

**INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL**

**ESCUELA SUPERIOR DE MEDICINA**



**SECCIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN**

**Linfoma Angiocéntrico Centrofacial y Expresión de Metaloproteasas  
(experiencia en 20 casos en el  
Instituto Nacional de Cancerología MÉXICO)**

**TESIS**

**QUE PARA OBTENER EL GRADO  
DOCTOR EN INVESTIGACIÓN EN MEDICINA**

**Presenta**

**ANTELMO ABELARDO MENESES GARCÍA**

**JUNIO 2005**

Esta tesis fue realizada en el departamento de Anatomía Patológica y de Investigación del Instituto Nacional de Cancerología, bajo la dirección de los doctores:

Dr. Alejandro Mohar Betancourt

Dr. Jorge E. Herrera Abarca

## **AGRADECIMIENTOS**

**A mi esposa e hijos** Por su constante apoyo, tolerancia, cariño y sobre todo por su amor.

**A mis padres** por la formación de mí como persona y cariño siempre presente.

**A mi comité de revisión** Dr. Jorge Herrera A, Dra. Adriana Becerril M, Dra. Guadalupe Cleva V, Dr. Guillermo Ceballos R, Dr. Carlos Castillo H, y Dr. Alejandro Mohar B., por su tiempo, conocimientos impartidos, amistad y experiencia dedicada a la elaboración y desarrollo de este trabajo.

**Gracias al Instituto Nacional de Cancerología** a quien debo mi formación académica, profesional y laboral.

**A Lolita Zapata y Ma. Eugenia Macedo**, asistentes a quienes agradezco su paciencia, apoyo administrativo y por su tiempo en la concreción de esta tesis.

**A los posibles lectores** de esta tesis, por su tiempo y críticas que resulten en beneficio de los pacientes.

## INDICE

	Página
Glosario	8
Relación de tablas y figuras	9
Resumen	11
Abstract	14
<b>1. Introducción</b>	<b>17</b>
1.1 Epidemiología de los linfomas	17
1.2 Aspectos histopatológicos de los linfomas extraganglionares de células T/NK tipo nasal (angiocéntrico)	19
1.3 Historia natural del linfoma extraganglionar de células T/NK tipo nasal	21
1.4 Etapa clínica de los linfomas centofaciales	23
1.5 Clasificación histológica de neoplasias linfoides	23
1.6 Patogénesis viral y epidemiología del virus de Epstein-Barr.	24
1.7 Asociación entre el linfoma no Hodgkin de células T /NK tipo nasal y EBV.	26
1.8 Metaloproteasas y cáncer.	27
1.8.1 Sustratos de las metaloproteasas	29
1.8.2 Inhibidores de las metaloproteasas en cáncer humano	31
1.8.3 Regulación de MMPs en los tumores	32
1.8.4 Las metaloproteasas y su papel en la respuesta inmune al cáncer	34
1.8.5 Expresión de metaloproteasas en linfomas	35

<b>2. Planteamiento del Problema</b>	36
<b>3. Justificación</b>	37
<b>4. Pregunta de Investigación</b>	38
<b>5. Objetivo General</b>	38
<b>6. Objetivos Particulares</b>	38
<b>7. Metodología</b>	39
<b>8. Material y métodos</b>	39
8.1 Datos generales	39
8.2 Inmunohistoquímica	40
8.3 Estudio de microscopía electrónica	41
8.4 Análisis estadísticos	41
<b>9. Resultados</b>	41
9.1 Características de los pacientes e histopatología	41
9.2 Hallazgos de inmunohistoquímica	46
9.3 Hallazgos de ultraestructura	54
<b>10. Discusión</b>	55
<b>11. Referencias</b>	63
<b>12. Artículo:</b> p53 Mutations in nasal natural killer/ T-cell lymphoma from Mexico. Association with large cell morphology and advanced disease. Am J Path 2001;159:2095-2104	72

## **Glosario:**

Células T/NK: Células linfoides de origen T y asesinas naturales

CD: Nomenclatura para los anticuerpos presentes en las células linfoides

CD56: Anticuerpo monoclonal que marca a las células asesinas naturales (NK).

