



# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

---

---

FACULTAD DE MEDICINA  
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN  
INSTITUTO NACIONAL DE CANCEROLOGÍA  
CURSO DE ESPECIALIDAD EN RADIO-ONCOLOGÍA

**“EXPRESIÓN DE PROTEÍNA LATENTE DE MEMBRANA TIPO 1 (LMP-1)  
EN PACIENTES CON CÁNCER DE NASOFARINGE ”**

## **TESIS**

**PARA OBTENER EL TÍTULO DE:  
ESPECIALISTA EN  
RADIO-ONCOLOGÍA**

**PRESENTA:**

**DR. SAMUEL ROSALES PÉREZ**

**ASESOR: DR. FEDERICO MALDONADO MAGOS**



**MÉXICO DF**

**2010**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

**“EXPRESIÓN DE PROTEÍNA LATENTE DE MEMBRANA TIPO 1 (LMP-1) EN PACIENTES CON  
CÁNCER DE NASOFARINGE”**

**AUTOR**

---

**DR. SAMUEL ROSALES PÉREZ**

**RESIDENTE DE TERCER AÑO DE RADIO-ONCOLOGÍA**

**INSTITUTO NACIONAL DE CANCEROLOGÍA**

**TUTOR**

---

**DR. FEDERICO MALDONADO MAGOS**

**ASESOR DE TESIS Y MÉDICO ADSCRITO AL DEPARTAMENTO DE RADIO-ONCOLOGÍA**

**INSTITUTO NACIONAL DE CANCEROLOGÍA**

---

**DRA. SYLVIA VERÓNICA VILLAVICENCIO VALENCIA**

**SUBDIRECTORA DE EDUCACIÓN MÉDICA**

**INSTITUTO NACIONAL DE CANCEROLOGÍA**

## DEDICATORIA

A יהוה sencillamente por todo

A mis padres que los amo infinitamente

A mi extraordinaria familia (a los que están presentes y en especial a los que no lo están)

A Alejandro (Panchin), Martín y Ernesto con todas mis fuerzas..... ¡gracias!

A mis maestros

A todos y cada una de las personas que me han dado aliciente para no rendirme.

A “mis” pacientes que me recuerdan todos los días lo máspreciado que todo ser humano tiene en la vida: la salud.

## **Agradecimientos**

Dra. Ana María Cano Valdez

*Médico Adscrito al Departamento de Patología ( INCan) por su invaluable ayuda*

Dr. Saúl Lino Silva

*Médico Residente de Patología Oncológica ( INCan)*

Dr y M.C. Oscar Camacho Cerezo

*Médico Adscrito a la Subdirección de Investigación (INCan)*

M.F.M Evangelina Figueroa Medina

*Física Médica Adscrita a la Subdirección de Radioterapia (INCan)*

Y en especial a **Lic. Alejandro Márquez Loyo** por la elaboración de figuras y formato final del manuscrito.

.

### **Abreviaciones**

EBER: Epstein Barr Nuclear Antigen

LMP: Latent Membrane Protein

BART: BamHI A rightward transcripts

EBER: Epstein Barr RNA pequeño

TGF-beta: Factor de crecimiento transformante beta

EGFR: Receptor del factor de crecimiento epidérmico

CTAR1 y CTAR2: Región carboxilo terminal activadora 1 y 2

NFkB: Factor nuclear promotor de células B activadas de cadenas ligeras kappa

TRAF 1,2 y 3: Factor 1, 2 y 3 asociado a receptores de factor de necrosis tumoral

ECOG: Eastern Cooperative Oncology Group

IT: Se hizo el siguiente cálculo: No. de cigarrillos x número de años/20

IMRT: radioterapia de intensidad modulada

## ÍNDICE

RESUMEN	1
MARCO TEÓRICO	2
JUSTIFICACIÓN	10
HIPÓTESIS	10
OBJETIVOS	11
MATERIAL Y MÉTODOS	12
RESULTADOS	17
DISCUSIÓN	22
CONCLUSIÓN	25
BIBLIOGRAFÍA	26
FIGURAS Y TABLAS	30

## **RESUMEN**

El propósito del estudio fue identificar el significado clínico de la expresión de la proteína latente de membrana tipo 1 (LMP-1), p16 y p53 en cáncer de nasofaringe no endémico.

**Métodos:** Se analizó la relación estadística entre la expresión de los marcadores y las variables clinicopatológicas y de supervivencia global en 25 pacientes tratados en el Instituto Nacional de Cancerología de 1998-2008.

**Resultados:** La presencia del virus de Epstein-Barr se demostró en 92% (23/25) de la muestra. LMP-1 se co-expresó en 40% (10/25) de los casos y fue más frecuente en mayores de 50 años (>50 vs <50 años,  $p 0.02$ ) y con invasión al espacio parafaríngeo ( $p 0.02$ ). Se observó mayor respuesta tumoral parcial y completa en pacientes con LMP-1 negativo ( $p 0.06$ ) y la recurrencia a distancia fue más frecuente en estos pacientes ( $p 0.09$ ) aunque sin significancia estadística.

La expresión de p16 fue aparente en 44% (11/25) de la muestra analizada. Los pacientes M1 tuvieron mayor expresión de p16 ( $p 0.03$ ) y la recurrencia a distancia fue más frecuente en este grupo ( $p 0.006$ ).

La proteína p53 se expresó en 40% (10/25) y el tipo histológico con mayor expresión de esta proteína fue la variedad linfoepitelial seguida de la variante epidermoide no queratinizante y epidermoide queratinizante ( $p 0.07$ ). Esta observación sin significancia estadística.

No hubo relación estadísticamente significativa entre la SVG y la expresión de LMP1, P16 y p53.

**Conclusión:** Estos resultados sugieren que la evaluación de LMP-1, p16 y p53 en pacientes con cáncer de nasofaringe no endémico puede identificar a un subgrupo de pacientes con peor pronóstico.

## **MARCO TEORICO**

### **Definición del problema**

El cáncer de nasofaringe (CNF) es una neoplasia con distribución heterogénea en el mundo. En Occidente la incidencia es de 0.1-2.2 casos por 100,000 habitantes. En zonas endémicas del sudeste asiático incluyendo Filipinas, Malasia y Singapur es un problema de salud pública. Esta neoplasia representa el 20% de casos de cáncer en hombres de 22-40 años de edad (18-30 casos por 100,000 habitantes). Más de 2/3 partes de los pacientes tienen enfermedad locoregional y hasta un 90% tienen enfermedad ganglionar al diagnóstico. Aunque el control local se alcanza en 90% de los casos con técnicas modernas de radioterapia un 30% de los pacientes tendrán recaídas locoregionales y otros 30% a distancia. El tratamiento de salvamento representa un verdadero reto <sup>(2,4)</sup>.

### **Antecedentes**

El CNF es una neoplasia con una distribución geográfica y étnica peculiar. Existen zonas endémicas en el sureste asiático con más de 30 casos por 100,000 habitantes al año haciendo de esta neoplasia la primera causa de cáncer en hombres en edad productiva.<sup>(1)</sup> Sin embargo el CNF es una enfermedad rara en la mayoría de los países del mundo con una incidencia de <1 por 100,000 habitantes por año en Estados Unidos de Norteamérica y Canadá (0.2% de todas las causas de cáncer/año).<sup>(2)</sup>

Si bien los casos nuevos reportados de CNF en zonas endémicas han permanecido constantes en los últimos 30 años datos provenientes de la *International Agency for Research of Cancer* muestran que la incidencia de CNF ha disminuido en Hong-Kong parcialmente atribuido a la disminución de ingesta de alimentos altos en nitrosaminas, principalmente en los niños, así como a la mejora del saneamiento y los métodos de preservación de alimentos<sup>(2,3)</sup>.

El CNF es un carcinoma epidermoide que se origina del epitelio de la nasofaringe. Histológicamente es un tejido rico en linfocitos reactivos por lo que los tumores de este subsitio de la faringe tienen un componente linfocitario característico<sup>(4)</sup>. La inflamación y las infecciones son procesos comunes en las vías aéreas superiores por lo que la hiperplasia moderada reversible es un proceso normal en el epitelio nasofaríngeo<sup>(5)</sup>. La Organización Mundial de la Salud (OMS,1978) publicó una clasificación para el CNF basándose en la diferenciación de las células tumorales: CNF tipo I para tumores bien diferenciados queratinizantes (20-25% de CNF en EUA, 2% en zonas endémicas), CNF tipo II para carcinomas no queratinizantes (12% en EUA,3% en zonas endémicas) y CNF tipo III carcinoma indiferenciado antes llamado linfoepitelioma (40-60% en EUA,99% en zonas endémicas). Los tipos II y III de la OMS se consideran en conjunto carcinomas indiferenciados de nasofaringe<sup>(4,6)</sup>.

