by mutation or phosphorylation) carried lower risk of developing recurrent ISPs (Figure 3A). Somehow in contrast with these data, Sasaki et al.<sup>(17)</sup> observed a worse 5-year overall survival of SNSCC carrying EGFR mutation compared to EGFR wildtype (although not significant, 48% versus 65%, respectively). In addition, Takahashi et al.<sup>(25)</sup> found correlation between EGFR protein expression and worse overall and disease-free survival in 67 SNSCC. However, in a similar study on 54 SNSCC, Lopez et al found no such correlation<sup>(19)</sup>. In our present study we found neither worse overall nor worse disease-free survival for SNSCC with EGFR mutation or EGFR activation through phosphorylation. This may in part

be explained by the 5-year disease-specific survival of 23% in our series of 74 SNSCC, which is low compared to the literature reporting an average of 50%. Indeed our cohort contains a high proportion (62%) of stage T4a/T4b tumours and a recurrence rate of 81% (Table 1). This possibly reflects the fact that our hospital is a center of referral for sinonasal and skull base tumours, therefore receiving a relatively high number of complicated cases. The majority of patients were treated with open surgical approaches. Although endoscopic surgery has become common for sinonasal tumours, in most SNSCC an open approach is more appropriate, particularly when the tumour has infiltrated the hard palate, external maxillary wall, orbital fat or extraocular muscles, orbital apex, brain, or facial soft tissue. HPV-positive ISP have been reported to have a significantly higher risk of progression to SNSCC<sup>(22)</sup>. Our data only allowed to evaluate the risk of ISP to develop recurrent ISP and showed oncogenic HPV infection only in 4 cases with no recurring ISP (Figure 3B). This again demonstrates that the role of HPV in ISP, SNSCC-isp and SNSCC-novo still need further study.

Apart from a possible prognostic value of EGFR exon 20 mutations, the fact that an elevated percentage of ISP and SNSCC-isp carry these mutations opens up the possibility for therapy with specific inhibitors. All mutations found in our series, including the two novel mutations not described before in the literature on sinonasal tumours (Table 2, Supplementary figure 1), were situated exclusively in the S768-V774 region of the protein kinase region of EGFR (enclosing codons 18 to 24) promoting a more active state that triggers the pathway in a ligand- and autophosphorylation-independent manner. EGFR exon 20 insertion mutation inhibitors as neratinib, dacomitinib, afatinib specifically targeting this region have yielded only minimal responses<sup>(23)</sup>. Osimirtinib, a third generation EGFR exon 20 inhibitor has shown more promising results and has recently been approved as first-line therapy in NSCLC<sup>(26)</sup>. As new exon 20 insertion-selective inhibitors are being developed and preclinically tested, at the present moment perhaps the most promising compound being tested in an ongoing phase II clinical trial is pozotinib<sup>(27)</sup>, which may also be effective against exon 20 insertion mutations in ERBB2. To date, there are no data on the usefulness of these inhibitors in SNSCC. Using an EGFR exon 20 mutated SNSCC

tumour cell lines as model, Udager et al did show that second generation inhibitors, especially neratinib, caused strong growth inhibition, as opposed to first generation inhibitors<sup>(15)</sup>. This finding demonstrates the potential usefulness of treatment for patients with SNSCC. While KRAS and BRAF mutations could be negative response predictors for anti-EGFR therapies, fortunately our study and also previous studies have shown that neither ISP nor SNSCC-isp or SNSCC-novo carry these mutations<sup>(28,29)</sup>.

## Conclusion

In conclusion, we found EGFR exon 20 insertion mutations in 39% ISP and 50% SNSCC-isp. Protein expression of the activated form of EGFR was also observed frequently in these tumours as well as in SNSCC-novo, while HPV infection does not appear to play a critical role. As none of these tumours carry KRAS mutation, these results show that a large proportion of patients with SNSCC could be treated with EGFR antagonists, either irreversible small molecule inhibitors targeting exon 20 mutation in SNSCC-isp, monoclonal antibodies anti-EGFR in SNSCC-novo, or alternatively, with inhibitors downstream in the EGFR signalling pathway.

## Acknowledgements

The authors thank Santiago Melón for the aid with the HPV analysis, and the technicians Eva Allonca and Aitana Vallina for retrieving and processing the paraffin embedded tissue samples and part of the immunohistochemical stainings. This study was supported by grants PI15-1629 from the Fondos de Investigación Sanitaria (FIS), grant CICPF16008HERM of Fundación AECC, and grant CB16/12/00390 from the Centro de Investigación Biomédica en Red de Cáncer (CIBERONC), Spain. Plan Nacional de I+D+I 2013-2016 of the Plan Estatal cofinanced by the FEDER Funding Program from the European Union.

## Authorship contribution

VNC, MM, JLL, CAM and MAH contributed to the study conception and design. MM, FL, CAM and JLL were responsible for tissue sample and clinical data collection. Material preparation, data collection and analysis were performed by VNC, MM, BV, SPA, LSF, CR, RGM and VBL. The first draft of the manuscript was written by VNC and MAH and all authors commented on previous versions of the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

## Conflict of interest

The authors declare that they have no conflict of interest.

## References

1. Ansa B, Goodman M, Ward K et al. Paranasal sinus squamous cell carcinoma incidence and survival based on Surveillance, Epidemiology, and End Results data, 1973 to 2009. *Cancer* 2013; 119:2602-2610.
2. Turner JH, Reh DD. Incidence and survival in patients with sinonasal cancer: a historical analysis of population-based data. *Head Neck* 2012; 34:877-885.
3. Bonzini M, Battaglia P, Parassoni D et al. Prevalence of occupational hazards in patients with different types of epithelial sinonasal cancers. *Rhinology* 2013; 51:31-36.
4. Sanghvi S, Khan MN, Patel NR, Yeldandi S, Baredes S, Eloy JA. Epidemiology of sinonasal squamous cell carcinoma: A comprehensive analysis of 4994 patients. *Laryngoscope* 2014; 124:76-83.
5. El-Naggar AK, Chan J, Takata T, Grandis J, Slootweg P. WHO Classification of Tumours Pathology and Genetics of Head and Neck Tumours. Vol 4th ed. IARC Press, Lyon; 2017.
6. Alos L, Moyano S, Nadal A et al. Human papillomaviruses are identified in a subgroup of sinonasal squamous cell carcinomas with favorable outcome. *Cancer* 2009; 115:2701-2709.
7. Bishop JA, Guo TW, Smith DF et al. Human papillomavirus-related carcinomas of the sinonasal tract. *Am J Surg Pathol* 2013; 37:185-192.
8. Youlden DR, Cramb SM, Peters S et al. International comparisons of the incidence and mortality of sinonasal cancer. *Cancer Epidemiol* 2013; 37:770-779.
9. Llorente JL, López F, Suárez C, Hermesen MA. Sinonasal carcinoma: clinical, pathological, genetic and therapeutic advances. *Nat Rev Clin Oncol* 2014; 11:460-472.
10. Holmila R, Bornholdt J, Heikkilä P et al. Mutations in TP53 tumour suppressor gene in wood dust-related sinonasal cancer. *Int J Cancer* 2010; 127:578-588.
11. García-Inclán C, López-Hernández A, Alonso-Guervós M et al. Establishment and genetic characterization of six unique tumour cell lines as preclinical models for sinonasal squamous cell carcinoma. *Sci Rep* 2014; 4:4925.
12. Syrjänen K, Syrjänen S. Detection of human papillomavirus in sinonasal carcinoma: systematic review and meta-analysis. *Hum Pathol* 2013; 44:983-991.
13. Larque AB, Hakim S, Ordi J et al. High-risk human papillomavirus is transcriptionally active in a subset of sinonasal squamous cell carcinomas. *Mod Pathol* 2014; 27:343-351.
14. Califano J, Koch W, Sidransky D, Westra WH. Inverted sinonasal papilloma: a molecular genetic appraisal of its putative status as a precursor to squamous cell carcinoma. *Am J Pathol* 2000; 156:333-337.
15. Udager AM, Rolland DCM, McHugh JB, et al. High-Frequency Targetable EGFR Mutations in Sinonasal Squamous Cell Carcinomas Arising from Inverted Sinonasal Papilloma. *Cancer Res* 2015; 75:2600-2006.
16. Sahnane N, Ottini G, Turri-Zanoni M et al. Comprehensive analysis of HPV infection, EGFR exon 20 mutations and LINE1 hypomethylation as risk factors for malignant transformation of sinonasal-inverted papilloma to squamous cell carcinoma. *Int J Cancer* 2019; 144:1313-1320.
17. Sasaki E, Nishikawa D, Hanai N, Hasegawa Y, Yatabe Y. Sinonasal squamous cell carcinoma and EGFR mutations: a molecular footprint of a benign lesion. *Histopathology* 2018; 73:953-962.
18. López F, Llorente JL, García-Inclán C et al. Genomic profiling of sinonasal squamous cell carcinoma. *Head Neck* 2011; 33:145-153.
19. López F, Llorente JL, Oviedo CM et al. Gene amplification and protein overexpression of EGFR and ERBB2 in sinonasal squamous cell carcinoma. *Cancer* 2012; 118:1818-1826.
20. Álvarez-Argüelles ME, Melón S, Junquera ML et al. Human papillomavirus infection in a male population attending a sexually transmitted infection service. *PLoS One* 2013; 8:e54375.
21. Wang H, Li H, Hu L, Zhou J et al. EGFR and KRAS mutations in Chinese patients with sinonasal inverted papilloma and oncocyctic papilloma. *Histopathology* 2019; 75:274-281.

