

Laporan Penelitian**Asosiasi antara mutasi gen p16 dengan tipe histopatologi karsinoma nasofaring****Muhtarum Yusuf, Sabilarrusydi, Mansur Shidiq Wiyadi**Departemen Ilmu Kesehatan Telinga Hidung Tenggorok – Bedah Kepala Leher
Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga/Rumah Sakit Dr. Soetomo
Surabaya**ABSTRAK**

Latar belakang: Pertumbuhan tumor dan metastasis penderita karsinoma nasofaring (KNF) yang diduga karena peran beberapa biomarker molekular, dapat diidentifikasi dari spesimen tumor penderita KNF. Inaktivasi gen p16 akibat mutasi gen p16 dapat digunakan sebagai indikator prognosis dan strategi pemberian terapi yang lebih baik pada penderita KNF. **Tujuan:** Membuktikan asosiasi antara mutasi gen p16 dengan tipe histopatologi KNF. **Metode:** Bahan biopsi dibagi menjadi 2 bagian untuk pemeriksaan histopatologi dan *polymerase chain reaction* (PCR). Tipe histopatologi diketahui dari 21 tumor KNF dengan melakukan pengecatan hematoksilin eosin jaringan secara Meyer, terbagi 3 yaitu WHO tipe 1, tipe 2 dan tipe 3. Mutasi gen p16 diperiksa dari jaringan tumor primer KNF dengan PCR, menggunakan mesin *Gene Touch Bioneer*, dan sekuensing dengan mesin ABI PRISM 310. Analisis statistik menggunakan uji Spearman. **Hasil:** Didapati sebanyak 21 penderita KNF sesuai kriteria inklusi dan eksklusi. Diketahui sebanyak 19 penderita KNF (90,48%) mengalami mutasi gen p16 negatif. Sebanyak 2 penderita KNF (9,52%) mengalami mutasi gen p16 positif dengan histopatologi WHO tipe 3. Hasil uji Spearman mendapatkan nilai $p=0,568$ dan koefisien korelasi sebesar $-0,132$. Asosiasi antara mutasi gen p16 dengan tipe histopatologi (WHO tipe 1, 2, dan 3) pada penderita KNF didapatkan hasil yang tidak bermakna ($p>0,05$). **Kesimpulan:** Tidak terdapat asosiasi antara mutasi gen p16 dengan tipe histopatologi KNF. Hal tersebut mungkin oleh karena insidens mutasi gen p16 yang rendah dan faktor etnis.

Kata kunci: Karsinoma nasofaring, mutasi gen p16, tipe histopatologi

ABSTRACT

Background: Tumor growth and metastasis in nasopharyngeal carcinoma (NPC) patients which were presumed caused by the roles of several molecular biomarkers, could be identified in tumor specimens of NPC patients. P16 gene inactivation that was caused by mutation, can be used as an indicator of prognosis and as strategy for better therapy in NPC. **Purpose:** To identify the association between p16 gene mutation with type of histopathology NPC. **Methods:** Biopsy specimens were divided for histopathology examination and polymerase chain reaction (PCR). Type of histopathology was obtained from 21 NPC tumors by Meyer's hematoxylin eosin staining, and divided into three types, WHO type 1, type 2 and type 3. The mutation of p16 gene were identified with PCR from primary tumor tissues by using Bioneer thermal cyclor machine, and sequencing was performed by ABI PRISM 310. Spearman test was used for statistical analysis. **Results:** We found 21 NPC patients who met the inclusion and exclusion criteria. There were 19 (90.48%) NPC patients which had negative mutation of p16 gene. There were 2 NPC patients (9.52%) who had positive mutation of p16 gene, with histopathology WHO type 3. Spearman test results showed $P=0.568$ with a correlation coefficient -0.132 . Association of mutation of p16 gene with histopathology type (WHO type 1, 2, 3) in NPC patients was not significant ($P>0.05$). **Conclusion:** There was no association found in our study between mutation of p16 gene and histopathological type of nasopharyngeal carcinoma. It might be caused by low incidence of gene p16 mutation in NPC, and ethnic factor.

Keywords: Nasopharyngeal carcinoma, mutation of p16 gene, histopathology type

Alamat korespondensi: Dr. Muhtarum Yusuf, Sp.T.H.T.K.L. (K). Departemen THT-KL Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga/Rumah Sakit Dr. Soetomo. Email: muhtarumyusuf@yahoo.co.id.