Aunque las bases moleculares de la patogénesis del CNF no están bien descritas se propone un modelo de múltiples pasos para explicar la transformación irreversible del epitelio nasofaríngeo normal a carcinoma nasofaríngeo<sup>(7)</sup> (ver Fig. 1).

Estudios epidemiológicos sugieren tres principales factores etiológicos en el CNF: susceptibilidad genética, exposición a temprana edad a carcinógenos ambientales (en particular pescado salado en áreas del sureste asiático) e infección latente con el virus de Epstein Barr (EBV).<sup>(2,8,9)</sup>

#### Susceptibilidad genética

La predisposición a CNF entre los habitantes del sudeste asiático (Chinos Cantonese) sugiere una estrecha correlación entre los carcinógenos ambientales y susceptibilidad genética. La alta incidencia de CNF se observa aún en la segunda a tercera generación de inmigrantes chinos a áreas no endémicas<sup>(10,11)</sup>

Se calcula que el 10% de los casos de CNF tienen historia familiar. Se han identificado *locus* de susceptibilidad genética en la región HLA A\*0207 y B\*4601.<sup>(12)</sup> Análisis genómicos cruzados de familias chinas con altas incidencia de CNF han identificado *loci* de susceptibilidad en 4p15.1-q12, 3p21.3 y 5p13-15 entre otros.<sup>(13,14)</sup> Sin embargo estas zonas génicas son tan amplias que la relevancia clínica de estos hallazgos dista de ser significativa en estos momentos.

#### Factores ambientales

Por muchos años el CNF se ha asociado a factores ambientales además de la infección por EBV. El factor de riesgo más sobresaliente en chinos Cantonese es la exposición al pescado salado y otras nitrosaminas volátiles.<sup>(15)</sup> El consumo de pescado salado durante la niñez se relaciona con riesgo elevado de desarrollo de CNF en niños del sudeste asiático.

La exposición a conservas del tipo salmuera, formaldehído y tabaco también se han reportado como factores de riesgo ambiental para CNF. <sup>(16-19)</sup>

### Infección por EBV

El EBV es un  $\gamma$ -herpesvirus que infecta al 90% de la población mundial <sup>(8)</sup>. En la mayoría de los individuos el virus establece una relación con el huésped que no produce manifestaciones sintomáticas o cuadros clínicos específicos. Sin embargo el EBV se asocia a la patogénesis de neoplasias en el hombre entre las que destacan el linfoma de Burkitt, enfermedad de Hodgkin, carcinoma gástrico, carcinoma de glándula parotidea, linfomas post trasplante, linfomas asociados a VIH y CNF <sup>(8)</sup>.

A diferencia de otras neoplasias epidermoides de cabeza y cuello, el CNF tiene una fuerte asociación con la infección por EBV descrita desde la década de los 60 por *zur Hausen* <sup>(20)</sup>.

El aislamiento de clonas de DNA viral en CNF por hibridación *Southern-blot* sugiere que la infección por el EBV ocurre antes que la expansión clonal de células malignas. <sup>(8)</sup> Las lesiones precursoras más tempranas detectadas en pacientes en zonas endémicas (displasia severa/carcinoma in situ) siempre son positivas para EBV <sup>(21)</sup>.

El CNF tipo III de la OMS siempre se relaciona con la infección por este virus independientemente de la distribución geográfica, origen étnico y prevalencia local de la enfermedad. <sup>(8,9)</sup> Los otros dos tipos de CNF están menos asociados al EBV en zonas no endémicas con positividad en 50 al 60% de los casos. <sup>(22,23)</sup> El EBV está presente en cada

célula de los tejidos del CNF al contrario de lo que ocurre en las células normales no neoplásicas circundantes. <sup>(22,24)</sup>

El patrón de expresión génica del EBV se puede clasificar en dos grandes fases, la fase lítica caracterizada por producir grandes cantidades de viriones y la fase de latencia en donde no se producen. Una propiedad biológica característica del virus es la habilidad para transformar linfocitos B resultando en mutaciones celulares permanentes. En la etapa de transformación el virus no se duplica y produce viriones sino que usa la DNAPol en episomas extracromosomales. Esta infección “latente” no es silente y se regula eficientemente por la expresión de múltiples genes virales. <sup>(8)</sup>

La expresión de genes de latencia tipo III incluye seis proteínas EBNA (EBNA1, EBNA2, 3A, 3B, 3C y LP), tres proteínas LMP (LMP-1, 2A y 2B), los transcriptos BART y dos RNA pequeños no codificantes llamados EBER (1 y 2). Estos genes se expresan en células normales y en células tumorales de linfomas post trasplante y linfomas asociados a VIH. <sup>(9,25)</sup>

La latencia tipo I expresa genes de restricción viral EBNA1, EBERs, LMP2A y BARTs y es característico del linfoma de Burkitt, carcinoma gástrico y posiblemente células mononucleares periféricas. La latencia tipo II es la que se presenta en la mayoría de los tumores inducidos por EBV incluyendo CNF, linfoma de Hodgkin, linfomas nasales T/NK y otros linfomas T; incluye EBNA1, EBERs, BARTs, BARF1, LMP-1, LMP-2. <sup>(9,25)</sup>

En el CNF EBNA1 y EBERs son expresados en todos los tumores EBV positivos mientras que la expresión de LMP-1 varía entre 20-60% casos entre grupos étnicos y regiones

geográficas.<sup>(9)</sup> Este hecho contrasta en los linfomas T/NK o Hodgkin los cuales expresan de forma casi invariable la proteína LMP-1.<sup>(26-28)</sup> La expresión de las oncoproteínas virales promueven el crecimiento celular y proveen de ventajas en términos de supervivencia a las células malignas clonogénicas.

#### Proteína latente de membrana tipo 1 (LMP-1)

LMP-1 es el oncogén más importante expresado por EBV. Es una proteína integral de membrana con una estructura molecular compleja, contiene un grupo amino terminal citoplasmico, seis dominios transmembrana y una larga porción carboxilo terminal citoplasmica. Los dominios intra citoplasmicos CTAR1 y CTAR2 activan al NFκB.<sup>(38)</sup>

El dominio proximal de membrana CTAR1 activa vías de señalización intracelular con moléculas de la familia de receptores de necrosis tumoral incluyendo CD40. Estas moléculas llamadas TRAF 1,2 y 3 forman complejos heterodimericos con los receptores NFκB promoviendo el crecimiento celular o la apoptosis. Los dominios transmembrana hidrofóbicos de LMP-1 activan de forma constitutiva a los receptores de la familia de proteínas del factor de necrosis tumoral<sup>(39,40)</sup> (ver Fig. 2).

La expresión de LMP-1 altera el fenotipo de las células linfoides induciendo la expresión de linfocitos B activados por antígeno, moléculas de adhesión, del receptor de transferrina y sensibilidad al TGF-beta.<sup>(29)</sup> LMP-1 inhibe la diferenciación, induce cambios morfológicos y promueve el crecimiento de células epiteliales por medio de la síntesis y expresión de EGFR. La expresión de EGFR es un factor importante en la fisiopatogenia del CNF<sup>(30-32)</sup>.

LMP-1 induce la expresión de CD40 y secreción de IL-6 en células epiteliales. Paralelamente tiene una regulación negativa para la expresión de citoqueratinas y E-caderina<sup>(33,34)</sup> En linfocitos B LMP-1 inhibe la apoptosis mediante la inducción del oncogén bcl-2 y en células epiteliales la inhibición de la apoptosis esta mediada por el p53.<sup>(35-37)</sup>

El objetivo de este estudio es determinar la expresión de LMP-1 en pacientes mexicanos con CNF y realizar una correlación clínico patológica de los resultados.

#### EBER (*Epstein Barr Nuclear Antigen*)

Los transcritos virales no codificados a proteínas más abundantes en las células infectadas por EBV son los EBERs (tipo 1 y 2). Existen aproximadamente  $10^5$  copias de RNA-EBER en cada célula infectada. Los EBERs son característicos de la infección latente y están expresados en prácticamente todas las lesiones asociadas a infección por EBV. Algunos estudios los han asociado al potencial tumorigénico del virus<sup>8</sup>. La determinación de transcritos de EBER en biopsias es el estándar de oro para identificar el virus en lesiones relacionadas con el agente infeccioso<sup>42</sup>.

#### Proteína p16

La molécula p16 (también conocida como inhibidor de ciclina dependiente de quinasa 2A o inhibidor de CDK4/CDKN2A) es una proteína supresora de tumores codificada por el gen CDKN2A y juega un papel importante en la regulación del ciclo celular. Las mutaciones de este gen se han asociado al desarrollo de un sinnúmero de variedades de neoplasias entre

las que destacan melanoma, adenocarcinoma de páncreas; cáncer de esófago y estómago.