22. Udager AM, McHugh JB, Goudsmit CM et al. Human papillomavirus (HPV) and somatic EGFR mutations are essential, mutually exclusive oncogenic mechanisms for inverted sinonasal papillomas and associated sinonasal squamous cell carcinomas. *Ann Oncol* 2018; 29:466-471.
23. Vyse S, Huang PH. Targeting EGFR exon 20 insertion mutations in non-small cell lung cancer. *Signal Transduct Target Ther* 2019; 4:5.
24. Cho J, Kim S, Du J, Meyerson M. Autophosphorylation of the carboxyl-terminal domain is not required for oncogenic transformation by lung-cancer derived EGFR mutants. *Int J Cancer*. 2018; 143:679-685.
25. Takahashi Y, Bell D, Agarwal G et al. Comprehensive assessment of prognostic markers for sinonasal squamous cell carcinoma. *Head Neck* 2014; 36:1094-1102.
26. Soria JC, Ohe Y, Vansteenkiste J et al. Osimertinib in Untreated EGFR -Mutated Advanced Non-Small-Cell Lung Cancer . *N Engl J Med* 2017; 378:113-125.
27. Robichaux JP, Elamin YY, Tan Z et al. Mechanisms and clinical activity of an EGFR and HER2 exon 20-selective kinase inhibitor in non-small cell lung cancer. *Nat Med* 2018; 24:638-646.
28. López F, García Inclán C, Perez-Escuredo J et al. KRAS and BRAF mutations in sinonasal cancer. *Oral Oncol* 2012; 48:692-697.
29. Bornholdt J, Hansen J, Steiniche T et al. K-ras mutations in sinonasal cancers in relation to wood dust exposure. *BMC Cancer* 2008; 8:53

Mario A. Hermsen  
Grupo Oncología de Cabeza y Cuello  
Instituto de Investigación Sanitaria  
del Principado de Asturias (ISPA)  
Instituto Universitario de Oncología  
del Principado de Asturias (IUOPA)  
Centro de Investigación Biomédica  
en Red (CIBER-ONC)  
Edf. FINBA, N-1 F49  
C/ Avenida de Roma s/n, 33011  
Oviedo  
Spain

Tel: +34 985107937  
E-mail: mhermsen@hca.es  
ORCID nº 0000-0002-5959-6289

## SUPPLEMENTARY MATERIAL

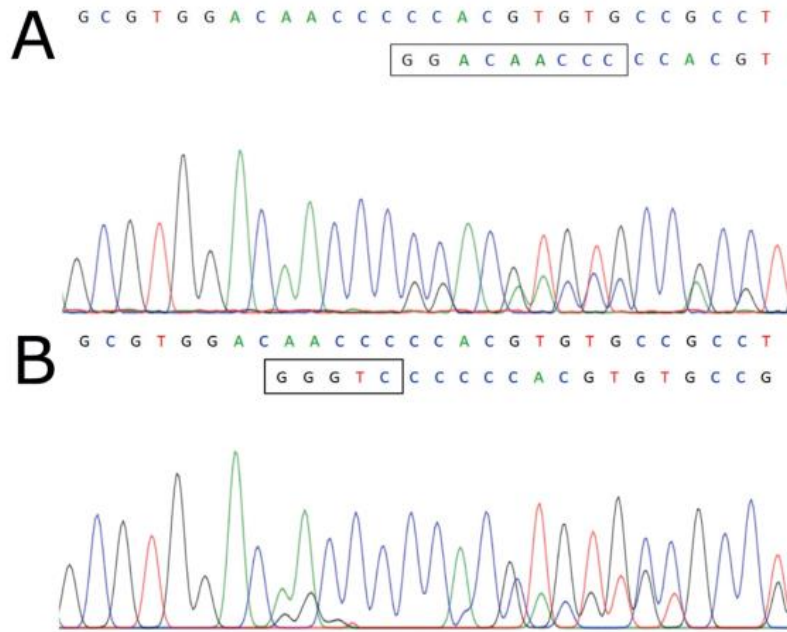
Supplementary Table 1. Primers used for PCR Sanger sequencing of EGFR and KRAS and HPV genotyping.

Primers	Sequence 5' to 3'
KRAS Exon 2 Fw	TACTGGTGGAGTATTTGATAGTG
KRAS Exon 2 Rv	CTGTATCAAAGAATGGTCCTG
EGFR Exon 20 Fw	CCCTGTGCTAGGTCTTTTG
EGFR Exon 20 Rv	GTCTTTGTGTTCCCGGACAT
HPV type-specific primers	HPV-6 (MY12: 5'CATCCGTAACATCTTCCA-3')
	HPV-11 (MY13: 5'-TCTGTGTCTAAATCTGCTACA3')
	HPV-16 (MY14: 5'-CATAACCTCCAGCACCTAA-3')
	HPV-18 (WD74: 5'GGATGCTGCACCGGCTGA-3')
	HPV-31 (WDB128: 5'TTGCAAACAGTGATACTACATT-3')
	HPV-33 (MY16: 5'CACACAAGTAAGTAGGACAG-3')
	HPV-35 (5'-CTGCTGTGCTTCTAGTGA-3')
	HPV-39 (5'ATAGAGTCTCCATACCTTC-3')
	HPV-45 (MYB69: 5'ATACTACACCTCCAGAAAAGC-3')
	HPV-51 (5'-TGCTGCGGTTCCCAA-3')
	HPV-52 (5'-GAATACCTTCGTCATGGC-3')
	HPV-56 (5'-TGCTACATATAATCAAAGC-3')
	HPV-58 (SANTI58: 5'TGAAGTAACTAAGGAAGGTACA-3')
	HPV-66 (5'-AGCTAAAAGCACATTAATAA-3')
HPV-68 (5'CTGAATCAGCTGTACCAAT-3')	

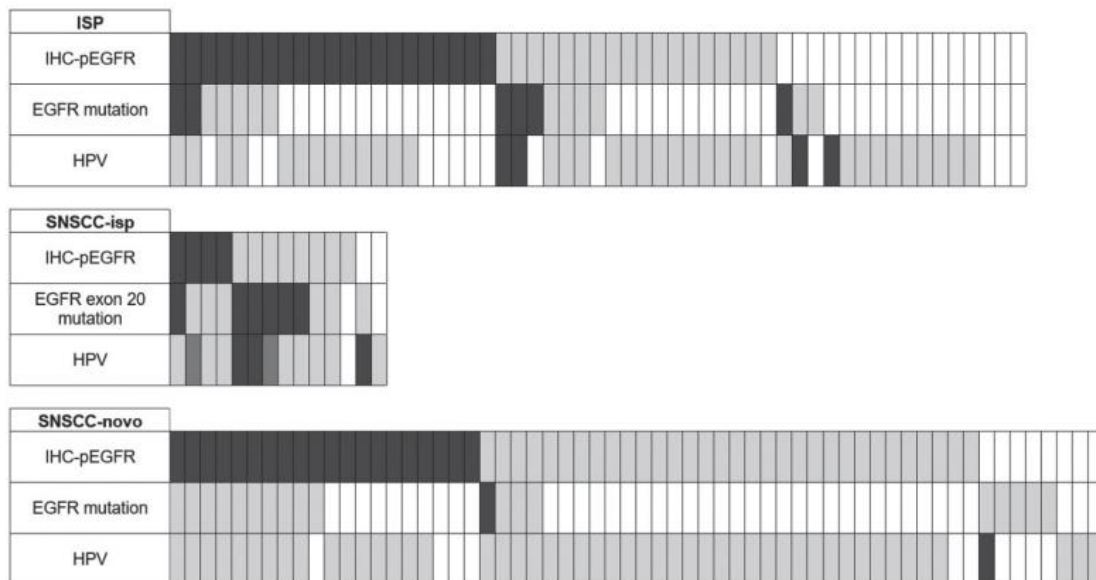
Supplementary Table 2. Frequencies of EGFR mutation, protein expression and gene copy number, and HPV infection and KRAS mutation, according to type of tumour sample.