PENDAHULUAN

Karsinoma nasofaring (KNF) masih sering menyebabkan kekambuhan meskipun sudah mendapatkan terapi lengkap, baik dengan radioterapi, kemoterapi, atau kombinasi keduanya. Jumlah penderita KNF yang mempunyai respons lengkap pasca terapi masih rendah. Selama ini menurut *World Health Organization* (WHO), tipe histopatologi KNF 2 dan 3 diketahui mempunyai respons terapi yang lebih baik, dibandingkan dengan tipe 1. Namun, didapati bahwa penderita KNF WHO tipe 2 dan 3 mempunyai respons terapi yang sama dengan tipe 1.¹ Hal ini menunjukkan bahwa tipe histopatologi kurang akurat untuk mencerminkan respons terapi KNF, sehingga diperlukan suatu indikator yang dapat menjelaskan prediksi respons terapi dengan lebih akurat.²

Derajat diferensiasi sel mencerminkan tingkat proliferasi sel. Semakin baik derajat diferensiasi maka tingkat proliferasinya semakin rendah.³ Gen p16 berperan penting dalam siklus sel dan mempunyai pengaruh terhadap proliferasi sel melalui produk gen, yaitu protein p16. Mutasi gen p16 mengakibatkan inaktivasi gen sehingga p16 menurun atau tidak didapatkan.⁴ Mutasi tersebut juga memengaruhi diferensiasi sel epitel nasofaring dengan cara memicu sel epitel nasofaring normal menjadi displasia ringan hingga timbul KNF.⁵

Mutasi gen p16 dapat disebabkan oleh faktor internal dan eksternal. Faktor internal berupa mutasi spontan yang terjadi saat proses replikasi, yaitu pada fase mitosis dan meiosis. Faktor eksternal yang dapat menyebabkan mutasi adalah rokok, radiasi ion, dan sinar ultra violet. Mutasi gen p16 menyebabkan perubahan basa nukleotida dan bentuk *deoxyribonucleic acid* (DNA), yang mengakibatkan kesalahan replikasi dan transkripsi.⁶ Hal tersebut menyebabkan inaktivasi gen yang mengakibatkan produksi p16 menurun, bahkan tidak ada.

Penurunan atau tidak didapatnya protein p16 bisa meningkatkan *cyclin D1* di sitoplasma sel. Selain p16, protein lain yang dapat memengaruhi *cyclin D1* adalah p15, p18, dan p19. Peningkatan *cyclin D1* mengakibatkan hambatan fosforilasi protein retinoblastoma (pRb), berakibat *expanding family of heterodimeric 2 transcription factors* (E2F) tidak terlepas dari pRb, sehingga terjadi peningkatan ikatan pRb-E2F yang mengakibatkan peningkatan sel KNF dalam fase sintesis (S). Faktor lain yaitu peningkatan *cellular myelocytomatosis* (c-Myc) dan penurunan delta N p63, dapat meningkatkan sel KNF pada fase S. Sel KNF lebih bersifat *immortal* sehingga proliferasi sel menjadi tak terkendali.⁵

Karsinoma nasofaring WHO tipe 2 dan 3 mempunyai karakteristik tidak berkeratin dengan derajat diferensiasi sel lebih buruk dibanding tipe 1, sehingga lebih radiosensitif dan kemosensitif.⁷ Sensitivitas terhadap radiasi dan kemoterapi juga dipengaruhi oleh fase sel. Sel KNF menunjukkan sensitivitas yang tinggi terhadap kemoradiasi saat fase mitosis (M) dan *growth* (G)₂, namun kurang sensitif pada fase G₁, serta paling resisten di fase *late S*.⁸ Penelitian ini bertujuan untuk membuktikan asosiasi antara mutasi gen p16 dengan tipe histopatologi pada penderita KNF, sehingga dapat dijadikan salah satu alternatif indikator penilaian proliferasi sel KNF.