En neoplasias epidermoides también se encuentra mutado<sup>43,44</sup>.

### Proteína p53

La proteína p53 es codificada por el gen supresor de tumores TP53. Su función en la regulación del ciclo celular está más que bien descrita y se le considera el “guardián del genoma”. Las mutaciones del gen p53 se relacionan con inestabilidad celular y múltiples variedades de cáncer en humanos y otros mamíferos, así como en anfibios y especies marinas tiene mutaciones de este gen<sup>45</sup>.

## **JUSTIFICACIÓN**

El CNF es una neoplasia altamente prevalente en algunas zonas geográficas del planeta y grupos étnicos. México es considerado zona de baja incidencia de CNF (CNF no endémico).

Los tumores de nasofaringe están relacionados con la infección por el EBV. LMP-1 es una oncoproteína esencial en la fisiopatogenia de tumores asociados al virus.

Determinar la expresión de LMP-1 puede ser un factor relevante en el pronóstico de la enfermedad y probable blanco terapéutico en pacientes con CNF.

## **HIPÓTESIS**

El EBV es necesario para la tumorigénesis en pacientes con CNF

- 1) Los pacientes con tumores de nasofaringe expresaran la proteína LMP-1
- 2) La presencia de EBV, inferida por la determinación de EBERs, será altamente prevalente en este grupo de pacientes
- 3) La expresión de la proteína LMP-1 en pacientes con CNF se correlacionará con menor control locoregional (CLR) y sobrevida global (SVG).

## **OBJETIVOS**

- **General y específicos**

### PRIMARIOS

1. Conocer la expresión de EBERs (presencia del EBV) en pacientes con CNF no endémico.
2. Determinar la expresión de LMP-1, p16 y p53.
3. Conocer si la expresión de LMP-1, p16 y p53 tiene impacto en variables clínicas, CLR y SVG.

### SECUNDARIOS

1. Determinar las diferencias en los pacientes con CNF según tipo histológico, estadio clínico, T, N, M, infiltración al espacio parafaríngeo, dosis total y tiempo de proyección de RT, tipo y contemporización de QT.

## **MATERIAL Y METODOS**

### **Tipo de estudio**

Análisis retrospectivo

### **Universo de estudio**

\*Población

Criterios de inclusión

Hombres y mujeres con diagnóstico de CNF tipo I, II y III de la OMS tratados en el Instituto Nacional de Cancerología de México (INCan) que cuenten al menos con: expediente completo, reporte histopatológico, bloques de parafina disponibles para inmunohistoquímica (IHQ) e hibridación *in situ*, tratamiento con QT y/o RT y seguimiento de 18 meses o más.

Criterios de exclusión

Pacientes con expedientes incompletos, CNF no epidermoide, sin reporte histopatológico, sin bloques de parafina para evaluación histológica y con tratamiento otorgado fuera del INCan.

### **Periodo de estudio**

1998-2008 con seguimiento de 18 meses o más. El estadio clínico (EC) se determinó según el TNM de la clasificación de la *American Joint Committee on Cancer (AJCC, 5th & 6th edition)* con estudios de extensión a criterio del oncólogo tratante. A todos los pacientes

se les realizó biopsia de nasofaringe guiada por nasofibrolaringoscopia o en su defecto biopsia de adenopatías de región cervical. Se recolectaron los siguientes datos de los expedientes a todos los pacientes: registro, iniciales, edad, estado funcional (ECOG),<sup>(41)</sup> sexo, lugar de origen, fecha de diagnóstico, índice tabáquico (IT), consumo de alcohol como variable dicotómica, histología del tumor, TNM y EC, infiltración al espacio parafaríngeo, tipo, número de ciclos y temporización de QT, cirugía de consolidación, dosis total, temporización y protracción de RT, fecha de recurrencia (local/locoregional/distancia), fecha de defunción y/o última fecha de nota en expediente clínico. Además se consignó del reporte histopatológico del expediente la clave de registro de la muestra enviada a Patología para su revisión.

Los pacientes fueron tratados según los lineamientos generales del INCan y a criterio del médico tratante. Las opciones terapéuticas fueron: QT de inducción, QT/RTc definitiva, QT adyuvante, RT radical y cirugía de consolidación.

#### **Método de determinación y evaluación de LMP-1, p16, p53 y EBER's**

Se realizó determinación de la expresión de LMP-1, p16 y p53 por IHQ en el Departamento de Patología del INCan. La hibridación *in situ* para EBER's se efectuó en el Departamento de Patología del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán (INCMNSZ).

Inmunohistoquímica de LMP-1, p16 y p53

Después de la desparafinización y rehidratación de los bloques de parafina, las secciones de tejido fueron procesadas según las instrucciones del fabricante en el Benchmark ULTRA (Ventana Medial Systems Tucson, AZ). Los anticuerpos monoclonales de ratón usados fueron: p16 (dilución 1:500, *Mouse Antibody by Cell Marque Corp, USA*), p53 (dilución 1:300, *Mouse Antibody anti-p53 by BioGenex Ca, USA*) y LMP-1 (dilución 1:300, *Mouse Antibody Clone CS1-4 by BioScience SB Inc, USA*).

Se visualizaron los tejidos teñidos usando diaminobencidina y se contratiñeron las muestras con hematoxilina. Como controles negativos se compararon las inmunotinciones con testigos de tejido no teñidos.

#### Hibridación *in situ* de EBER's

La determinación de EBER se realizó por hibridación *in situ*. Los bloques de parafina fueron desparafinados y rehidratados con etanol a diferentes grados, tratados con 0.2M de HCl por 20 minutos, digeridos con 0.5 mg/ml de pronasa por 10 minutos, fijados en frío con paraformaldehído al 4% por 20 minutos y acetilados con acético anhídrido de trietanolamina 0.1M (pH 8.0) por 10 minutos. Después el tejido fue deshidratado con etanol a diferentes grados y aire seco. Aproximadamente 50 µl de mezcla de hibridación (50% formamida deionizada/10% sulfato dextran/ 2x de citrato salino estándar[SSC]/0.2 mg/ml RNAt de levadura/10 mM ditioneitol[DTT]) incluyendo  $1 \times 10^5$  cpm de sonda marcada fue aplicada a cada sección de muestra. Después de la hibridación durante 12 horas a 50°C, las muestras fueron lavadas en solución al 50% de formamida/1xSSC/10 mM DTT a 52°C por 4 horas. Para remover las moléculas no deseadas adheridas a la sonda, el

tejido se expuso a digestión de RNase A (Sigma, Steinheim, Germany; 20µg/ml, 30 min a 37°C). Por últimos las muestras fueron enjuagadas en 2x SSC y 0.1x SCC, deshidratadas con etanol de diferentes grados y embebidas en emulsión Ilford G5 (Ilford, Mobberley, UK).

#### Interpretación de las tinciones

Después de la IHQ las áreas representativas de cada muestra de tejido fueron analizadas por patólogos en cada centro hospitalario según la tinción a determinar con microscopía de luz de bajo y alto poder (100-250x). Siempre que la cantidad de tejido lo permitiese se analizaron al menos 2 campos separados para su comparación; cada campo correspondió a un área de 1mm<sup>2</sup>. Se tomaron fotografías digitales de todas las muestras para su mejor interpretación.

La positividad/negatividad de todas las inmunotinciones fueron consignadas como variable dicotómica. Las figuras 3-6 muestran el patrón de inmunoreactividad típico de cada marcador.

## **ANALISIS ESTADISTICO**

Para las variables cuantitativas y cualitativas (nominal y ordinal), se utilizó estadística descriptiva, con medidas de tendencia central/dispersión y porcentajes/rangos, respectivamente.