Analysis	55 ISP	14 SNSCC-isp	60 SNSCC-novo
EGFR mutation	7/18 (39%)	6/12 (50%)	1/19 (5%)
IHC-EGFR positive	34/37 (92%)	6/10 (60%)	24/54 (44%)
IHC-pEGFR positive	21/39 (54%)	4/12 (33%)	20/52 (38%)
MLPA-EGFR gain	1/17 (6%)	1/5 (20%)	6/32 (19%)
HPV 16 positive	4/40 (10%)	2/13 (15%)	1/50 (2%)
HPV 18 positive	0/40 (0%)	1/13 (8%)	0/50 (0%)
HPV 42 positive	0/40 (0%)	1/13 (8%)	0/50 (0%)
HPV 61 positive	0/40 (0%)	1/13 (8%)	0/50 (0%)
KRAS mutation	0/28 (0%)	0/9 (0%)	0/46 (0%)





Supplementary Figure 1. Two new EGFR exon 20 mutations not described before in the literature. A) In-frame 9 bp insertion: p.P772\_H773dupPDN c.2315\_2323dupGGACAACCC detected in a SNSCC-novo; B) In-frame deletion-insertion: p.N771delinsGS c.2310\_2311 AA>GGGTC detected in an ISP.



Supplementary Figure 2. Case-by-case representation of pEGFR expression, EGFR mutation and HPV infection in 55 ISP, 14 SNSCC-isp and 60 SNSCC-novo. Dark bars indicate presence and grey bars absence of pEGFR-positivity, EGFR mutation or HPV-infection; white bars represent cases that could not be analysed. Low-risk HPV infection (two cases SNSCC-isp) are indicated by dark-grey bars. Activated pEGFR expression and EGFR mutation occur mostly mutually exclusive, however, in contrast to previous publications, EGFR mutation and oncogenic HPV do co-occur in this cohort.







# Loss of p16 expression is a risk factor for recurrence in sinonasal inverted papilloma\*

Marta Menéndez del Castro<sup>1,4</sup>, Virginia Naves Cabal<sup>2,4</sup>, Blanca Vivanco<sup>3</sup>, Laura Suárez-Fernández<sup>2</sup>, Fernando López<sup>1</sup>, José Luis Llorente<sup>1</sup>, Mario A. Hermsen<sup>2</sup>, César Álvarez-Marcos<sup>1</sup>

*Rhinology* 60: 0, 0 - 0, 2022

<https://doi.org/10.4193/Rhin22.143>

<sup>1</sup> Department of Otolaryngology, Hospital Universitario Central de Asturias, Oviedo, Spain

<sup>2</sup> Department of Head and Neck Oncology, Instituto de Investigación Sanitaria del Principado de Asturias, Oviedo, Spain

<sup>3</sup> Department of Pathology, Hospital Universitario Central de Asturias, Oviedo, Spain

\*Received for publication:

April 1, 2022

Accepted: September 13, 2022

\* contributed equally

## Abstract

**Background:** The purpose of this study was to evaluate p16, p53, EGFR, pEGFR protein expression and HPV infection as possible markers of tumor progression in a series of sinonasal inverted papilloma (SNIP) and sinonasal squamous cell carcinoma (SNSCC).

**Methods:** A series of 49 SNIP, 11 SNSCC associated with SNIP (SNIP-SNSCC) and 52 SNSCC not associated with SNIP were analyzed for p16, p53, EGFR, and phosphorylated EGFR (pEGFR) expression by immunohistochemistry. Human papillomavirus (HPV) infection status was evaluated by DNA-PCR. Results were correlated to clinical and follow-up data.

**Results:** Reduced or loss of p16 expression was observed in 18% SNIP, 64% SNIP-SNSCC and 87% of SNSCC. Reduced or loss p16 staining in SNIP correlated with shorter recurrent SNIP-free follow-up. In contrast, p16 expression was not predictive of recurrent SNSCC in cases with SNIP-SNSCC and SNSCC. P53, EGFR, and pEGFR expression did not differ between the tumor groups, nor were they related to recurrent SNIP-free follow-up or recurrent SNSCC. Oncogenic HPV types 16 and 18 were detected in 5% of SNIP and 18% of SNIP-SNSCC, but not in SNSCC. There was no correlation between HPV infection and >70% p16 immunostaining.

**Conclusions:** HPV infection appears to play a minor role in SNIP and SNSCC and p16 immunostaining does not appear a valid surrogate marker for HPV. However, reduced or loss p16 expression may have prognostic value as a risk marker for recurrent SNIP.

**Key words:** sinonasal inverted papilloma, sinonasal squamous cell carcinoma, recurrence, HPV, p16

## Introduction

Sinonasal papillomas are defined as a benign epithelial tumor composed of well-differentiated columnar or ciliated respiratory epithelium with a variable degree of squamous differentiation. Three different histopathological types have been described according to the World Health Organization (WHO): exophytic papilloma, columnar cell papilloma or oncocytic papilloma and Schneiderian or inverted papilloma (SNIP)<sup>(1)</sup>. SNIP is a relatively uncommon tumor, accounting for 0.5 to 7% of all neoplasms of the sinonasal tract, with an incidence between 0.2 to 1.5/100.000 per year<sup>(1-3)</sup>. Its etiology is unknown but different factors have been suggested, including human papillomavirus (HPV) infection and occupational exposure to organic solvents

<sup>(1,4)</sup>.

SNIPs are histologically benign, however, they may eventually have an aggressive behavior due to three special characteristics: tendency to local invasion and aggressive growth, local recurrence and malignant transformation into sinonasal squamous cell carcinoma (SNSCC)<sup>(5-7)</sup>. With a lesser incidence also other tumors as adenocarcinoma, mucoepidermoid carcinoma, undifferentiated carcinoma, verrucous carcinoma or transitional cell carcinoma may arise from SNIP<sup>(8)</sup>. The incidence of SNSCC associated with SNIP (SNIP-SNSCC) ranges from 2 to 27% in the literature<sup>(9)</sup>. SNSCC can occur metachronous, arising in the first 6 months after the initial diagnosis, or more frequently synchronous<sup>(1)</sup>.

Although genetic alterations in SNSCC are still little studied, it appears that many are similar to those found in described in head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC). Particularly frequent are mutations in genes involved in cellular proliferation and cell cycle regulation, such as TP53, CDKN2A, EGFR, NF1 and HPV infection<sup>(10)</sup>. As they have also been detected in SNIP, these genetic alterations may be early events in tumorigenesis<sup>(11-17)</sup>. HPV infection and EGFR mutation may also have clinical relevance as both have been associated with longer SNIP-free follow-up<sup>(11,12,14)</sup>.

Numerous reports have focused on the role of HPV in the development of SNIP and in their progression to SNSCC<sup>(2,18)</sup>. However, possibly due to different HPV detection methods, including those that use p16 protein overexpression as a surrogate marker, but perhaps also to geographic differences in HPV incidence, there is little agreement on the impact of HPV on SNIP<sup>(19)</sup>. Through interaction with oncoproteins E6, E7 and E5, transcriptionally active HPV is known to respectively affect the expression of p53, p16 and EGFR<sup>(20-22)</sup>. The purpose of this study was to evaluate p16, p53, EGFR, pEGFR protein expression and HPV infection as markers of tumor progression in a series of SNIP and SNSCC.

## Materials and methods

### Patients

Between January 1989 and December 2014, tissue samples were obtained from 49 cases with a confirmed diagnosis of SNIP, 11 with SNIP-SNSCC and 52 SNSCC without previous history of SNIP. All patients had not been treated previously and underwent surgery (in majority endoscopic) for curative purposes in our hospital. All clinical data are summarized in Table 1. This study was performed in accordance with and approved by the Institutional Ethics Committee of the Hospital Universitario Central de Asturias and by the Regional CEIC from Principado de Asturias (approval number: 07/16 for project CICPF16008HERM and 2020.048 for project FIS PI19/00191). Informed consent was obtained from all patients.