EBV: Virus de Epstein-Barr

EA: antígenos tempranos

EBNA: Antígenos nucleares del virus de Epstein-Barr

Extraganglionar: Fuera de los ganglios linfáticos

LNH: Linfoma no Hodgkin. Neoplasia maligna derivado de células linfoides.

Linfoma angiocéntrico: Concentración de células neoplásicas linfoides con concentración preferencial alrededor y dentro de los vasos sanguíneos, con infiltración y destrucción de la pared de éstos.

LMP-1: Proteína de membrana latente del EBV.

MMPs: Metaloproteasas

NK: Células asesinas naturales

p53 Proteína supresora de tumor.

TIMP: Inhibidor tisular de metaloproteasas

### **Relación de Tablas:**

Tabla 1. Clasificación clínica de los linfomas de localización centrofacial, denominada Ann Arbor.	23
Tabla 2. Características clínico-histopatológicas de 20 pacientes con linfoma de células T / NK tipo nasal	43
Tabla 3. Expresión de metaloproteasas en el tumor.	49
Tabla 4. Expresión de metaloproteasas en el estroma	50
Tabla 5. Expresión de metaloproteasas en el epitelio	51
Tabla 6. Expresión de metaloproteasas en el endotelio	52
Tabla 7. Expresión de metaloproteasas MMP-1, 2, 3, 9, 11, 13 y los inhibidores TIMP-1 y TIMP-2.	53

### **Relación de figuras:**

Figura 1. Tipos de metaloproteasas mostrando sus diferentes dominios estructurales y tipo membrana.	30
Figura 2. Microambiente tisular, interactuando algunas metaloproteasas, células estromales y células neoplásicas.	33
Figura 3 a. Paciente con linfoma angiocéntrico de células T/NK que muestra lesión ulcerada de la línea medio facial y edema periorbitario.	44

Figura 3b. Paciente masculino con linfoma en paladar, ulcerado y con extensas zonas de necrosis.	44
Figura 4. Aspecto histológico mostrando vaso sanguíneo con prominencia de las células endoteliales e invasión por células neoplásicas linfoides de diferentes tamaños y atipias.	45
Figura 5. Linfoma de células T / NK nasal con extensas zonas de necrosis coagulativa.	46
Figura 6. Imagen microscópica mostrando expresión de MMP-1 en el citoplasma de las células neoplásicas y tejido extracelular cercano a la pared de los vasos sanguíneos.	48
Figura 7 a. Ultraestructura de capilar, observándose células endotelial y célula neoplásica en la cual hay gránulos citoplásmicos.	54
Figura 7 b. Acercamiento de la anterior, mostrando gránulos en contacto con fibras de colágena subendotelial.	54



## Resumen

Los linfomas representan un problema de salud pública en México, diagnosticándose alrededor de 4 100 nuevos casos por año (5%) del total de neoplasias malignas. El 10% de los linfomas extraganglionares se presentan en cabeza y cuello, principalmente en la región centrofacial. La mayoría pertenecen a la categoría de los linfomas extraganglionares de células T/NK, tipo nasal. Este tipo de linfomas representan una entidad poco frecuente en los Estados Unidos y Europa, pero común en Asia, Latinoamérica y en particular México.

El objetivo del presente estudio fue determinar la expresión de diferentes tipos de metaloproteasas por reacciones de inmunohistoquímica e identificar el tipo de células que están participando en su expresión.

Material y métodos: Del departamento de patología del Instituto Nacional de Cancerología, México, se obtuvieron 20 casos de linfoma de células T/NK tipo nasal, los cuales fueron seleccionados de un estudio previo de inmunohistoquímica e hibridación in situ. Los casos seleccionados correspondieron a linfoma centrofacial de células T/NK CD 56+ y relacionados a EBV, positividad citoplásmica a CD3, proteínas asociadas a gránulos citotóxicos (TIA-1). Además se consideraron, edad, sexo, localización del tumor, etapa clínica, tratamiento y seguimiento. El panel de anticuerpos utilizados fueron MMP-1, MMP-2, MMP-3, MMP-9, TIMP-2, MMP-11 y MMP-13.