Para evaluar la relación y asociación de las variables más importantes del estudio, se utilizó  $\chi^2$  o prueba exacta de Fisher (cuando aplicara) para variables categóricas, prueba "t" de Student para cuantitativas. La evaluación de supervivencia tomó en cuenta el análisis de Kaplan-Meier, analizando con la prueba de Logrank y se tuvo como nivel de significancia  $p < 0.05$ , calculando la supervivencia general (fin de tratamiento con quimioterapia y/o radioterapia hasta el evento [muerte]) y la supervivencia libre de recurrencia (fin de tratamiento hasta recurrencia). Se obtuvieron curvas de supervivencia general y aquellas estratificadas con las variables de relevancia clínica y pronóstica. Para las pruebas se utilizó el *IBM® SPSS® Statistics V.17*

## **RESULTADOS**

### **Características y evaluación de los pacientes**

Veintinueve pacientes con tumores de nasofaringe tipo I (14%), II y III (86%) de la OMS tratados en el INCan de 1998-2008 con bloques de parafina disponibles para su estudio fueron incluidos. De los 29 seleccionados solo en 25 se disponía de material histológico suficiente para la IHQ/FISH y fueron analizados. Todos los datos clínicos y del tratamiento fueron obtenidos retrospectivamente del expediente físico y/o electrónico. Se localizó por medio de llamada telefónica a los pacientes “perdidos con o sin enfermedad” para conocer su estado actual. A todos los pacientes se les siguió por un mínimo de 18 meses a partir del fin del tratamiento oncológico (RT o QT). La edad media de la población fue de 50 (rango 22-72) años. 69% fueron hombres y 31% mujeres. El estado funcional (ECOG) fue 0-1 en 90% de los casos. Se consideró fumadores a aquellos individuos con un índice tabáquico  $\geq 10$  (12%). Debido a la ambigüedad de la definición de alcoholismo se consignó como bebedor a todo paciente con ingesta de bebidas embriagantes de manera regular y reiterada por un mínimo de 6 meses (34%). El EC de presentación fue predominantemente localmente-avanzado (97%), solo 2 pacientes (7%) tenían enfermedad metastásica al diagnóstico. 48% individuos tenían invasión al espacio parafaríngeo en la valoración inicial.

En lo que respecta al tratamiento 22 pacientes (76%) recibieron QT en cualquiera de sus modalidades. El fármaco más usado fue el CDDP (55%) seguido de la combinación de este con 5-FU (41%), 88% recibió 2-3 ciclos de QT. 27 pacientes (93%) recibieron RT externa,

60% concomitante con la QT y 40% como monoterapia + QT adyuvante (44%). El 77% recibió 60-70Gy con prostración media de 60 (29-135) días en unidades de cobalto-60 o aceleradores lineales (4-12 MeV), el arreglo de campos quedo a cargo del radiooncólogo tratante. Dos pacientes fueron sometidos a disección de cuello por enfermedad persistente al fin de la QT/RT. La tabla 1 presenta las características demográficas, clínicas y estado de los pacientes en el momento del análisis.

La respuesta al tratamiento se evaluó de 6-8 semanas del fin de la RT o QT y después cada 3-4 meses por los dos primeros años y cada 6 meses hasta los 5 años. Posteriormente el seguimiento fue individualizado a criterios del médico tratante.

La falla al tratamiento fue determinada por el examen físico, tomografía computada o resonancia magnética y fibrolaringoscopia con toma de biopsia en su caso particular. La confirmación histológica de recurrencia o persistencia no fue indispensable.

### **Respuesta tumoral al tratamiento**

No hubo diferencias estadísticamente significativas entre la respuesta al tratamiento y la edad, sexo, invasión al espacio parafaríngeo, el estadio TNM y tipo histológico.

Para fines de comparación estadística se recategorizaron algunas variables; la edad (>50 vs <50 años), el estadio T (T1-2 vs T3-4), N (N0 vs N+) y tipo histológico (epidermoides vs linfoepitelial) no demostraron diferencias en respuesta tumoral entre los pacientes.

La respuesta tumoral a la radioterapia no se correlacionó con el tiempo de protracción (>56 vs <56 días) o la dosis total administrada (>70 vs <70 Gy). La respuesta tampoco fue diferente según el fármaco o tipo de QT utilizado y el número de ciclos administrados.

### **Sobrevivida global**

Para fines de comparación estadística se recategorizaron a los pacientes en dos grupos: vivos + perdidos (con o sin enfermedad) y muertos.

Los pacientes varones murieron más que las mujeres ( $p$  0.03). La muerte fue más frecuente en aquellos con variedad linfocelular ( $p$  0.05); explorando más esta variable y con fines estadísticos y de comparación se recategorizaron las variables (histologías epidermoides vs linfocelular) encontrando la misma relación ( $p$  0.05).

No se encontraron diferencias en SVG y edad, estadio TNM, invasión al espacio parafaríngeo, dosis de radioterapia (>70 vs <70 Gy), protracción (>56 vs <56 días), fármaco de QT utilizado o número de ciclos.

La única variable que demostró impacto significativo en SVG fue la RT/QT concomitante vs otras modalidades terapéuticas ( $p$  =0.001, ver fig. 9).

### **Inmunohistoquímica**

La tabla 2 presenta la inmunoreactividad de las muestras en la población de estudio (N=25).

## **LMP-1**

La expresión de LMP-1 fue aparente en 40% (10/25) de los casos y fue observada en la membrana y citoplasma de la células. LMP-1 fue más frecuente en pacientes mayores de 50 años (>50 vs <50 años,  $p 0.02$ ) y con invasión al espacio parafaríngeo ( $p 0.02$ ).

No hubo correlación entre la expresión de LMP-1 y el sexo, tipo histológico o el estadio TNM.

La respuesta tumoral completa y parcial se presentó más en pacientes con LMP-1 negativo ( $p 0.06$ , ver fig 7). La recurrencia a distancia fue más frecuente en aquellos con expresión de LMP-1 ( $p 0.09$ , ver fig 8).

La SVG (pacientes vivos con o sin enfermedad vs muertos) no se correlacionó con la expresión de la proteína ( $p 0.52$ ).

## **p16**

La expresión de p16 fue aparente en 44% (11/25) de los pacientes. Los pacientes M1 tuvieron mayor expresión de p16 ( $p 0.03$ ). La recurrencia a distancia también fue más frecuente en este grupo de pacientes ( $p 0.006$ ).

No hubo diferencias en edad, tipo histológico, estadio TN, invasión al espacio parafaríngeo, respuesta al tratamiento y recurrencia local-regional.

La SVG (pacientes vivos con o sin enfermedad vs muertos) no se correlacionó con la expresión de la proteína ( $p$  0.93).

### **p53**

La proteína p53 se expresó en 40% (10/25) de los casos. El tipo histológico con mayor expresión de p53 fue el linfoepitelial seguido del epidermoide no queratinizante y epidermoide queratinizante ( $p$  0.07).

No hubo diferencias de expresión de p53 por estadio TNM, invasión al espacio parafaríngeo, respuesta tumoral al tratamiento, recurrencia loco-regional o a distancia.

La SVG (pacientes vivos con o sin enfermedad vs muertos) no se correlacionó con la expresión de la proteína ( $p$  0.52).

### **EBER**

Se demostró RNA-t de EBV en 92% (23/25) de los casos analizados. 100% de los pacientes que expresaron LMP-1 fueron positivos a EBER y 40% (10/25) de los EBER positivos lo fueron también para LMP-1.

## **DISCUSION**

La radioterapia es el estándar de tratamiento en pacientes con CNF. A pesar de las nuevas técnicas como la IMRT que proporciona control local en 90% de los pacientes hasta 1/3 parte de estos tendrán recaídas locales y otro tercio a distancia<sup>46</sup>.

La estrecha relación entre el CNF y la infección por EBV y el descubrimiento de LMP-1 como el principal oncogén expresado por el virus obliga a buscar blancos moleculares dirigidos a esta proteína. LMP-1 contribuye al desarrollo del CNF por múltiples vías incluyendo la proliferación celular, inhibiendo la apoptosis y promoviendo la migración, invasión y angiogénesis de los tumores.

La expresión de p16 y p53, dos proteínas con factor pronóstico adverso encontradas en un sinnúmero de neoplasias está bien descrito en la literatura.

En este estudio identificamos la expresión de 4 biomarcadores en un grupo de pacientes con CNF no endémico. LMP-1 es una proteína de membrana codificada por el EBV con 3 dominios transmembrana (CTAR 1-3) que pueden activar una variedad de vías de señalización intracelular provocando la regulación positiva de proteínas antiapoptóticas (BCL-2 y A20 principalmente), receptores de superficie (EGFR y c-Met), proteínas reguladoras del ciclo celular (cdc2 y ciclina-B1) y metaloproteinasas (ver fig. 1). LMP-1 juega un papel importante en la proliferación, diferenciación, supervivencia y comportamiento metastásico de las células tumorales<sup>47-52</sup>.

La expresión de LMP-1 en CNF varía según la zona geográfica sustancialmente y es menos prevalente en pacientes blancos (29-56%) que en Oriente (chinos cantoneses 50-86%)<sup>53</sup>. La expresión de LMP-1 en este estudio fue del 40% con tumores tipo II y III de la OMS en su mayoría (86%). La inmunoreactividad a EBER's (92%) confirma la estrecha relación de este virus con el CNF y la variabilidad de la presencia de LMP-1.