### Immunohistochemistry

Protein expression was analyzed by immunohistochemistry on 3 µm sections of individual tissue blocks of SNIP and SNIP-SNSCC. For the samples of SNSCC we used previously created tissue microarray blocks containing three cores from different areas of the same tissue block for each tumor. Immunohistochemistry (IHC) was performed on an automatic staining workstation (Dako Autostainer Plus; DakoCytomation). The antibodies used for IHC were anti-p16 (clone E6H4, VentanaRoche mtm laboratories AG, Heidelberg, Germany), anti-p53 (DO-7, DAKO, Glostrup, Denmark), anti-EGFR (clone 2-18C9, DAKO, Glostrup, Denmark) and anti-pEGFR (clone D7A5, Cell Signaling Technology, Cambridge, UK). The immunostained tumor sections were evaluated

by two investigators (MM and BV) in a single review process, blinded to the patients' clinical data. In samples where there was discrepancy, it was solved afterwards by looking together using a multi-head microscope. Most of the literature on p16 in SNIP and SNSCC has focused on its role as surrogate marker of HPV and used >70% positivity as cut-off, however, in our study we also wanted to evaluate loss or reduction of p16 expression. Previous studies that have evaluated p16 expression levels all used a different grading, for example 6 grades with increments of 20%<sup>(23)</sup>, 4 grades with increments of 25%<sup>(3)</sup>, or 4 grades of <5%, 5-20%, 20-50% and 50-100%<sup>(20,24)</sup>. We chose our grading to take into account the >70% cut-off (grade 3), to evaluate complete absence or 0% (grade 0), and two intermediate levels of 1-30% (grade 2) and 30-70% (grade 3). P53 immunostaining was evaluated as positive when >10% of the malignant cells showed nuclear staining. EGFR and pEGFR immunostaining was considered positive when moderate to strong membranous or cytoplasmic staining was observed in >10% of tumor cells; tumors with no or weak staining were regarded as negative.

### HPV detection

PCR with MY11/GP6+ primers (site-directed L1 fragment of HPV) was performed to detect a broad spectrum of HPV genotypes. Briefly, the reaction contained 25 µl of reaction mixture containing 1x PCR buffer, 2 mmol/L MgCl<sub>2</sub>, 50 µmol/L of each deoxynucleoside, 0.5 µmol/L of sense and antisense primers, 10 µl of DNA sample and 1 U Taq DNA polymerase (Promega Biotech Iberica S.L. Madrid, Spain). The PCR thermal profile was 35 cycles: denaturation at 94°C for 30 sec, annealing at 55°C for 30 sec and extension at 72°C for 1 min, with an initial denaturation at 94°C for 5 min and a final extension at 72°C for 10 min. The amplified DNA fragments of approximately 200 bp were identified by electrophoresis in 1.5% agarose gel with ethidium bromide. All positive specimens for L1 fragment were tested by hybridization assays using type-specific probes for HPV<sup>(14)</sup>.

### Statistical analysis

SPSS 19.0 software (SPSS Inc., Chicago, IL, USA) was used to analyze correlations between clinical and immunohistochemical staining factors using univariate Pearson's and Fisher's exact chi-squared tests. Kaplan-Meier curves were undertaken for the evaluation of DFS by application of univariate logarithmic range test (Log-rank test). Multivariate Cox regression analysis was performed for factors possibly related to recurrent SNIP, recurrent SNSCC and survival. P-values < 0.05 were considered to indicate statistical significance.

## Results

### Clinical features and follow-up

All SNIP and SNSCC were completely resected, for stage T3 and T4 SNSCC often carried out 'piece meal' by endoscopic appro-

	SNIP		p-value	SNSCC		p-value
	w/o rec	with rec		snip-snscc	snscc	
<b>Overall survival, months</b>			NA			0.562
Mean (range)	NA	NA		45 (3-159)	30 (1-216)	

w/o rec: without recurrent SNIP; with rec: with recurrent SNIP; NA: not applicable; <sup>a</sup> Other symptoms include exophthalmia, hyposmia, facial swallowing, oronasal fistulae, cervical mass; <sup>b</sup> Krouse T stage is used in SNIP only.

aches. Apparent clean tumor margins were observed by the surgeon and intraoperative biopsies from suspicious or doubtful areas were routinely sent to the pathologist to guarantee a complete resection. However, this does not guarantee pathologically confirmed free microscopic margins.

Of 49 SNIP patients, 20 were female (41%) and 29 male (59%). Mean age was 63 years (range 28-85). According to the Krouse classification, there were 13 T1 (27%), 23 T2 (46%) and 13 T3 (27%). Nineteen originated in the maxillary sinus (39%), 7 frontal sinus (14%), 6 ethmoid (12%) and 17 nasal cavity (35%). None of the 49 patients with SNIP received complementary radio- or chemotherapy after surgery. Twenty-two (45%) patients with SNIP developed a recurrent SNIP during follow-up, with a mean disease-free time of 76 months (range 11-318).

All 11 SNIP-SNSCC were of the keratinizing type, 7 women (64%) and 4 men (36%). Four had metachronous and 7 had synchronous SNIP. Mean age was 60 years (range 22-82). Seven tumors were located in the maxillary sinus (64%), 2 ethmoid (18%) and 2 nasal cavity (18%). Two cases were T2 (18%), 3 T3 (27%), 4 T4a (36%) and 2 T4b (18%). At the time of diagnosis, 5 (46%) patients harbored lymph node metastasis. All patients underwent radical surgery, while 9 (81%) received postoperatively radiotherapy; for two stage T2 patients surgery alone was considered sufficient. Mean follow-up time was 45 months (range 3-159). During follow-up, 10 (91%) patients developed recurrent SNSCC.

All 52 SNSCC were of the keratinizing type, 15 female (29%) and 37 male (71%). Mean age was 66 years (range 42-92). Forty-two (81%) tumors were localized in maxillary sinus and 10 (19%) ethmoid sinus. Five (10%) cases were tumor stage T2, 16 T3 (31%), 23 T4a (44%) and 8 T4b (15%). At the time of diagnosis, 11 (21%) patients harbored lymph node metastasis. All patients underwent radical surgery, while 38 (73%) received postoperatively radiotherapy and 2 (4%) chemotherapy; 12 patients did not receive adjuvant therapy due to early and extensive recurrence, high age and bad physical condition or refusal to receive further treatment. Mean follow-up time was 30 months (range 1-216). During follow-up, 43 (83%) developed recurrent SNSCC. A detailed description of all clinical and follow-up data is given in Table 1.

#### Immunohistochemical analysis

Nuclear and cytoplasmic p16 expression in >70% of tumor cells

was observed in 37% (10/27) of SNIP and in 32% (7/22) of SNIP that later developed a recurrent SNIP. In SNIP-SNSCC and SNSCC this was significantly less: 18% (2/11) and 11% (6/52) (Fisher's  $\chi^2$  p=0.001 and p=0.000), respectively (Table 2). Conversely, reduced or loss of p16 expression occurred in 7% (2/27) SNIP and 32% (7/22) SNIP that later developed a recurrent SNIP (Fisher's  $\chi^2$  p=0.006). In SNIP-SNSCC and SNSCC, this was 64% (7/11) and 87% (45/52), respectively (Fisher's Chi2 p=0.089) (Table 2). Comparing synchronous and metachronous SNIP-SNSCC, reduced or loss of p16 expression appeared more frequent in the former (6/7 versus 1/4 cases, Fisher's  $\chi^2$  p=0.088), although due to the low number of cases, this observation should be interpreted with caution.

There was no difference in p16 expression levels among the different anatomical localizations of the SNIP nor of the SNSCC. Representative images of p16 staining grades 0 to 3 both in SNIP as in SNSCC are given in Figure 1. Reduced or loss of p16 expression was observed more frequently in higher Krouse stage SNIPs, with p16 grades 0 and 1 in 0% (0/13) of Krouse stage T1 versus 13% (3/23) of stage T2 and 46% (6/13) of stage T3 SNIPs (Pearson's  $\chi^2$  p=0.052).