METODE

Jenis penelitian ini adalah observasional analitik dengan rancangan *cross sectional*. Pengambilan sampel dilakukan secara *consecutive sampling*. Penelitian dilakukan di Unit Rawat Jalan (URJ) Telinga Hidung Tenggorok Bedah Kepala-Leher (THT-KL) Rumah Sakit Dr. Soetomo Surabaya. Penelitian dilakukan sejak bulan Oktober - Desember 2015. Populasi

penelitian adalah penderita yang dicurigai KNF. Jaringan hasil biopsi nasofaring dibagi menjadi 2 yaitu sebagian untuk pemeriksaan histopatologi, sedangkan sisanya untuk pemeriksaan *polymerase chain reaction* (PCR). Sampel adalah penderita KNF dengan hasil pemeriksaan histopatologi WHO tipe 1, 2 atau 3 dari Instalasi Patologi Anatomi RSUD Dr. Soetomo Surabaya. Kriteria inklusi sampel: 1) penderita KNF belum pernah mendapatkan radioterapi, kemoterapi atau kombinasi keduanya, dan 2) bersedia diikutkan dalam penelitian. Kriteria eksklusi yaitu terjadi kerusakan atau tidak tercukupinya bahan biopsi nasofaring saat dilakukan pemeriksaan PCR. Besar sampel didapatkan sebanyak 21 penderita. Variabel bebas penelitian adalah mutasi gen p16, sedangkan variabel tergantung yaitu tipe histopatologi KNF.

Pada penelitian ini, mutasi gen p16 adalah perubahan urutan nukleotida rangkaian DNA gen p16 normal berupa *missense*, *nonsense*, insersi, delesi, *frameshift* maupun ekspansi pengulangan pada ekson 1 dan 2 dari pemeriksaan sekuensing jaringan tumor primer KNF. *Template primer forward* GCGTGAGCTGAGGCAAGAC, *reverse* TCCAAAGCTCAGAGGCTTCATTT.5 Pemeriksaan sekuensing menggunakan mesin ABI PRISM 310. Penilaian mutasi gen p16 dilakukan oleh staf Lembaga Penyakit Tropis (LPT) Universitas Airlangga. Ukuran tiap ekson gen p16 dapat dilihat pada tabel 1.

Penilaian gen p16 sebagai mutasi negatif (-), bila tidak terdapat perubahan urutan nukleotida ekson 1 dan 2 gen p16 dari yang normal. Mutasi positif (+), bila terdapat perubahan urutan nukleotida ekson 1 dan 2 gen p16 dari yang normal.

Tipe histopatologi KNF adalah pembagian hasil pemeriksaan jaringan KNF berdasarkan kriteria WHO tahun 1991 (tabel 2). Pemeriksaan histopatologi dilakukan di Instalasi Patologi Anatomi RSUD Dr. Soetomo Surabaya dengan menggunakan

pengecatan hematoksisilin eosin cara Meyer. Pembacaan dilakukan dengan mikroskop dengan pembesaran 200-400 kali oleh konsultan Patologi Anatomi.

Pemeriksaan PCR dilakukan dengan teknik *single strand conformation polymorphism* (SSCP) dengan reagen Qiagen dan mesin Gene Touch dari Bioneer. Pemeriksaan PCR meliputi ekstraksi DNA, pembuatan gel elektroforesis, purifikasi, *labelling*, dan presipitasi. Sekuensing DNA dilakukan dengan mesin ABI PRISM 310 dan hasilnya dianalisis dengan menggunakan Genetix Tree versi 10.0. Data dianalisis menggunakan uji Spearman, dengan tingkat kemaknaan (α) = 0,05.

HASIL

Berdasarkan hasil pemeriksaan PCR, didapatkan gambaran *double band shift* (DBS) positif pada 14 penderita (66,67%). Gambaran DBS merupakan lokasi gen p16 yang diduga terdapat mutasi sehingga dilanjutkan dengan pemeriksaan sekuensing. Semua DBS yang positif berada di ukuran 400 *base pair* (bp). Hal tersebut menunjukkan ekson 2 gen p16 karena ekson 2 mempunyai ukuran 300-400 bp.

Pemeriksaan sekuensing pada 14 sampel dengan DBS positif didapatkan mutasi pada 2 dari 21 sampel (9,52%) secara keseluruhan. Bentuk mutasi pada kedua sampel berupa mutasi poin dan delesi. Bentuk mutasi dapat dilihat pada gambar 1.