Resultados: 13 fueron hombres y siete mujeres (M:F ratio 1.8:1), con una mediana de edad de 43 (rango, 22 a 93 años). En 13 de los casos el tumor primario se localizó en cavidad nasal, cuatro casos en paladar y tres en nasofaringe. Desde el punto de vista histopatológico, todos los casos mostraron atipia en las células linfoides, con angiocentricidad y angiodestrucción. Además se observó en todos los casos necrosis coagulativa focal o confluyente. La mayoría de los casos mostraron mezcla de células linfoides atípicas de tamaño mediano y células grandes (17 casos, 85%).

Todos los casos seleccionados fueron positivos para CD 56, EVB, TIA-1, y CD 3 citoplásmico. Hubo significancia estadística en la expresión y distribución en las células tumorales para la MMP-1 y la MMP-11. En relación con los inhibidores de las metaloproteasas, hubo 12 casos con positividad citoplásmica en el epitelio (66.6%) para TIMP-1. El resto de las metaloproteasas y TIMP-2 no tuvieron significancia estadística.

Dos de los casos fueron estudiados desde el punto de vista ultraestructural. Estas células mostraron hendiduras prominentes en su contorno nuclear y con gránulos electrodensos en el citoplasma. Algunos gránulos se encontraban extracelularmente y en contacto con fibras de colágena subendotelial.

Discusión: La cavidad nasal, paladar y en general la línea medio facial, son regiones continuamente estimuladas por numerosos antígenos extraños, creando una permanente y constante lucha entre antígenos y las células que participan en la defensa del huésped.

En esta serie todos los casos mostraron positividad a gránulos citotóxicos TIA-1 y perforinas. Añadido a los estudios de inmunohistoquímica, dos de los casos de esta serie fueron analizados por ultraestructura, demostrando la presencia de gránulos electrodensos en el citoplasma de las células neoplásicas. Las principales enzimas proteolíticas que participan en las neoplasias malignas, son las metaloproteasas (MMPs). Estas MMPs degradan una amplia variedad de moléculas cuyos componentes principales son: fibronectina, laminina, vitronectina, colágena tipo IV, trambospondina, elastina, ácido hialurónico, factor VIII, heparan sulfato, proteoglicanos, entre otros.

En esta serie hubo una mayor expresión en las células neoplásicas de las MMP-1 y MMP-11, las cuales se han asociado con un estado de mayor proliferación celular y de agresividad, mientras que la MMP-11 además de su papel degradativo, actúa disminuyendo la apoptosis de las células neoplásicas. Hubo doce casos que

mostraron inmunotinción positiva a TIMP-1 a nivel del epitelio. En particular cuando este fenómeno fue observado en el epitelio de los conductos inmersos en el tumor, la destrucción de dichos conductos fue poco aparente, lo cual nos explica un efecto inhibitorio que puede ser dominado por la acción de las MMPs a medida que sobrepasan el equilibrio de producción de metaloproteasas y disminución de los TIMPs.

En conclusión, este tipo de linfomas son un grupo particular de neoplasias agresivas, de distribución geográfica particular, predominante de países orientales y de Latinoamérica, asociados a EBV y acompañados histológicamente y clínicamente por extensas zonas de necrosis, asociados a angioinvasión, angiodestrucción, liberación de gránulos citotóxicos, así como en la participación en la degradación de la matriz extracelular y de la pared vascular por enzimas proteolíticas, en particular de las metaloproteasas MMP-1 y MMP-11 y probablemente este mecanismo sea inducido por LMP-1 del virus de Epstein-Barr.

**Abstract:**

In Mexico, the lymphomas represent a public problem; diagnostics show 4100 new cases approximately per year (5%) from the total of the neoplastic malignancy. The 10% of the extranodal lymphomas are present in head and neck, principally in the centofacial region.

The majority belong to the category of the extranodal lymphomas of nasal type T/NK cells.

This type of lymphomas represents an identity less frequent in the United States and Europe, but it is common in Asia, Latin America and primarily in Mexico.

The objective of this was to determinate the expression of different types of metalloproteases by immunohistochemical reactions and to identify the type of cells that are participating in its expression.

Material and Methods: In the pathology department of the National Institute of Cancerology, Mexico, were obtained 20 cases of T/NK lymphoma cells of nasal type, which were selected from a previous study of immunohistochemical and hibridation in situ. These cases correspond to centofacial lymphoma of T/NK CD56+ cells and related to EBV, CD3 citoplasmic positivity, proteins associate to cytotoxic granules (TIA-1). Also, it was considered: age, sex, tumor location, clinic level, treatment and process. The antibodies used were: MMP-1, MMP-2, MMP-3, MMP-9, TIMP-2, MMP-11, and MMP-13.