LMP-1 fue más frecuentemente expresado en pacientes >50 años ( $p$  0.02) y en aquellos con invasión al espacio parafaríngeo ( $p$  0.02) un factor adverso bien reconocido en esta neoplasia<sup>54</sup>. La respuesta tumoral completa y parcial se presentó más en pacientes con LMP-1 negativo ( $p$  0.06). La recurrencia a distancia fue más frecuente en aquellos con expresión de LMP-1 ( $p$  0.09). Aunque ambas observaciones no alcanzaron significancia estadística si muestran una tendencia que debería explorarse con un mayor tamaño de muestra o en estudio con diseño prospectivo. No identificamos otra relación entre la expresión de LMP-1 y las variables estudiadas.

Cabe destacar además los hallazgos encontrados en relación a la SVG. Aunque ningún marcador estudiado parece estar relacionado con esta variable, los pacientes varones ( $p$  0.03) y aquellos individuos con tumores linfopiteliales ( $p$  0.05) tienen mayores probabilidades de morir por CNF en comparación con mujeres e histologías epidermoides respectivamente.

Este estudio además confirma la utilidad de la radioterapia/quimioterapia concomitante en el tratamiento de los pacientes con CNF localmente avanzado descrita por Al-Sarraf<sup>55</sup>.

La única variable modificable que demostró impacto significativo en SVG fue la terapia combinada vs otras modalidades terapéuticas ( $p = 0.001$ ).

No menos importante son también los hallazgos descritos en relación a los otros marcadores estudiados. Los pacientes M1 tuvieron mayor expresión de p16 ( $p 0.03$ ) y la recurrencia a distancia también fue más frecuente en este grupo de pacientes ( $p 0.006$ ).

La expresión de p53 fue más prevalente en histologías linfopiteliales que epidermoides ( $p 0.07$ ) y no encontramos relación directa entre la expresión de LMP-1 y los tumores de la OMS tipo III, algo verdaderamente contrastante según la literatura sobre el tema.

## **CONCLUSIÓN**

Los resultados de este estudio indican que LMP-1 puede jugar un papel importante en la oncogénesis o invasividad de los pacientes con CNF no endémico. Los ensayos *in vivo* han demostrado que las vacunas contra los epítopes derivados de LMP-1 pueden revertir el crecimiento de tumores LMP-1 (+) en ratones<sup>56</sup>, lo que sugiere el potencial de LMP-1 como blanco inmunoterapéutico o molecular en el tratamiento de CNF asociado a infección por EBV.

## **BIBLIOGRAFIA**

1. Vokes EE, Liebowitz DN et al. ***Nasopharyngeal carcinoma***. Lancet. 1997 Oct 11;350 (9084): 1087-91
2. Yu MC, Yuan JM. ***Epidemiology of nasopharyngeal carcinoma***. Semin Cancer Biol. 2002 Dec; 12(6):421-9
3. Lee AW, Foo W et al. ***Changing epidemiology of nasopharyngeal carcinoma in Hong Kong over a 20-year period (1980-99): an encouraging reduction in both incidence and mortality***. Int J Cancer. 2003 Feb 20;103(5):680-5
4. Tao Q, Chan AT. ***Nasopharyngeal carcinoma: molecular pathogenesis and therapeutic developments***. Expert Rev Mol Med. 2007 May 4;9(12):1-24
5. Sham JS, Wei WI. ***Detection of subclinical nasopharyngeal carcinoma by fiberoptic endoscopy and multiple biopsy***. Lancet. 1990 Feb 17;335(8686):371-4
6. Wei WI, Sham JS. ***Nasopharyngeal carcinoma***. Lancet. 2005 Jun 11-17;365(9476):2041-54. Review
7. Lo KW, To KF et al. ***Focus on nasopharyngeal carcinoma***. Cancer Cell. 2004 May;5(5):423-8
8. Raab-Traub N. ***Epstein-Barr virus in the pathogenesis of NPC***. Semin Cancer Biol. 2002 Dec; 12 (6):431-41
9. Tao Q, Young LS et al. ***EBV and its associated human cancers genetics, epigenetics, pathobiology and novel therapeutics***. Front Biosci. 2006 Sep 1; 11:2672-713
10. Jia WH, Feng BJ et al. ***Familial risk and clustering of nasopharyngeal carcinoma in Guangdong, China***. Cancer. 2002 Jul 15; 101 (2): 363-9
11. Zeng YX, Jia WH. ***Familial nasopharyngeal carcinoma***. Semin Cancer Biol. 2002 Dec; 12 (6):443-50
12. Hildesheim A, Apple RJ et al. ***Association of HLA class I and II alleles and extended haplotypes with nasopharyngeal carcinoma in Taiwan***. J Natl Cancer Inst. 2002 Dec 4; 94 (23):1780-9
13. Feng BJ, Huang W et al. ***Genome-wide scan for familial nasopharyngeal carcinoma reveals evidence of linkage to chromosome 4***. Nat Genet 2002 Aug; 31(4):395-9
14. Xiong W, Zeng ZY et al. ***A susceptibility locus at chromosome 3p21 linked to familial nasopharyngeal carcinoma***. Cancer Res. 2004 Mar 15;64(6):1972-4
15. Mirvish SS. ***Role of N-nitroso compounds (NOC) and N-nitrosation in etiology of gastric, esophageal, nasopharyngeal and bladder cancer and contribution to cancer of known exposure to NOC***. Cancer Lett. 1995 Jun 29;93(1):17-48
16. Huang DP, Ho JH et al. ***Carcinoma of the nasal and paranasal regions in rats fed Cantonese salted marine fish***. IARC Sci Publ. 1978(20):315-328
17. Gallicchio L, Matanoski G et al. ***Adulthood consumption of preserved and nonpreserved vegetables and the risk of nasopharyngeal carcinoma: a systematic review***. Int J Cancer 2006 Sep 1;119 (5):1125-35

18. Armstrong RW, Imrey PB et al. ***Nasopharyngeal carcinoma in Malaysian Chinese: occupational exposures to particles, formaldehyde and heat.*** Int J Epidemiol. 2000 Dec; 29(6):991-8
19. Hildesheim A, Dosemeci M et al. ***Occupational exposure to wood, formaldehyde, and solvents and risk of nasopharyngeal carcinoma.*** Cancer Epidemiol Biomarkers Prev. 2001 Nov; 10(11):1145-53
20. Zur Hausen H, Schulte-Holthausen H et al. ***EBV DNA in biopsies of Burkitt tumors and anaplastic carcinomas of the nasopharynx.*** Nature. 1970 Dec 12; 228(5276):1056-8
21. Pathmanathan R, Prasad U et al. ***Clonal proliferations of cells infected with Epstein-Barr virus in preinvasive lesions related to nasopharyngeal carcinoma.*** N Engl J Med. 1995 Sep 14;333(11):693-8
22. Nicholls JM, Agathangelou A et al. ***The association of squamous cell carcinomas of the nasopharynx with Epstein-Barr virus shows geographical variation reminiscent of Burkitt's lymphoma.*** J Pathol. 1997 Oct; 183 (2):164-8
23. Pathmanathan R, Prasad U et al. ***Undifferentiated, nonkeratinizing, and squamous cell carcinoma of the nasopharynx. Variants of EBV infected neoplasia.*** Am J Pathol. 1995 Jun; 146(6):1355-67
24. Sam CK, Brooks LA et al. ***Analysis of EBV infection in nasopharyngeal biopsies from a group at high risk of nasopharyngeal carcinoma.*** Int J Cancer. 1993 Apr 1;53(6):957-62
25. Young LS, Rickinson AB. ***Epstein-Barr virus: 40 years on.*** Nat Rev Cancer. 2004 Oct; 4(10): 757-68
26. Murray PG, Constandinou CM et al. ***Analysis of major histocompatibility complex class I, TAP expression and LMP2 epitope sequence in EBV positive Hodgkin's disease.*** Blood 1998 Oct 1;92(7):2477-83
27. Tao Q, Ho FC et al. ***EBV is localized in the tumour cells of nasal lymphomas of NK, T or B cell type.*** Int J Cancer. 1995 Jan 27;60(3):315-20
28. Chiang AK, Chan AC et al. ***Nasal T/NK cell lymphomas are derived from EBV infected cytotoxic lymphocytes of both NK and T cell lineage.*** Int J Cancer 1997 Nov 4;73(3):322-8
29. Mosialos G, Birkenbach M et al. ***The Epstein-Barr virus transforming protein LMP1 engages signaling proteins for the tumor necrosis factor receptor family.*** Cell. 1995 Feb 10;80(3):389-99
30. Fahraeus R, Rymo L. ***Morphological transformation of human keratinocytes expressing the LMP gene of Epstein-Barr virus.*** Nature. 1990 May 31;345(6274):447-9
31. Dawson CW, Rickinson AB et al. ***Epstein-Barr virus latent membrane protein inhibits human epithelial cell differentiation.*** Nature. 1990 Apr 19;344(6268):777-80
32. Miller WE, Earp HS et al. ***The Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 induces expression of the epidermal growth factor receptor.*** J Virol. 1995 Jul;69(7):4390-8.
33. Fahraeus R, Chen W et al. ***Decreased expression of E-cadherin and increased invasive capacity in EBV-LMP-transfected human epithelial and murine adenocarcinoma cells.*** Int J Cancer. 1992 Nov 11;52(5):834-8