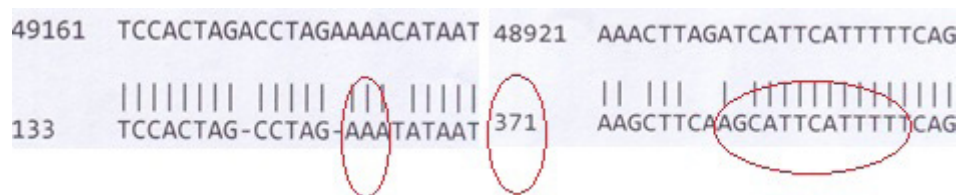
Mutasi dijumpai pada 2 sampel dengan tipe histopatologi WHO tipe 3. Sampel pertama didapatkan 1 mutasi poin dan 2 delesi. Dua kodon AGA untuk kode asam amino arginin berganti menjadi AG, sehingga tidak terbentuk asam amino. Kodon CAT untuk asam amino histidin menjadi TAT untuk asam amino tirosin. Pada sampel kedua, didapatkan 3 mutasi poin meliputi kodon AAA untuk asam amino lisin menjadi AAG

Tabel 1. Ukuran tiap ekson gen p16.⁹

Gen	Ekson	Sekuen DNA (5'-3')	Ukuran fragmen (bp)
p16	1	CGGAGAGGGGGAGAACAGAC CTGGATCGGCCTCCGACCGTAAC	189
	2	TGAGGGACCTTCCGCGGC GTCATGATGATGGGCAGCGC	307
	3	CACATCCCCGATTGAAAGAAC CAGTGAATGAATGAAAATTA	489

Tabel 2. Tipe histopatologi KNF berdasarkan kriteria WHO tahun 1991.¹⁰

Tipe WHO	Karakteristik	Gambaran histologi
Tipe 1	Diferensiasi baik, produksi keratin, dan terdapat jembatan intraselular	<i>Keratinizing squamous carcinoma</i>
Tipe 2	Variasi diferensiasi mulai matur hingga anaplastik dan tidak produksi keratin	<i>Non keratinizing squamous carcinoma</i>
Tipe 3	Tidak produksi keratin, sedikit diferensiasi, dan terdapat berbagai macam sel (<i>clear cell</i> , sel spindel, dan anaplastik)	<i>Undifferentiated carcinoma</i>



Gambar 1. Sekuensing didapatkan mutasi (lingkaran merah) pada 2 sampel: a) mutasi terdapat pada 125 dan 119 bp berupa delesi sedangkan 115 bp adalah mutasi poin, b) mutasi pada 369, 365, 364 dan 362 bp berupa mutasi poin.

untuk asam amino yang sama. Kodon AGA untuk asam amino arginin menjadi CAA untuk asam amino glutamin. Kodon TCA untuk asam amino serin menjadi GCA untuk asam amino alanin.

Asosiasi antara mutasi gen p16 dengan tipe histopatologi KNF dinilai dengan uji Spearman Rho. Hasil uji Spearman mendapati nilai $p=0,568$ dan $r = -0,132$. Mutasi gen p16 dengan tipe histopatologi (WHO tipe 1, 2, 3) pada penderita KNF tidak terdapat asosiasi yang signifikan ($p>0,05$). Hipotesis penelitian tidak terbukti.

DISKUSI

Pada karsinoma nasofaring, inaktivasi gen p16 dapat disebabkan oleh beberapa faktor

meliputi delesi, mutasi, dan hipermetilasi. Sebuah studi menunjukkan bahwa mekanisme hipermetilasi merupakan penyebab tersering dalam deregulasi p16 pada KNF, diikuti delesi, kemudian mutasi.¹¹ Penelitian lain menyatakan bahwa mutasi gen p16 sering didapatkan di *cell line*, namun sulit ditemukan pada jaringan tumor KNF primer. Hal ini disebabkan *cell line* merupakan kultur sel KNF yang selalu dijaga kesterilannya dan bersifat *immortal* sehingga semua perubahan genetik dapat ditemukan, sedangkan jaringan primer mempunyai sifat *immortal*.¹²