P53 expression was found in 56-69% of SNIP, SNIP-SCC and SN-SCC (Table 2). EGFR immunohistochemistry failed for 2 SNIP and 5 SNIP-SNSCC cases; positivity was more frequent in SNIP (77-96%), than in SNIP-SNSCC (67%) and SNSCC (40%). Expression of pEGFR followed a similar pattern (Table 2). P53, EGFR and pEGFR expression (representative images of given in Figure 2) did not correlate to any of the clinical parameters or to p16 expression. HPV status could not be analyzed in 13 SNIP and 6 SNSCC cases. High-risk HPV types 16 and 18 were found in 5% (2/36) SNIP, in 18% (2/11) of SNIP-SNSCC and in 0% (0/46) of SNSCC. Statistical comparisons were performed (Table 2) but the low number of positive cases preclude strong conclusions. Low-risk HPV types 42, 56 and 61 were each found in one case of SNIP-SNSCC (Table 2). Again, due to the low number of HPV-positive cases, we did not analyze correlations with clinical or follow-up data. The two cases SNIP and the two cases SNIP-SNSCC with HPV16/18 infection showed a p16 immunostaining of less than 70% and were p53 positive, EGFR positive and pEGFR negative.

#### Correlation with follow-up data

Krouse stage 3 SNIPs showed a higher risk of developing a



Table 2. Immunohistochemical staining results of p16, p53, EGFR and pEGFR and HPV infection according to type of tumor sample.

	SNIP			SNSCC		
	w/o rec	with rec	p-value	snip-snscc	snscc	p-value
<b>p16</b>			0.060*			0.089*
grade 0: 0%	0/27 (0%)	4/22 (18%)		6/11 (55%)	45/52 (87%)	
grade 1: 1-30%	2/27 (7%)	3/22 (14%)		1/11 (9%)	0/52 (0%)	
grade 2: 31-70%	15/27 (56%)	8/22 (36%)		2/11 (18%)	1/52 (2%)	
grade 3: >70%	10/27 (37%)	7/22 (32%)		2/11 (18%)	6/52 (11%)	
<b>p53 positive</b>	15/27 (56%)	13/22 (59%)	1.000	7/11 (64%)	36/52 (69%)	0.732
<b>EGFR positive</b>	26/27 (96%)	17/20 (77%)	0.298	4/6 (67%)	21/52 (40%)	0.387
<b>pEGFR positive</b>	16/27 (59%)	12/22 (55%)	0.779	5/11 (45%)	19/52 (36%)	0.735
<b>HPV</b>						
types 16/18	2/20 (10%)	0/16 (0%)	0.492	2/11 (18%)	0/46 (0%)	<b>0.034</b>
types 42/56/61	0/20 (0%)	0/16 (0%)	NA	3/11 (27%)	0/46 (0%)	<b>0.006</b>

w/o rec: without recurrent SNIP; with rec: with recurrent SNIP; \*comparison of p16 grades 0-1 versus 2-3.

Table 3. Univariate and multivariate Cox regression recurrent SNIP-free follow-up analysis of Krouse classification and p16 expression.

	Univariate			Multivariate	
	Recurrent SNIP	Log rank	Significance	HR (95% CI)	Significance
<b>Krouse T stage</b>					
1	2/13 (15%)				
2	5/22 (23%)	5.612	p=0.060	0.57 (0.23 - 1.44)	p=0.236
3	6/13 (46%)				
<b>p16 expression</b>					
0-10%	4/4 (100%)				
10-30%	2/5 (40%)				
30-70%	4/22 (18%)	18.470	<b>p=0.000</b>	2.17 (1.20 - 3.91)	<b>p=0.010</b>
70-100%	3/17 (18%)				

HR: Hazard ratio; CI : Confidence interval.

recurrent SNIP, with a 5-year DFS of 58%, whereas in Krouse stages 1 and 2 this was 84% and 91%, respectively (Log rank 5.612, p=0.060). None of the other clinical data were related to DFS. Immunohistochemical staining of p16 expression significantly (Log rank 18.470, p=0.000) correlated with increased risk of SNIP to develop a recurrent SNIP. Particularly, the lower p16 staining grades 0 and 1 showed a 5-year DFS of 25% and 53% versus 91% and 87% for the higher p16 staining grades 2 and 3, respectively (Figure 3). Multivariate Cox regression analysis was performed with p16 expression and Krouse stage, the only two parameters with significant or nearly significant differences in univariate analysis (Table 3) and showed that reduced and lost p16 expression in SNIP was a prognostic factor independent from Krouse stage for risk of developing recurrent SNIP (Hazard ratio 2.17, p=0.010). Expression of p53, EGFR and pEGFR was not related to DFS of SNIP. Analyzing SNIP-SNSCC and SNSCC, overall

and disease-free survival were comparable between the two subgroups. Expression of p16, p53, EGFR and pEGFR showed no correlation with overall and disease-free survival in SNIP-SNSCC or SNSCC.

### Discussion

A wide variety of factors in SNIP have been related to recurrent SNIP and progression to SNSCC, including smoking, bone invasion, absence of inflammatory polyps, hyperkeratosis, presence of squamous epithelial hyperplasia and increased mitotic index<sup>(1,4,7)</sup>. Krouse and other classification systems have been claimed to have prognostic value for the risk of recurrent SNIP<sup>(25-27)</sup> while recurrent SNIP itself may indicate an increased risk of developing malignant tumors<sup>(28)</sup>. In our series, Krouse stage III SNIP indeed developed more frequent recurrent SNIP than stages I and II (Figure 3), similar to the findings of a large meta-study of

Table 1. Clinical and follow-up data.

	SNIP			SNSCC		
	w/o rec	with rec	p-value	snip-snscc	snscc	p-value
<b>Sex, n (%)</b>			<b>0.574</b>			<b>0.039</b>
Male	17/27 (63%)	12/22 (55%)		4/11 (36%)	37/52 (71%)	
Female	10/27 (37%)	10/22 (45%)		7/11 (64%)	15/52 (29%)	
<b>Age, years</b>			<b>0.546</b>			<b>0.217</b>
Mean (range)	64 (36-81)	61 (28-94)		60 (22-82)	66 (42-92)	
<b>Symptoms, n (%)</b>						
Nasal obstruction	26/27 (96%)	14/22 (64%)	<b>0.007</b>	9/11 (82%)	14/52 (45%)	0.166
Facial pain	2/27 (7%)	1/22 (5%)	1.000	7/11 (64%)	21/52 (68%)	1.000
Epistaxis	4/27 (15%)	1/22 (5%)	0.362	2/11 (18%)	9/52 (29%)	0.696
Rhinorrhoea	9/27 (33%)	6/22 (27%)	0.760	2/11 (18%)	9/52 (29%)	0.696
Other <sup>a</sup>	4/27 (15%)	2/22 (9%)	0.392	7/11 (64%)	13/52 (25%)	0.199
<b>Primary location, n (%)</b>			<b>0.171</b>			<b>0.040</b>
Maxillary sinus	9/27 (33%)	10/22 (46%)		7/11 (64%)	42/52 (81%)	
Frontal sinus	2/27 (7%)	5/22 (23%)		0/11 (0%)	0/52 (0%)	
Ethmoid sinus	5/27 (19%)	1/22 (4%)		2/11 (18%)	10/52 (19%)	
Nasal cavity	11/27 (41%)	6/22 (27%)		2/11 (18%)	0/52 (0%)	
<b>Side, n (%)</b>			<b>0.245</b>			<b>0.235</b>
Right	10/27 (37%)	6/22 (27%)		5/11 (46%)	15/52 (48%)	
Left	17/27 (63%)	14/22 (64%)		5/11 (46%)	16/52 (52%)	
Both	0 (0%)	2/22 (9%)		1/11 (9%)	0/52 (0%)	
<b>Krouse T stage <sup>b</sup>, n (%)</b>			<b>0.025</b>			<b>NA</b>
T1	9/27 (33%)	4/22 (18%)		NA	NA	
T2	15/27 (56%)	8/22 (36%)		NA	NA	
T3	3/27 (11%)	10/22 (46%)		NA	NA	
<b>T stage n (%)</b>			<b>NA</b>			<b>0.847</b>
T1	NA	NA		0/11 (0%)	0/52 (0%)	
T2	NA	NA		2/11 (18%)	5/52 (10%)	
T3	NA	NA		3/11 (27%)	16/52 (31%)	
T4a	NA	NA		4/11 (36%)	23/52 (44%)	
T4b	NA	NA		2/11 (18%)	8/52 (15%)	
<b>N stage n (%)</b>			<b>NA</b>			<b>0.625</b>
N0	NA	NA		6/11 (55%)	41/52 (79%)	
N1	NA	NA		5/11 (46%)	9/52 (17%)	
N2	NA	NA		0/11 (0%)	2/52 (4%)	
<b>Differentiation</b>			<b>NA</b>			<b>0.991</b>
well	NA	NA		4/11 (36%)	20/52 (39%)	
moderately	NA	NA		2/11 (18%)	9/52 (17%)	
poorly	NA	NA		5/11 (46%)	23/52 (44%)	
<b>Complementary treatment, n (%)</b>			<b>NA</b>			<b>0.902</b>
Radiotherapy	0 (0%)	0 (0%)		9/11 (81%)	38/52 (73%)	
Chemotherapy	0 (0%)	0 (0%)		0/11 (0%)	2/52 (4%)	
<b>Recurrent SNSCC, n (%)</b>	NA	NA	NA	10/11 (91%)	43/52 (83%)	0.676
<b>Disease-free survival, months</b>			<b>NA</b>			<b>0.920</b>
Mean (range)	NA	76 (11-318)		30 (2-159)	21 (1-216)	