34. Eliopoulos AG, Stack M et al. ***Epstein-Barr virus-encoded LMP1 and CD40 mediate IL-6 production in epithelial cells via an NF-kappaB pathway involving TNF receptor-associated factors.*** *Oncogene*. 1997 Jun 19;14(24):2899-916
35. Fries KL, Miller WE et al. ***Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 blocks p53-mediated apoptosis through the induction of the A20 gene.*** *J Virol*. 1996 Dec;70(12):8653-9.
36. Okan I, Wang Y et al. ***The EBV-encoded LMP1 protein inhibits p53-triggered apoptosis but not growth arrest.*** *Oncogene*. 1995 Sep 21;11(6):1027-31.
37. Effert P, McCoy R et al. ***Alterations of the p53 gene in nasopharyngeal carcinoma.*** *J Virol*. 1992 Jun;66(6):3768-75.
38. Huen DS, Henderson SA et al. ***The Epstein-Barr virus latent membrane protein-1 (LMP1) mediates activation of NF-kappa B and cell surface phenotype via two effector regions in its carboxy-terminal cytoplasmic domain.*** *Oncogene*. 1995 Feb 2;10(3):549-60.
39. Mosialos G, Birkenbach M et al. ***The Epstein-Barr virus transforming protein LMP1 engages signaling proteins for the tumor necrosis factor receptor family.*** *Cell*. 1995 Feb 10;80(3):389-99.
40. Izumi KM, Kieff ED. ***The Epstein-Barr virus oncogene product latent membrane protein 1 engages the tumor necrosis factor receptor-associated death domain protein to mediate B lymphocyte growth transformation and activate NF-kappaB.*** *Proc Natl Acad Sci*. 1997 Nov 11;94(23):12592-7.
41. Oken MM, Creech RH et al. ***Toxicity And Response Criteria Of The Eastern Cooperative Oncology Group.*** *Am J Clin Oncol* 5:649-655, 1982.
42. Gulley ML, Tang W. ***Laboratory assays for EBV related diseases.*** *J Mol Diagn* 10 (4):279-92, 2008.
43. Rocco JW, Sidransky D. ***p16(MTS-1/CDKN2/INK4a) in cancer progression.*** *Exp Cell Res*. 264 (1):42-55, 2001
44. Liggett WH, Sidransky D. ***Role of the p16 tumor suppressor gene in cancer.*** *J Clin Oncol* 16 (3):1197-206, 1998
45. Farnebo M, Bykov VJ et al. ***The p53 tumor suppressor: a master regulator of diverse cellular processes and therapeutic target in cancer.*** *Biochem Biophys Res Commun*. 2010 May 21;396(1):85-9
46. Hansen EK, Roach M. ***Handbook of Evidence-Based Radiation Oncology.*** 2<sup>nd</sup> edition. 2010. pp 99-108. Springer
47. Henderson S, Rowe M et al. ***Induction of bcl-2 expression by Epstein Barr virus latent membrane protein 1 protects infected B cells from programmed cell death.*** *Cell*. 1991; 65:1107-1115
48. Miller WE, Mosialos G et al. ***EBV LMP-1 induction of the epidermal growth factor receptor is mediated through a TRAF signaling pathway distinct from NF-kappaB activation.*** *J Virol* 1997; 71:586-594
49. Horikawa T, Sheen TS et al. ***Induction of c-Met proto-oncogene by EBV latent membrane protein-1 and the correlation with cervical lymph node metastasis of nasopharyngeal carcinoma.*** *Am J Pathol* 2001; 159:27-33

50. Liu B, Chen XY et al. ***Effect of EB virus latent membrane protein 1 on mitosis control of nasopharyngeal carcinoma cell line CNE1.*** Ai Zheng 2004;23:512-516
51. Deng L, Yang J et al. ***Cells in G2/M phase increased in human nasopharyngeal carcinoma cell line by EBV-LMP1 through activation of NF-kappaB and AP-1.*** Cell res 2003;13:187-194
52. Horikawa T, Yoshizaki T et al. ***Association of LMP-1 and matrix metalloproteinase 9 with metastasis in nasopharyngeal carcinoma carcinoma.*** Cancer 2000; 89:715-723
53. D`Addario, Chauvin P. ***Ethnic differences in the expression of Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 mutations in nasopharyngeal carcinoma.*** Mutat Res 2000;457:69-78
54. Cox James D, Kian Kie. ***Radiation Oncology: Rationale, Technique, Results.*** 9<sup>th</sup> edition. Elsevier, 2010
55. Al-Sarraf M, LeBlanc M et al. ***Chemoradiotherapy versus radiotherapy in patients with advanced nasopharyngeal cancer: phase III randomized Intergroup study 0099.*** J Clin Oncol 1998; 16:1310-17
56. Duraiswamy J, Sherritt M et al. ***Therapeutic LMP1 polyepitope vaccine for EBV-associated Hodgkin disease and nasopharyngeal carcinoma.*** Blood 2003; 101:3150–3156