Pada penelitian ini didapatkan gambaran DBS sebesar 14 dari 21 sampel (66,67%), yang menandakan dugaan terdapat mutasi gen p16. Hasil sekvensing didapatkan hanya 2 dari 14 sampel (14,29%) yang terjadi

mutasi. Dimungkinkan 12 sampel dengan DBS negatif disebabkan oleh inaktivasi gen p16 bentuk lain yaitu hipermetilasi. Fakta tersebut menunjukkan bahwa insidens mutasi gen p16 pada KNF memang sangat jarang, berbeda dengan hasil penelitian Bruce et al¹³ yang mendapatkan insidens mutasi gen p16 sebesar 5%. Hipermetilasi diketahui menjadi penyebab inaktivasi gen p16 tersering.¹⁴

Mutasi gen p16 bisa juga ditemukan pada jenis kanker yang lain. Insidens mutasi gen p16 pada kanker payudara sekitar 20%, karsinoma paru *non small cell* sebesar 65%, karsinoma sel skuamosa kepala leher 50-70%, melanoma sebesar 60%, leukemia 60%, kanker esofagus 70%, multiple myeloma 60% dan karsinoma pankreas $\geq 85\%$.¹³ Penelitian Mäkitie et al² menunjukkan bahwa mutasi tersering berupa mutasi poin atau nonsense, kemudian diikuti delesi. Hal yang sama dilaporkan pada karsinoma duktus pankreas.⁹

Tempat mutasi tersering ialah di ekson 2, namun jarang pada ekson 1. Sebuah studi pada 3 *cell line* KNF menunjukkan bahwa mutasi gen p16 didapatkan di semua *cell line* dan berada di ekson 2.¹² Pada penelitian lain yang dilakukan di Cina pada 90 penderita KNF tipe histopatologi *non keratinizing squamous cell* (WHO tipe 2 dan 3). Diambil 23 sampel secara random dan didapatkan 10 (40,9%) penderita mengalami mutasi pada ekson 2 gen p16 serta 2 (8,7%) mengalami hipermetilasi pada ekson 1.¹⁵ Mutasi gen p16 pada sebuah penelitian karsinoma laring didapatkan hasil hampir sama.¹⁶ Namun, dijumpai hasil berbeda pada sebuah penelitian melanoma, yaitu didapati bahwa 2 dari 39 tumor primer (5,13%) mengalami mutasi poin gen p16 di ekson 1.¹⁷ Penjelasan mengenai kejadian mutasi gen p16 sering berada di ekson 2 sampai saat ini belum diketahui.

Mäkitie et al² melakukan analisis multivarian yang menunjukkan bahwa penurunan ekspresi p16 pada KNF dihubungkan dengan usia, penurunan berat badan, dan stadium mempunyai korelasi

signifikan terhadap angka kelangsungan hidup ($p=0,02$). Penurunan ekspresi p16 banyak disebabkan oleh hipermetilasi gen p16 dan bukan mutasi. Hasil penelitian tersebut menunjukkan bahwa tidak terdapat hubungan signifikan ($p=0,77$) perbedaan penurunan ekspresi p16 pada grup WHO tipe 2 dan 3 dengan grup WHO tipe 1. Penelitian lain melaporkan bahwa terdapat korelasi signifikan ($p<0,001$) antara penderita KNF etnis Asia Timur dengan tipe histopatologi WHO tipe 3. Hal tersebut menguatkan hubungan antara KNF dengan etnis dan tipe histopatologi tertentu.¹⁸

Penelitian Attri et al⁹ pada karsinoma duktus pankreas, melaporkan bahwa tidak terdapat hubungan signifikan antara mutasi, delesi, dan hipermetilasi gen p16 dengan usia, stadium, dan diferensiasi histologi ($p>0,05$). Penelitian di Cina pada 23 penderita KNF *non keratinizing squamous cell* didapatkan hubungan signifikan penurunan ekspresi p16 terhadap kejadian metastasis jauh ($p<0,05$). Penurunan ekspresi p16 disebabkan oleh inaktivasi gen p16. Hasil penelitian membuktikan bahwa inaktivasi gen p16 akibat mutasi mempunyai peran penting dalam kejadian metastasis jauh pada KNF dengan tipe histopatologi *non keratinizing squamous cell* sedangkan asosiasi antara mutasi gen p16 dengan tipe histopatologi didapatkan tidak bermakna ($p>0,05$).¹⁵