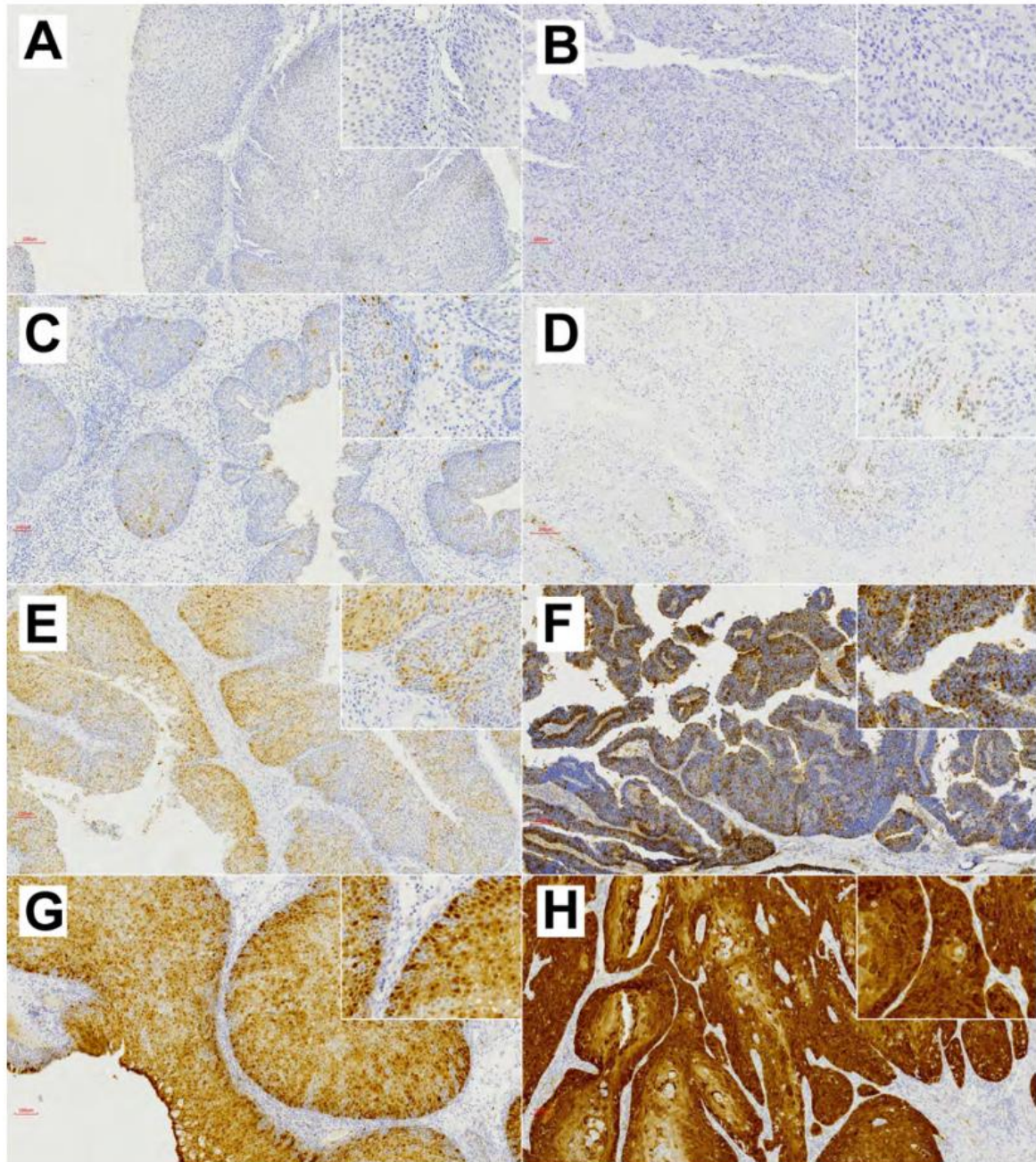


Figure 1. Photomicrographs of immunohistochemical expression of p16 in SNIP (A, C, E and G) and SNSCC (B, D F and H). Cytoplasmatic and nuclear staining of p16 was scored as grade 0 when negative (A, B), grade 1 for 1-30% (C, D), grade 2 for 30-70% (E, F) and grade 3 for >70% (G, H). Original magnification 10x and insert 20x.

1787 SNIPs<sup>(27)</sup>.

In addition to clinical parameters, the prognostic potential of several immunohistochemical stainings such as EGFR, TGF $\alpha$ , desmoglein, SCCA, Ki67, E-cadherin and Beta-catenin<sup>(7,29)</sup>, as well as genetic mutations affecting TP53, CDKN2A and EGFR

have been studied<sup>(11-17)</sup>. Many studies have been devoted to HPV and its effects on cell cycle, MAPK and PI3K signalling pathways. However, its role in SNIP and SNSCC is still a matter of debate, due to greatly varying reported frequencies and common findings of non-oncogenic low-risk HPV subtypes<sup>(3-5,18-20,22,30)</sup>. It



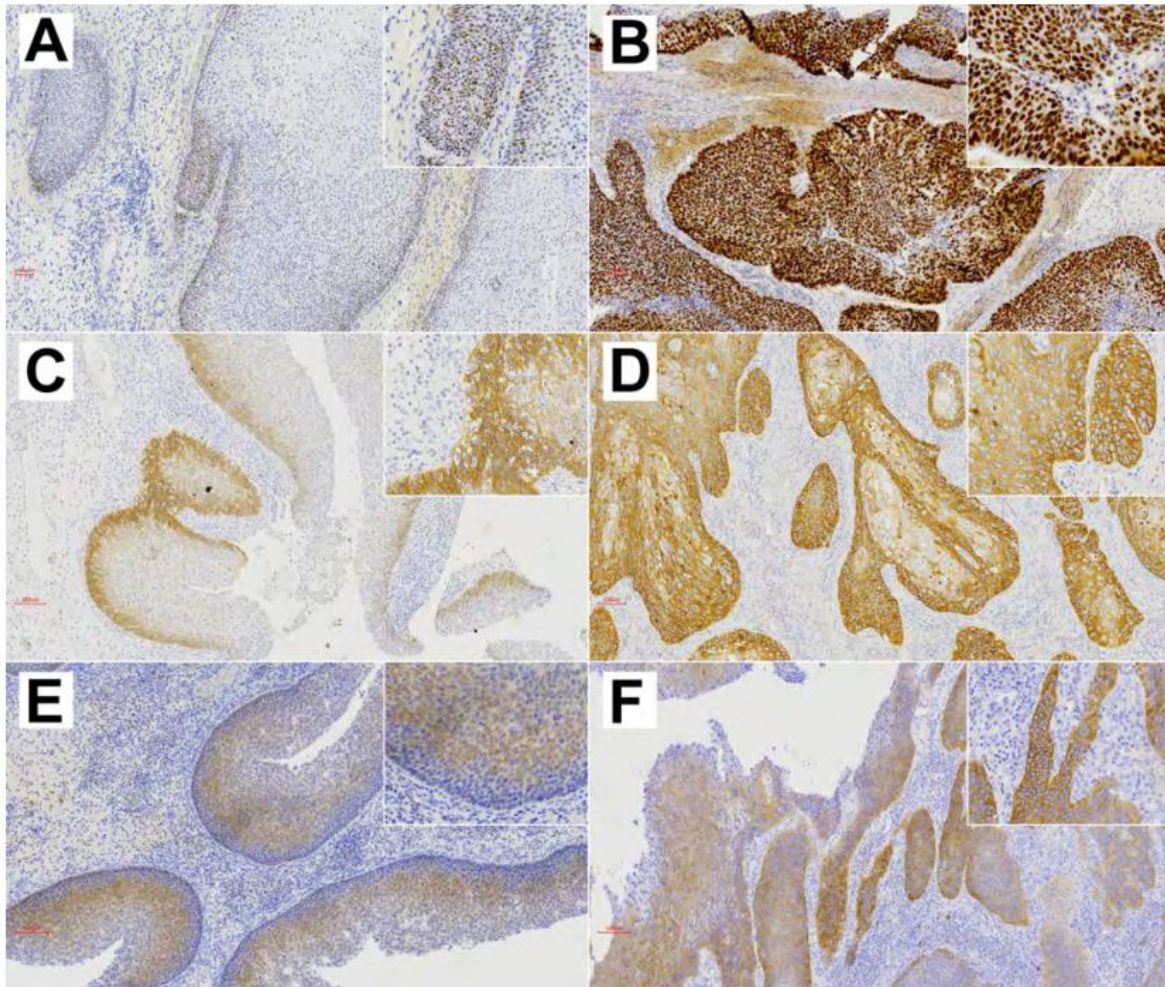


Figure 2. Photomicrographs of immunohistochemical expression of p53, EGFR and pEGFR in SNIP (A, C, and E) and SNSCC (B, D and F). Cases were evaluated as positive when >10% of the malignant cells showed nuclear staining for p53 (A, B) and moderate to strong membranous or cytoplasmic staining for EGFR (C, D) and pEGFR (E, F). Original magnification 10x and insert 20x.