Results: Thirteen men and seven were women (M:F ratio 18:1) with a middle age of 43 (range 22 to 93 years). In 13 of the primarily tumor was located in nasal cavity, 4 cases were present in palate and 3 in "nasopharynx". Histopathologically, all the cases

presented atypia in the lymphoid cells with angiocentricity and angiodestruction. Also it was observed coagulative necrosis in all the cases. The majority of the cases shown a mixture of lymphoid cells abnormal of medium size and big cells. (85%)

All the selected cases were positive for CD56, EVB, TIA-1 and cytoplasmic CD3. There were significant statistics in the expression and distribution of the tumoral cells for the MMP-1 and the MMP-11. In the relation with the inhibitors of the metalloproteases, there were 12 cases with cytoplasmic positivity in the epithelium (66.6%) for TIMP-1. the rest of the metalloproteases and TIMP-2 hadn't significant statistics.

Two of the cases were ultrastructural studied. These cells shown electrodense granules in the cytoplasm. Some of the granules were extracelulary found and in touch with subendothelial collagen fibers.

Discussion: The nasal cavity, palate and in general the midfacial line, are regions constantly stimulated by lots of rare antigens, creating a permanent and constant fight between antigens and the cells which participate in the host defense. In this, all the cases shown positivity to cytotoxic granules TIA-1 and perofines. Joined to the immunohistochemical studies, two of the cases of this serie were ultraestructural analized, demonstrating the presence of electrodense granules in the cytoplasm of the neoplastic cells. The principal proteolytic enzymes that participate in malignant neoplasmas are the metalloproteases (MMPs). These MMPs affect a big variety of molecules which principal components are: fibronectina, laminina, ultranectina, colágena tipo IV, trombospondina, elastina, hialuop nic acid, VIII factor, heparan sulfato, among others.

Here, there was a mayor expression in the neoplastic cells of the MMP-1 and MMP-11, which had been associated with a major state of cellular proliferation and aggressiveness, although the roll of the MMP-11 acts dimishing the apoptosis of the neoplastic cells. There were 12 cases that shown positive inmunostein of TIMP-1 to the epithelium level. In particular when this phenomena was observed in the epithelium of the inmerse conductors was less visible, which explain us an inhibitor

effect that can be dominated for the MMPs action that higher the equilibrium of metalloproteases production and low levels of TIMPs.

In conclusion, this type of lymphomas are a particular group of aggressive neoplasmas, of particular geographical distribution, predominating in Asian and Latin America countries associated to EBV and represented histologically and clinically for large zones of necrosis, associated to angioinvasion, angiodestruction, cytotoxic granules get free, as well as the degradation of the extracellular matrix and the vascular wall of proteolytic enzymes, in particular the metalloproteases type 1 and 11 and probably this mechanism is carry by a LMP-1 from the Epstein-Barr virus.

The role of the TIMPs, in particular block MMP-1 and 11 can help to diminish the presence of angiodestruction and necrosis observed in this neoplasia.

# 1. Introducción

## 1.1 Epidemiología de los linfomas

Los linfomas son neoplasias malignas frecuentes de distribución universal. Los linfomas son responsables de alrededor de 197, 000 muertes por año en el mundo (1). Los linfomas no-Hodgkin (LNH) representan un grupo heterogéneo de neoplasias, con una amplia variación entre las diferentes regiones del mundo. La mayor mortalidad por linfomas se observa en una población de Africa (sud-Sahara), Norte América y Oceanía (1). Con base en el análisis de registros poblacionales en EUA, hay un aumento sustancial en el número de casos nuevos de LNH. El espectro clínico patológico de los linfomas se modificó en los últimos 40 años, con evidencias y variaciones en la incidencia de LNH de acuerdo con la zona geográfica estudiada. En México, esta enfermedad ocupa el cuarto lugar en frecuencia entre los tumores malignos más frecuentes notificados en 1999 en el "Registro Histopatológico de las Neoplasias Malignas en México" (2).