Penelusuran literatur menunjukkan bahwa mutasi gen p16 memengaruhi diferensiasi sel. Pengaruh mutasi gen p16 pada KNF sudah dimulai sejak masa lesi pra-invasif *low grade*. Infeksi EBV terhadap diferensiasi sel dimulai sejak masa lesi pra-invasif *high grade*. Kombinasi pengaruh mutasi gen p16 dan infeksi EBV semakin meningkatkan diferensiasi sel menuju KNF.⁵ Hal ini dibuktikan oleh penelitian Xiang dan Zhang¹⁵ bahwa mutasi gen p16 banyak didapatkan pada KNF tipe *non keratinizing* yang mempunyai keterkaitan dengan EBV. Pemeriksaan ekspresi p16 diperlukan sebagai

cross check pengaruh mutasi gen p16.

Tidak dilakukan pemeriksaan ekspresi p16 pada kedua sampel dengan mutasi positif. Penurunan ekspresi p16 merupakan manifestasi inaktivasi gen p16 yang salah satunya diakibatkan oleh mutasi. Hasil penelitian ini tidak bisa menunjukkan mutasi gen p16 yang diikuti penurunan ekspresi p16. Dimungkinkan mutasi terjadi tanpa diikuti penurunan ekspresi p16. Hal tersebut menunjukkan terdapat faktor lain (pRb dan cyclin D1) yang dapat menyebabkan proliferasi sel tak terkendali.⁴ Mäkitie et al² mendapati inaktivasi gen p16 dapat menyebabkan penurunan ekspresi p16, namun tidak terdapat hubungan signifikan penurunan ekspresi p16 pada KNF *keratinizing* dan *non keratinizing*.

Penelitian lain menunjukkan bahwa terdapat keterkaitan mutasi gen p16 dengan EBV. Pada karsinoma nasofaring tipe *undifferentiated carcinoma* diketahui hampir 100% infeksi EBV.¹⁹ Virus Epstein-Barr dan produknya semakin meningkatkan pengaruh mutasi gen p16 dalam proses diferensiasi dan proliferasi sel. Transformasi menjadi sel kanker semakin cepat dan proliferasi sel semakin bertambah, sehingga stadium semakin meningkat. Wang et al²⁰ dan Mäkitie et al² menemukan bahwa penurunan ekspresi p16 akibat inaktivasi gen p16 mempunyai hubungan signifikan dengan stadium awal dan lanjut.

Beberapa penelitian telah menunjukkan bahwa mutasi gen p16 mempunyai insidens yang rendah dan banyak didapatkan pada KNF tipe *non keratinizing* terutama *undifferentiated carcinoma*. Hal tersebut disebabkan karena KNF WHO tipe 3 mempunyai keterkaitan sangat erat dengan EBV. Infeksi EBV yang terjadi pada masa anak memicu kejadian mutasi yang sering dan berulang pada beberapa gen sehingga dapat menyebabkan inaktivasi gen, salah satunya adalah gen p16. Faktor lain yang memengaruhi keterkaitan mutasi gen p16 dengan tipe histopatologi

KNF adalah faktor etnis. Sebuah penelitian menunjukkan mutasi gen p16 dengan KNF WHO tipe 3 banyak didapatkan pada etnis Cina.

Kesimpulan pada studi ini, didapati bahwa asosiasi mutasi gen p16 dengan tipe histopatologi KNF WHO tipe 1, 2, dan 3 tidak signifikan. Hal tersebut dapat disebabkan karena insidens mutasi gen p16 pada KNF yang rendah dan faktor etnis. Manfaat klinis dari penelitian ini ialah mutasi gen p16 pada KNF belum dapat dijadikan sebagai indikator penilaian peningkatan proliferasi sel KNF dengan tipe histopatologi WHO tipe 1, 2, dan 3.