may be argued that not the presence of HPV-DNA as such, but rather the transcriptional activity of HPV is biologically relevant in cancer. Unfortunately, few studies on SNIP and SNSCC have analyzed transcriptionally active HPV. Using HPV-RNA-ISH, transcriptionally active HPV has been detected in 18-29% of SNIP-SNSCC<sup>(19,31-32)</sup>. Notably, Rooper et al. found 0% of 52 SNIP to express HPV-RNA<sup>(19)</sup>. These studies may indicate that HPV does not play a role in malignant transformation of SNIP to SNSCC but may have some clinical relevance in SNSCC.

As the HPV E7 oncoprotein causes up-regulation of the cell cycle regulator p16, this protein has been studied in SNIP and SNSCC as a surrogate marker of transcriptionally active HPV infection, taking example from studies on oropharyngeal SCC<sup>(33,34)</sup>. Indeed, a positive correlation between transcriptionally active HPV and p16 positivity in >70% of tumor cells has been reported in

SNSCC<sup>(19,31)</sup>. However, there was no correlation between p16 expression and the detection of HPV-DNA<sup>(4,20,23,35)</sup>. Aside from its supposed relation to HPV, aberrant p16 expression may still be an important event in SNIP and SNSCC. In HPV-negative HNSCC it has been shown that p16 plays an important role in the upregulation of cell cycle signalling and CDKN2A (the encoding gene for p16) is the second most frequently mutated gene in HNSCC after TP53<sup>(10)</sup>. Two recent sequencing studies on SNIP-SNSCC have yielded similar results, with 33-42% of cases carrying inactivating CDKN2A mutations<sup>(16,17)</sup>. Aside from gene mutations, also frequent gene copy number losses have been found. Discrepant results were obtained regarding SNIP, where Uchi et al. also found CDKN2A mutations in 2/3 cases, but Brown et al did not find any in 11 cases<sup>(16,17)</sup>, so more studies are needed.

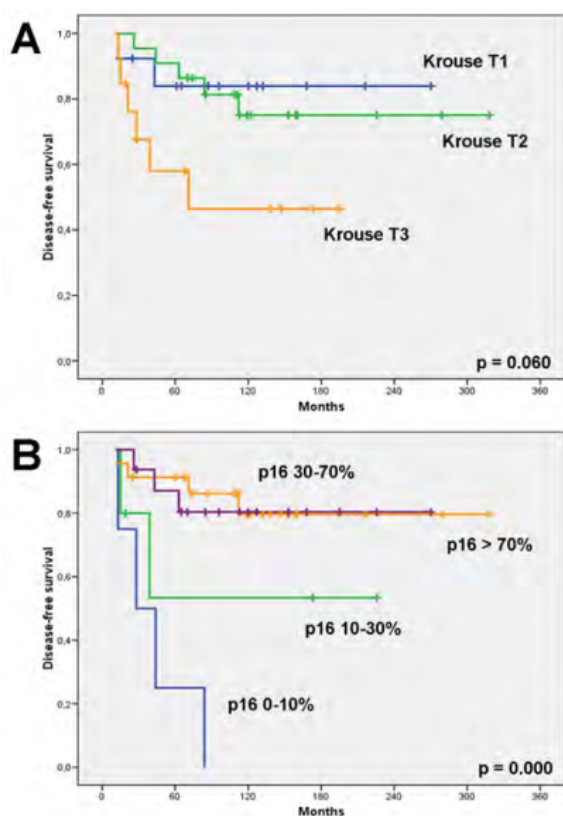


Figure 3. Recurrent SNIP-free follow-up of 49 SNIP according to Krouse T stage (A) and according to p16 scores (B).

Inactivating mutation and copy number loss of CDKN2A lead to reduced or complete absence of p16 expression, which can be analyzed by immunohistochemistry. Our results indicated 18% (9/49) SNIP to have lost (grade 0) or reduced (grade 1) p16 expression, while in SNIP-SNSCC and SNSCC this was 64% and 87%, respectively, suggesting that this genetic alteration is increasingly involved in the progression from SNIP to SNSCC. This is in agreement with Lin et al., who reported a significantly more frequent loss of p16 expression in 133 SNIP-SNSCC (84%) compared to 21 benign SNIP (36%)<sup>(24)</sup>. Additionally, our study revealed reduced and loss of p16 expression in SNIP to be related to the risk of developing recurrent SNIP, and this prognostic value was independent from Krouse T stage (Figure 3 and Table 3). Studying 53 SNIPs, Zydron et al. did not find a significant correlation between the level of p16 expression and recurrent SNIP, however, comparison is difficult as the cut-off percentages for scoring were not detailed in their study<sup>(36)</sup>. In addition, it is possible that data obtained from immunohistochemical stainings suffer from sampling bias. The series of SNIP in our study concerned whole paraffin blocks and the SNIP-SNSCC and SNSCC were represented each by three 1 mm cores in tissue

microarray blocks; it may be that the studied tissue areas did not fully represent the tumors. Another difference with previously published studies is the fact that both SNIP-SNSCC and SNSCC in our series carried a very high rate of recurrent SNSCC. This may reflect the distribution of tumor-stage: the proportion of T4a/T4b tumors is well over 50% of all cases. This in turn may be since our hospital is a center of referral for sinonasal and skull base tumors, therefore receiving a relatively high number of advanced stage patients.

This study has several limitations. First, our results related to recurrence outcomes are limited by the fact that tumor resection margins have not been evaluated routinely by the pathologist. Second, we have no information on the mutation and copy number status of CDKN2A as possible cause of the observed reduced or loss of p16 expression, and the preliminary data in this study will need to be validated by analysis of p16 expression on the mRNA level. A third limitation is the lack of SNIP cases that during follow-up developed SNSCC, which might shed further light on the importance of CDKN2A alterations and p16 expression in the process of malignant transformation. These aspects need to be investigated in future studies.

### Conclusion

Altered p16 expression is a genetic event in SNIP that is relevant to be studied independent from its possible association with HPV infection. Our data are an indication that reduced or loss of p16 expression may be a risk factor for recurrent SNIP.

### Acknowledgements

This study has been funded by Instituto de Salud Carlos III (ISCIII) through the project "PI19/00191" and co-funded by the European Union, grant CB16/12/00390 from the Centro de Investigación Biomédica en Red de Cáncer (CIBERONC), grant IDI2018/155 Ayudas a Grupos PCTI Principado de Asturias, and grant CICPF16008HERM of Fundación AECC, Spain.

### Informed consent

Informed consent was obtained from all individual participants included in the study.

### Authorship contribution

MM, VNC, JLL, CAM and MAH contributed to the study conception and design. MM, FL, CAM and JLL were responsible for tissue sample and clinical data collection. Material preparation, data collection and analysis were performed by MM, VNC, BV, LSF. The first draft of the manuscript was written by MM, VNC and MAH and all authors commented on previous versions of the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

### Conflict of interest

All authors declare they have nothing to disclose.