Los linfomas representan un problema de salud pública en México, diagnosticándose alrededor de 4 100 nuevos casos nuevos por año (5% del total de neoplasias malignas). Por género, ocupa el segundo lugar en frecuencia entre los hombres, habiendo una distribución característica en los diferentes grupos de edad, ubicándolo como el primer lugar en frecuencia en la edad infantil (menores de un año), el tercer lugar en la población preescolar (1 a 4 años de edad), el primer lugar en la población escolar (5 a 14 años), el

tercer lugar entre la población productiva (15 a 64 años) y séptimo lugar en la población pos-productiva (65 años y más) (3).

Entre los linfomas no-Hodgkin, hay un grupo con presentación extraganglionar. El 10 % de los linfomas extraganglionares se presentan en cabeza y cuello, principalmente en la región centrofacial. De éstos, la mayoría pertenecen a la categoría de los linfomas extraganglionares de células T/NK, tipo nasal. Desafortunadamente la mayoría de los pacientes con este tipo de linfomas cursan con una evolución rápida, representada por síntomas que dependen de su localización inicial. Como la mayoría están situados en la cavidad nasal, seguidos del paladar (4), los síntomas son predominantemente, rinorrea, obstrucción nasal, aumento de volumen perinasal, presencia de masa tumoral, epistaxis, úlcera en el paladar, masa palatina etc. La evolución por lo general es rápida, progresiva, destructiva, con gran participación e involucro óseo, tejidos blandos periorbitarios y ulceración de la piel (5). Aunque, este tipo de linfomas de células T/NK se localiza en el macizo centrofacial, puede involucrar sincrónica o metacrónicamente piel, hígado, pulmones, trayecto gastrointestinal y testículos (6).

Debido a lo destructivo de la lesión y la rapidez de su curso clínico, la mayoría de los pacientes sometidos a estudios de biopsia, muestran extensas zonas de necrosis, lo que puede ser causa del retraso en el diagnóstico y por ende de su tratamiento (7). Por estas razones, los pacientes son diagnosticados en etapas clínicas avanzadas, dificultando su manejo loco-regional y terapéutico. Hay diferentes modalidades de manejo, sin haber alcanzado un modelo óptimo de tratamiento, sin embargo, diferentes estudios sugieren el uso de radioterapia como única medida terapéutica, o bien seguida de quimioterapia, por ser considerada una enfermedad sistémica (8).



Por esta razón para que la terapia pueda ser adecuadamente individualizada, resulta vital evaluar el microambiente donde se desarrolla la enfermedad, implicando todas sus variables histopatológicas, clínicas, biológicas, para así determinar diferentes esquemas de tratamiento, ya sea con medicamentos citotóxicos, radioterapia, o una combinación de éstos.

## **I.2 Aspectos histopatológicos de los linfomas extraganglionares de células T/NK tipo nasal (angiocéntricos):**

Después de la descripción de McBride, algunos autores llamaron a la entidad bajo el nombre de reticulosis polimorfa y reticulosis maligna de la línea media (6, 9,10). En 1984, la Dra. Elaine Jaffe intentó unificar la terminología hasta entonces empleada para esta entidad nosológica (5); propuso el concepto de "espectro continuo", abarcando desde la forma más benigna de vasculitis linfocítica hasta el desarrollo de linfoma angiocéntrico, dividiéndola en tres grados de lesión inmunoproliferativa angiocéntrica (LIA grado I, LIA grado II y LIA grado III). La lesión de bajo grado representada por escasas células neoplásicas con angiocentricidad y sin necrosis. El grado II con mayor número de células tumorales y áreas focales de necrosis, hasta un predominio de células linfoides atípicas y extensas zonas de necrosis coagulativa en el grado III. Una característica adicional de este tipo de lesiones es afectar sitios extraganglionares, como pulmón, nasofaringe, senos paranasales, piel, riñón, testículos y sistema nervioso central, entre otros. Todas estas expresiones morfológicas comparten una composición celular polimorfa, pleomórfica y

angiocéntrica, cuyo espectro va desde la forma más indolente a la forma francamente maligna. Un panel de científicos ha propuesto que un tumor deba ser considerado *angiocéntrico*, cuando haya una concentración preferencial de células tumorales alrededor y dentro de los vasos sanguíneos, con infiltración y destrucción de la pared de estos (11).