DAFTAR PUSTAKA

1. Lee AWC, Li JH, Shi W, Li A, Ng E, Liu TJ, et al. p16 gene therapy: a potentially efficacious modality for nasopharyngeal carcinoma. *Mol Cancer Ther*. 2003; 2:961-9.
2. Mäkitie AA, MacMillan C, Ho J, Shi W, Lee A, O'Sullivan B. Loss of p16 expression has prognostic significance in human nasopharyngeal carcinoma. *Clin Cancer Res*. 2003; 9:2177-84.
3. Osman I, Mercut R, Malin RD, Osman G, Craitoiu S, Comanescu V. Clinical, histological, immunohistochemical and statistical aspects in malignant nasopharyngeal tumors. *Current Health Sci J*. 2012; 38(4):150-8.
4. Agarwal P, Kabir FML, DeInnocentes P, Bird RC. Tumor suppressor gene p16/INK4A/CDKN2A and its role in cell cycle exit, differentiation, and determination of cell fate. In: Cheng Y, ed. *Tumor suppressor gene*. Shanghai: Intech China. 2012; pp. 1-17.
5. Hu C. Genetic and gene expression analysis of nasopharyngeal carcinoma. Dissertation. Birmingham: University of Birmingham Research Archive. University of Birmingham, England. 2010; pp. 22-31.
6. Loewe L. Genetic mutation. *Nature Education*. 2008; 1(1):113-4.

7. Fosbinder RA. Radiation biology. In: Fosbinder RA, Orth D, eds. *Essential of radiologic science*. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins. 2011; pp. 303-20.
8. Baumann M, Krause M, Hill R. Exploring the role of cancer stem cells in radioresistance. *NCBI* 2008; 8:545-53.
9. Attri J, Srinivasan R, Majumdar S, Radotra BD, Wig J. Alterations of tumor suppressor gene p16INK4A in pancreatic ductal carcinoma. *BMC Gastroenterology*. 2005; 5:22-31.
10. Tse LA, Yu ITS, Mang OWK, Wong SL. Incidence rate trends of histological subtypes of nasopharyngeal carcinoma in Hong Kong. *British J Can*. 2006; 95: 1269-73.
11. Lo KW, Huang DP, Lau KM. p16 gene alterations in nasopharyngeal carcinoma. *Cancer Res*. 1995; 55: 2039-43.
12. Ko JY, Lee TC, Hsiao CF, Lin GL, Yen SH, Chen KY, et al. Definition of three minimal deleted regions by comprehensive allelotyping and mutational screening of *h19*, *p16INK4A*, and *p19ARF* genes in nasopharyngeal carcinoma. *Am Cancer*. 2002; 94(7):1987-96.
13. Bruce JP, Yip K, Bratman SV, Ito E, Liu FF. Nasopharyngeal cancer: molecular landscape. *J Clin Oncol*. 2015; 33:1-10.
14. Lo KW, Chung GTY, To KF. Acquired genetic and epigenetic alterations in nasopharyngeal carcinoma. In: Busson P, ed. *Nasopharyngeal carcinoma: Keys translational medicine and biology*. Berlin: Landes Biocscience-Springer Science; 2013. pp. 61-76.
15. Xiang YN, Zhang WY. The clinical significance of p16 protein non expression and p16 gene inactivation by deletions and hypermethylation in nasopharyngeal carcinoma. *Zhonghua Bing Li Xue Za Zhi* 2005; 34(6): 358-61.
16. Bazan V, Zanna I, Migliavacca M, Casla MTS, Maestro ML, Corsale S, et al. Prognostic significance of p16INK4A alterations and 9p21 loss of heterozygosity in locally advanced laryngeal squamous cell carcinoma. *J Cell Physiol*. 2002; 192:286-93.
17. Soto JL, Cabrera CM, Serrano S, Nevöt MAL. Mutation analysis of genes that control G1/S cell cycle in melanoma: *TP53*, *CDKN1A*, *CDKN2A*, and *CDKN2B*. *BMC Cancer*. 2005; 5:36-44.
18. Robinson M, Suh Y, Paleri V, Devlin D, Ayaz B, Pertl L, et al. Oncogenic human papillomavirus-associated nasopharyngeal carcinoma: an observational study of correlation with ethnicity, histological subtype and outcome in a UK population. *Infectious Agents Can*. 2013; 8:30-6.
19. Hutajulu SH, Indrasari SR, Indrawati LPL, Harijadi A, Duin S, Haryana SM, et al. Epigenetic markers for early detection of nasopharyngeal carcinoma in a high risk population. *Molecular Cancer*. 2011; 10:48-56.
20. Hwang CF, Cho CL, Huang CC, Wang JS, Shih YL, Chang HW. Loss of cyclin D1 and p16 expression correlates with local recurrence in nasopharyngeal carcinoma following radiotherapy. *Ann Oncol*. 2002; 13: 1246-51.