## References

1. El-Naggar AK, Chan JKC, Grandis JR, Takata T, Sliotweg PJ, eds. WHO Classification of Tumors Pathology and Genetics of Head and Neck Tumors. Vol 4th ed. Lyon: IARC Press; 2017.
2. Stepp WH, Farzal Z, Kimple AJ, et al. HPV in the malignant transformation of sinonasal inverted papillomas: A meta-analysis. *Int Forum Allergy Rhinol* 2021; 11:1461-1471.
3. Mohajeri S, Lai C, Purgina B, et al. Human papillomavirus: An unlikely etiologic factor in sinonasal inverted papilloma. *Laryngoscope* 2018; 128:2443-2447.
4. Sham CL, Lee DL, van Hasselt CA, Tong MC. A case-control study of the risk factors associated with sinonasal inverted papilloma. *Am J Rhinol Allergy* 2010; 24:e37-e40.
5. Lawson W, Schlecht NF, Brandwein-Gensler M. The role of the human papillomavirus in the pathogenesis of schneiderian inverted papillomas: An analytic overview of the evidence. *Head Neck Pathol* 2008; 2:49-59.
6. Mirza S, Bradley P, Acharya A, et al. Sinonasal inverted papillomas: Recurrence, and synchronous and metachronous malignancy. *J Laryngol Otol* 2007; 121:857-864.
7. Lisan Q, Laccourrye O, Bonfils P. Sinonasal inverted papilloma: From diagnosis to treatment. *Eur Ann Otorhinolaryngol Head Neck Dis* 2016; 133:337-341.
8. Nudell J, Chiosea S, Thompson LDR. Carcinoma Ex-Schneiderian Papilloma (Malignant Transformation): A Clinicopathologic and Immunophenotypic Study of 20 Cases Combined with a Comprehensive Review of the Literature. *Head Neck Pathol* 2014; 8:269-286.
9. Bishop JA, Guo TW, Smith DF, et al. Human Papillomavirus-Related Carcinomas of the Sinonasal Tract. *Am J Surg Pathol* 2013; 37:185-192.
10. Leemans CR, Snijders PJF, Brakenhoff RH. The molecular landscape of head and neck cancer. *Nat Rev Cancer* 2018; 18:269-282.
11. Udager AM, McHugh JB, Goudsmit CM, et al. Human papillomavirus (HPV) and somatic EGFR mutations are essential, mutually exclusive oncogenic mechanisms for inverted sinonasal papillomas and associated sinonasal squamous cell carcinomas. *Ann Oncol* 2018; 29:466-471.
12. Sahnane N, Ottini G, Turri-Zanoni M et al. Comprehensive analysis of HPV infection, EGFR exon 20 mutations and LINE1 hypomethylation as risk factors for malignant transformation of sinonasal-inverted papilloma to squamous cell carcinoma. *Int J Cancer* 2019; 144:1313-1320.
13. Sasaki E, Nishikawa D, Hanai N, et al. Sinonasal squamous cell carcinoma and EGFR mutations: a molecular footprint of a benign lesion. *Histopathology* 2018; 73:953-962.
14. Cabal VN, Menendez M, Vivanco B, et al. EGFR mutation and HPV infection in sinonasal inverted papilloma and squamous cell carcinoma. *Rhinology* 2020; 58:368-376.
15. Wang H, Li H, Hu L, et al. EGFR and KRAS mutations in Chinese patients with sinonasal inverted papilloma and oncocytic papilloma. *Histopathology* 2019; 75:274-281.
16. Brown NA, Plouffe KR, Yilmaz O, et al. TP53 mutations and CDKN2A mutations/deletions are highly recurrent molecular alterations in the malignant progression of sinonasal papillomas. *Mod Pathol* 2021; 34:1133-1142.
17. Uchi R, Jiomaru R, Yasumatsu R, et al. Genomic Sequencing of Cancer-related Genes in Sinonasal Squamous Cell Carcinoma and Coexisting Inverted Papilloma. *Anticancer Res* 2021; 41:71-79.
18. Syrjänen K, Syrjänen S. Detection of human papillomavirus in sinonasal papillomas: systematic review and meta-analysis. *Laryngoscope* 2013; 123:181-192.
19. Rooper LM, Bishop JA, Westra WH. Transcriptionally Active High-Risk Human Papillomavirus is Not a Common Etiologic Agent in the Malignant Transformation of Inverted Schneiderian Papillomas. *Head Neck Pathol* 2017; 11:346-353.
20. Scheel A, Lin G, McHugh J, et al. Human Papillomavirus Infection and Biomarkers in Sinonasal Inverted Papillomas: Clinical Significance and Molecular Mechanisms. *Int Forum Allergy Rhinol* 2015; 5:701-707.
21. Genter Williams SM, Disbrow GL, Schlegel R, et al. Requirement of epidermal growth factor receptor for hyperplasia induced by E5, a high-risk human papillomavirus oncogene. *Cancer Res* 2005; 65:6534-6542.
22. Mehrad M, Stelow EB, Bishop JA, et al. Transcriptionally Active HPV and Targetable EGFR Mutations in Sinonasal Inverted Papilloma. *Am J Surg Pathol* 2020; 44:340-346.
23. Holm A, Allard A, Eriksson I, et al. Absence of high-risk human papilloma virus in p16 positive inverted sinonasal papilloma. *Eur Ann Otorhinolaryngol Head Neck Dis* 2020; 137:201-206.
24. Lin GC, Scheel A, Akkina S, et al. P16, EGFR, Cyclin D1, and p53 Staining Patterns for Inverted Papilloma. *Int Forum Allergy Rhinol* 2013; 3:885-889.
25. Krouse JH. Development of a staging system for inverted papilloma. *Laryngoscope* 2000; 110:965-968.
26. Mak W, Webb D, Al-Salihi S, et al. Sinonasal inverted papilloma recurrence rates and evaluation of current staging systems. *Rhinology* 2018; 56:407-414.
27. Lisan Q, Moya-Plana A, Bonfils P. Association of Krouse Classification for Sinonasal Inverted Papilloma With Recurrence: A Systematic Review and Meta-analysis. *JAMA Otolaryngol Head Neck Surg* 2017; 143:1104-1110.
28. Maisch S, Mueller SK, Traxdorf M, et al. Sinonasal papillomas: A single centre experience on 137 cases with emphasis on malignant transformation and EGFR/KRAS status in carcinoma ex papilloma. *Ann Diagn Pathol* 2020; 46:151504.
29. Re M, Gioacchini FM, Bajraktari A, et al. Malignant transformation of sinonasal inverted papilloma and related genetic alterations: a systematic review. *Eur Arch Oto-Rhino-Laryngology* 2017; 274:2991-3000.
30. Kılıç S, Kılıç SS, Kim ES, et al. Significance of human papillomavirus positivity in sinonasal squamous cell carcinoma. *Int Forum Allergy Rhinol* 2017; 7:980-989.
31. Cohen E, Coviello C, Menaker S, et al. P16 and human papillomavirus in sinonasal squamous cell carcinoma. *Head Neck* 2020; 42:2021-2029.
32. Stoddard DG Jr, Keeney MG, Gao G, et al. Transcriptional activity of HPV in inverted papilloma demonstrated by in situ hybridization for E6/E7 mRNA. *Otolaryngol Head Neck Surg* 2015; 152:752-758.
33. Rodrigo JP, Heideman DAM, García-Pedrero JM, et al. Time trends in the prevalence of HPV in oropharyngeal squamous cell carcinomas in northern Spain (1990-2009). *Int J Cancer* 2014; 134:487-492.
34. Singhi AD, Westra WH. Comparison of human papillomavirus in situ hybridization and p16 immunohistochemistry in the detection of human papillomavirus-associated head and neck cancer based on a prospective clinical experience. *Cancer* 2010; 116:2166-2173.
35. Shah AA, Evans MF, Adamson CS, et al. HPV DNA is associated with a subset of Schneiderian papillomas but does not correlate with p16(INK4a) immunoreactivity. *Head Neck Pathol* 2010; 4:106-112.
36. Zydrón R, Marszałek A, Bodnar M, Kosikowski P, Greczka G, Wierzbicka M. The analysis of expression of p16 protein in group of 53 patients treated for sinonasal inverted papilloma. *Braz J Otorhinolaryngol* 2018; 84:338-343.

Mario A. Hermsen  
 Grupo Oncología de Cabeza y Cuello  
 Instituto de Investigación Sanitaria  
 del Principado de Asturias (ISPA)  
 Instituto Universitario de Oncología  
 del Principado de Asturias (IUOPA)  
 Centro de Investigación Biomédica  
 en Red (CIBER-ONC)  
 Edf. FINBA, N-1 F49  
 C/ Avenida de Roma s/n  
 33011 Oviedo  
 Spain

Tel: +34-985107937  
 Fax: +34-985108015  
 E-mail: mhermsen@hca.es  
 ORCID nº 0000-0002-5959-6289