En un estudio publicado sobre 35 casos en el Instituto Nacional de Cancerología, México, tanto en material de autopsia (uno de seis casos), como en material quirúrgico (cinco casos de 29), independientemente del grado histológico, la evolución fue fatal y similar a los linfomas extraganglionares, angiocéntricos centofaciales, por lo cual se considera que no debería subdividirse este tipo de lesiones en grados y ser calificados desde su inicio como linfomas con alto potencial de agresividad (7).

Morfológicamente, este grupo de linfomas se caracteriza por presentar un amplio espectro citológico. Las células atípicas podrían ser de tamaño pequeño, mediano o grande, hiper cromáticas o presentarse una mezcla de ellas. Habitualmente estas células neoplásicas muestran hendiduras o son convolutas y acompañadas de actividad mitótica. Estas células muestran angiocentricidad. La necrosis es virtualmente una característica constante, frecuentemente con un patrón de distribución zonal, lo que sugiere una patogénesis vascular. De estos conceptos se desprende que son linfomas angiocéntricos angiodestructivos, compartiendo la triada: células linfoides atípicas con angiocentricidad y necrosis (11).

De esta manera, el diagnóstico histopatológico requiere biopsias generosas y de diferentes sitios de la lesión, para evitar el retraso en el diagnóstico de la enfermedad; para ello es recomendable realizar al menos seis biopsias de diferentes

áreas del tumor y el cultivo de la lesión para identificar posibles agentes infecciosos, los cuales frecuentemente colonizan las áreas de necrosis y complican el manejo de los pacientes. El uso de quimioterapia de inicio, en los primeros pacientes estudiados, reveló alto riesgo de conllevar hemorragias incoercibles a nivel de los sitios de afección centrofacial y en otros órganos donde se encontraban zonas de lesión por la neoplasia, como lo demostraron los hallazgos de autopsia presentados por Meneses y cols (7). Por ello, Sobrevilla y cols, enfatizan la necesidad de emplear como primera instancia un tratamiento locorregional a base de radioterapia, y posterior manejo con agentes quimioterápicos, ofreciendo posibilidades de mayor supervivencia y mejor calidad de vida de los pacientes (8).

### **I.3 Historia natural del linfoma extraganglionar de células T/NK tipo nasal:**

Los linfomas extraganglionares centofaciales y angiocéntricos están compuestos de células T/NK y con predominio de presentación nasal. Este tipo de linfomas representan una entidad poco frecuente en los Estados Unidos y Europa, pero común en Asia, Latinoamérica y en particular en México. Este patrón de distribución geográfica sugiere una cierta predisposición racial (12, 13).

Debido a su localización en el macizo facial, los pacientes habitualmente cursan con obstrucción nasal, rinorrea, ulceración del paladar, edema periorbitario y prominente eritema facial. Estos hallazgos clínicos se acompañan de extensas zonas de necrosis, la cual podría ser inducida por el virus de Epstein-Barr, el cual está

presente en la mayoría de estos linfomas, como lo demostró Elenitoba y cols, en un estudio llevado a cabo en pacientes mexicanos (14).

Debido a la baja frecuencia con que se presenta el linfoma extraganglionar de células T/NK tipo nasal, no hay un consenso sobre su manejo óptimo. Se ha utilizado radioterapia sola o combinada con quimioterapia, principalmente para etapas clínicas tempranas, y quimioterapia con y sin radioterapia adyuvante para etapas clínicas avanzadas (9). Algunos reportes mencionan que estos linfomas usualmente son más sensibles a la radioterapia (8), sin embargo, el pronóstico habitualmente es pobre a corto plazo y la diseminación frecuentemente ocurre, con pobre respuesta a la quimioterapia complementaria. En general este tipo de linfomas nasales, comparados con los linfomas ganglionares del mismo tipo celular, tienen una pobre respuesta al tratamiento, a pesar de las diferentes modalidades hasta ahora empleadas, con alta mortalidad, la cual ocurre habitualmente antes de un año de iniciado el mismo (8, 9).