## ANEXOS

### FIGURAS Y TABLAS

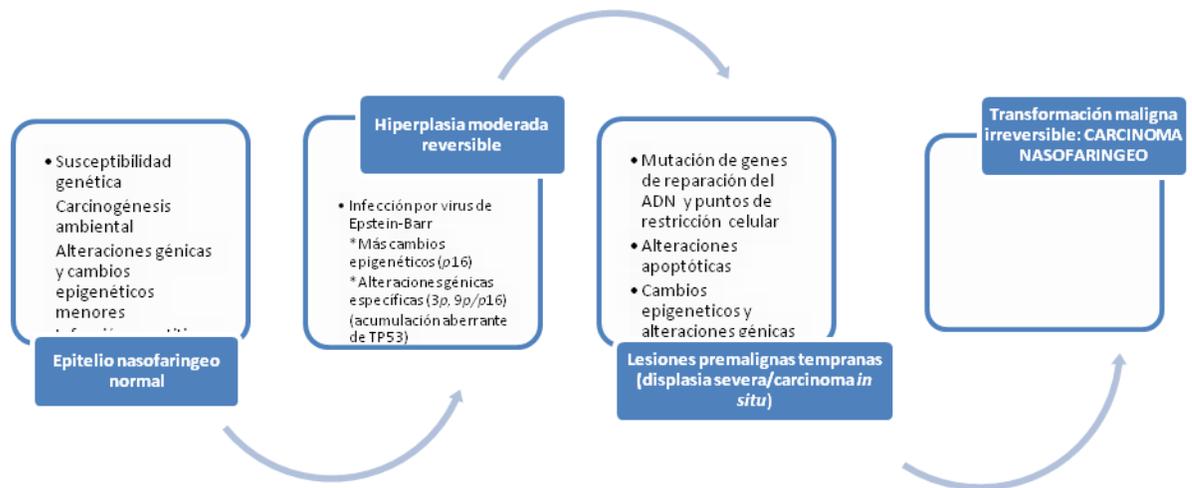


Fig. 1 Posible modelo de la patogénesis del carcinoma nasofaríngeo

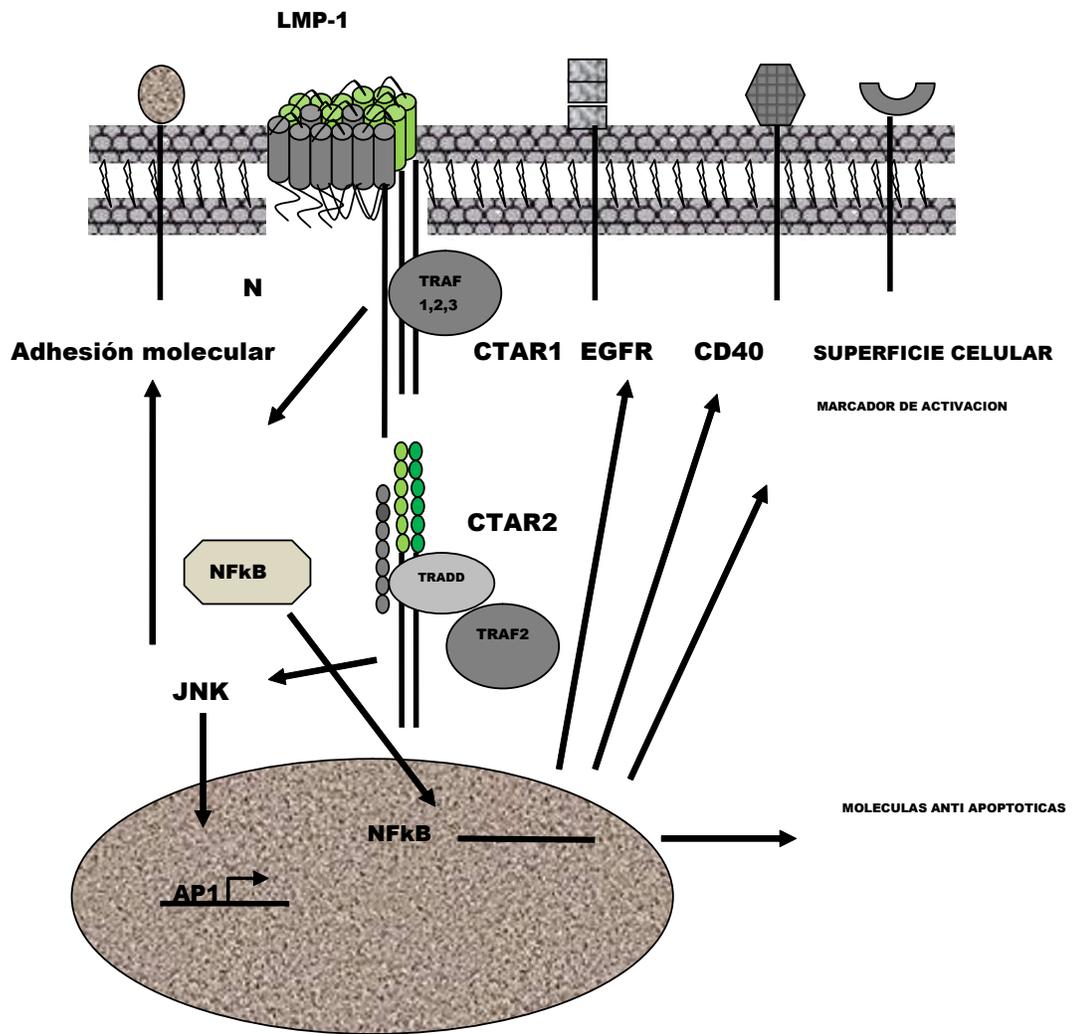


Fig. 2 Activación de vías de señalización intracelular por LMP-1

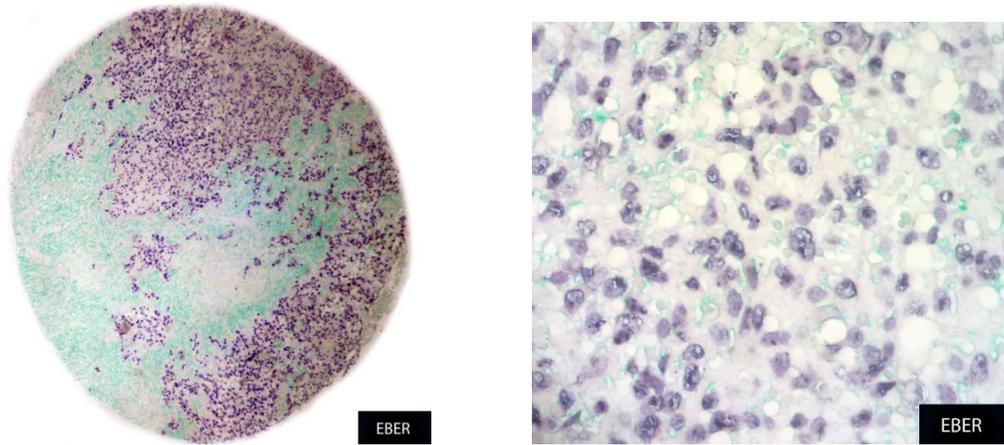


Fig. 3 Inmunotinción de EBER: microscopía de luz de bajo y alto poder

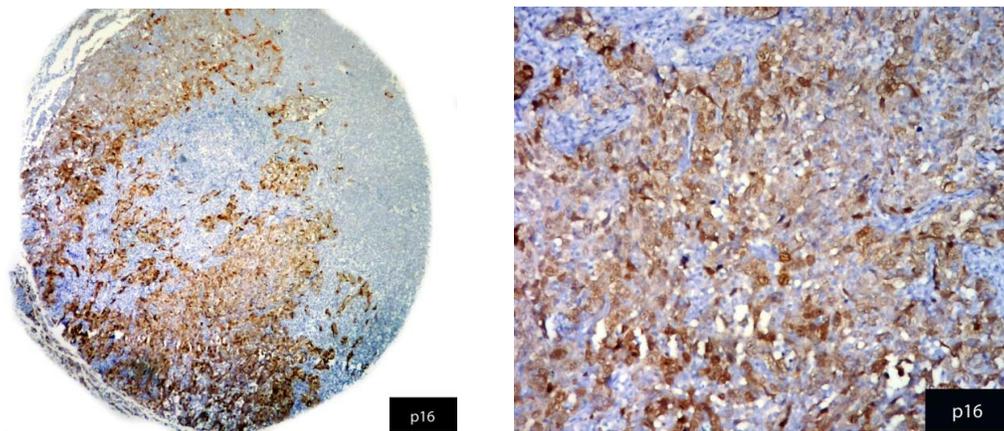


Fig. 4 IHQ para p16: microscopía de luz de bajo y alto poder

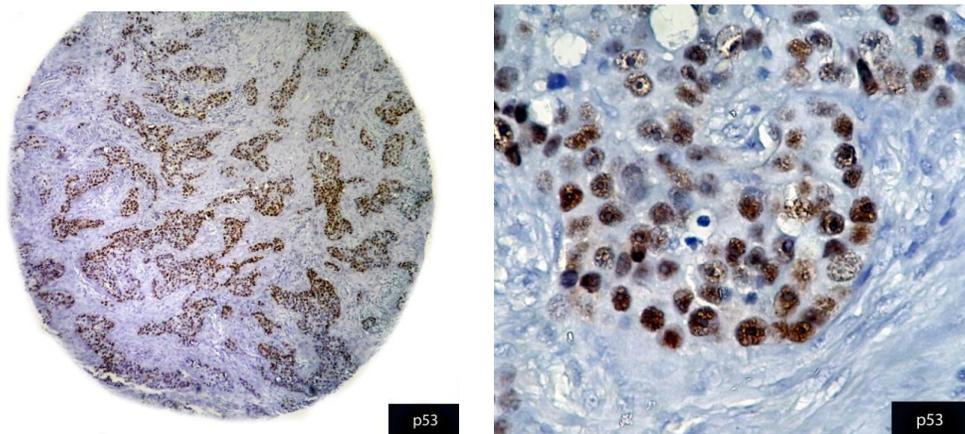


Fig. 5 IHQ para p53: microscopía de luz de bajo y alto poder

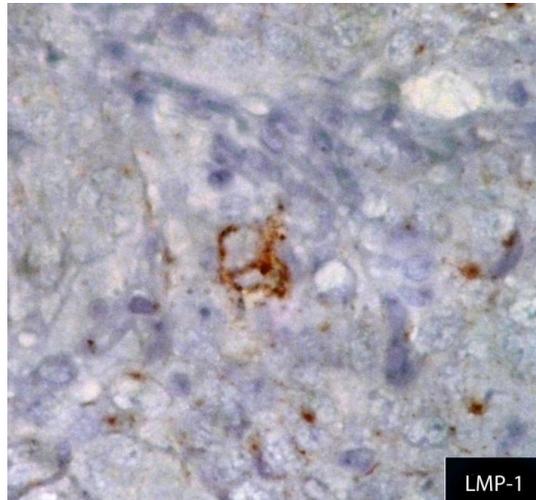


Fig. 6 IHQ para LMP-1: microscopía de alto poder

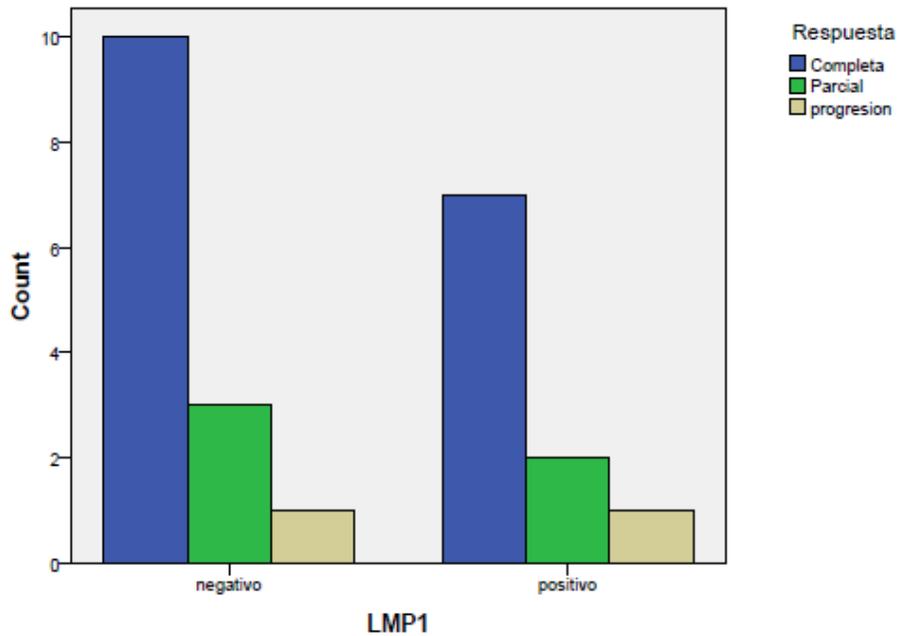
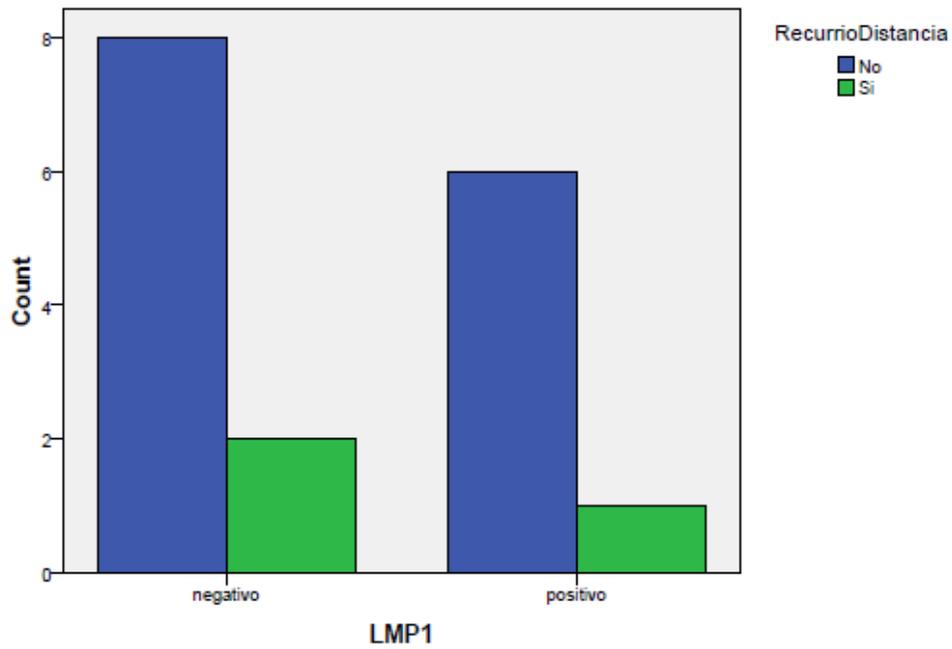
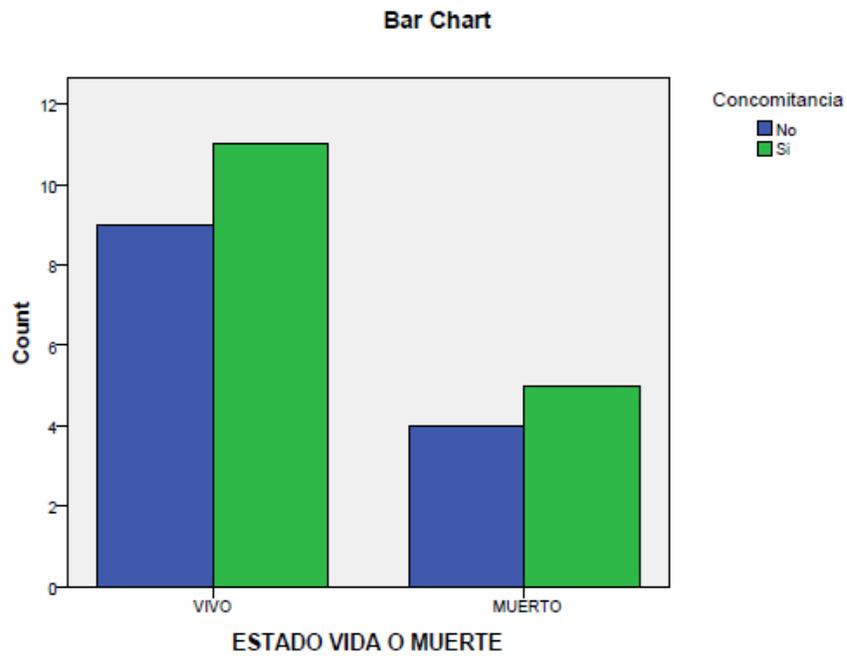


Fig. 7 Expresión de LMP-1 y respuesta tumoral al tratamiento



**Fig. 8 Expresión de LMP-1 y recurrencia a distancia**



**Fig. 9 Supervivida global y tratamiento concomitante**

<b>TABLA 1</b>			
<b>Variable</b>	<b>No (%)</b>	<b>Media</b>	<b>Min/Max</b>
<b>Edad</b>		50 años	22/72
<b>ECOG</b>			
0	18 (62)		
1-2	8 (28)		
>2	3 (10)		
<b>Sexo</b>			
H	20 (69)		
M	9 (31)		
<b>Tabaco</b>			
Sí	8 (12)		
No	21 (88)		
<b>Alcohol</b>			
Sí	9 (34)		
No	22 (66)		
<b>Histología (OMS)</b>			
Tipo I	4 (14)		
Tipo II y III	25 (86)		
<b>EC</b>			
I	1 (3)		
II	7 (24)		
III	3 (11)		
IV	18 (62)		
<b>Tumor (T)</b>			
1	10 (34)		
2	8 (26)		
3	3 (10)		
4	8 (30)		
<b>Ganglios (N)</b>			
0	6 (21)		
1	7 (24)		
2	4 (14)		
3	12 (41)		
<b>Metastasis (M)</b>			
0	27 (93)		
1	2 (7)		
<b>Invasión espacio PF</b>			
Sí	14 (48)		
No	15 (52)		
<b>QT (22 pacientes)∞</b>			
Neoadyuvante	7 (24)		
Concomitante	16 (55)		
Adyuvante	12 (48)		
<b>Fármaco</b>			
CDDP	12 (55)		
CDDP/5-FU	9 (41)		

<b>Gemcitabina</b>	1 (4)		
<b>RT (27 pacientes)</b>			
<b>Combinada</b>	16 (60)		
<b>Monoterapia</b>	11 (40)		
<b>Dosis de RT</b>		67.7 Gy	38/94
<b>Protracción RT</b>		60 días	29/135
<b>Cirugía de consolidación</b>			
<b>Sí</b>	2 (7)		
<b>No</b>	26 (93)		
<b>Respuesta al tratamiento</b>			
<b>Completa</b>	19 (68)		
<b>Parcial</b>	6 (22)		
<b>Progresión</b>	3 (10)		
<b>Recurrencia</b>			
<b>A cualquier sitio</b>	10 (45)		
<b>Local/regional</b>	5 (23)		
<b>Distancia</b>	5 (23)		
<b>Estado actual (29 pacientes)</b>			
<b>Vivo sin enfermedad</b>	9 (31)		
<b>Vivo con enfermedad</b>	1 (3)		
<b>Perdido con enfermedad</b>	9 (31)		
<b>Perdido sin enfermedad</b>	1(3)		
<b>Muerto</b>	9 (31)		
∞ Un mismo paciente recibió más de una modalidad de QT			

<b>TABLA 2</b>	<b>No (%)</b>
<b>LMP-1</b>	
<b>Positivo</b>	<b>10 (40)</b>
<b>Negativo</b>	<b>15 (60)</b>
<b>EBER</b>	
<b>Positivo</b>	<b>23 (92)</b>
<b>Negativo</b>	<b>2 (8)</b>
<b>p16</b>	
<b>Positivo</b>	<b>11 (44)</b>
<b>Negativo</b>	<b>14 (56)</b>
<b>p53</b>	
<b>Positivo</b>	<b>10 (40)</b>
<b>Negativo</b>	<b>15 (60)</b>