Una complicación clínica frecuente en pacientes con linfoma de células T/NK es el síndrome hemofagocítico, que se puede presentar a lo largo de la enfermedad y habitualmente conlleva un curso clínicamente fatal, ocurriendo en un periodo de algunas semanas. En general la supervivencia global para los pacientes con linfoma extraganglionar de células T/NK tipo nasal no es mayor al 30% a los cinco años, independientemente de la etapa clínica (9).

### **1.4.1 Etapa clínica de los linfomas centofaciales:**

Internacionalmente se ha aceptado el sistema de clasificación clínica por etapas propuesto en la reunión de Ann Arbor (Tabla 1)

**Tabla 1. Clasificación de Ann Arbor**

---

Etapa clínica I Afeción de un único órgano extraganglionar (IE)

Etapa clínica II Invasión localizada de un órgano extraganglionar y una o más áreas ganglionares al mismo lado del diafragma (IIE).

Etapa clínica III Afeción de dos regiones a ambos lados del diafragma (IIIE).

Etapa clínica IV Afeción diseminada o difusa de uno o más órganos extralinfáticos.

### **1.5 Clasificación histológica de neoplasias linfoides:**

La categorización histológica de los linfomas ha sido cambiante. En las últimas dos décadas, nueva información ha surgido acerca de los linfomas, resultando en el reconocimiento de nuevas entidades y redefinición de enfermedades desde el punto de vista inmunológico, molecular y genético (11,15).

En 1995 inició la sociedad de hematopatología y la asociación Europea de hematopatólogos el desarrollo de una nueva clasificación de neoplasias hematológicas para la Organización Mundial de la Salud (OMS) (15). Más de 50 hematopatólogos de alrededor del mundo participaron y más de 40 hematólogos y oncólogos correlacionaron esta clasificación con la clínica, identificando de esta manera entidades específicas. Así, fueron realizadas clasificaciones de acuerdo a su linaje celular: i) neoplasias mieloides, ii) neoplasias linfoides, iii) desórdenes de mastocitos y iv) neoplasias de histiocitos. Esta clasificación fue concluida en 1997 en Virginia, Estados Unidos y dada a conocer en 1999. En esta clasificación se concluyó que los linfomas angiocéntricos, debido a su frecuente y constante localización en cavidad nasal y marcaje inmunohistoquímico para células NK (CD 56+) y células T, CD3 (citoplásmico) fueron considerados como linfoma extraganglionar de células T/NK, tipo nasal.

## **1.6 Patogénesis viral y epidemiología del virus de Epstein-Barr**

El virus de Epstein-Barr (EBV) fue originalmente descubierto en 1964 por Epstein y un grupo de colaboradores, entre ellos, Yvonne Barr y Achong, con la demostración por ultraestructura de un virus de la familia herpes, en células de cultivo de una línea de linfomas de Burkitt. El EBV es un miembro de la familia herpesviridae, de DNA de doble cadena lineal envuelto, icosaédrico que contiene 172 kb (16). Es un virus linfotropo de células B, el cual es activador celular policlonal que estimula la división celular y transforma los linfocitos dentro de líneas celulares linfoblastoides, que se

propagan por tiempo indefinido, *in vitro*. La expresión de antígenos importantes expresados por las células infectadas incluyen los antígenos tempranos (EA), sean del tipo restringido (EA/R) o difuso (EA/D); los antígenos nucleares (EBNA) y el antígeno de la cápside viral (VCA). El virus por lo general entra a células linfoides susceptibles a través del receptor para complemento C3d (CD 19), resultando en su infección activa o, como frecuentemente ocurre en los linfocitos B, como infección latente (17). Durante su infección activa, el virus existe en forma lineal y expresa una gran parte de su genoma. La replicación del virus lleva a la muerte de la célula huésped y a la liberación de viriones infecciosos (17). En la infección latente, el DNA del EBV persiste por periodos indefinidos dentro de la célula en un estado relativamente inactivo y la muerte celular no ocurre. Las células infectadas de forma latente, con frecuencia proliferan y contienen múltiples copias de DNA del EBV, la mayoría de las cuales son mantenidas como episomas circulares unidos de manera covalente (17). Sólo unas pocas proteínas virales son expresadas en linfocitos infectados de forma latente, éstas incluyen seis diferentes proteínas nucleares (EBNA 1, 2, 3A, 3B, 3C y LP) y una proteína de membrana (18). La proteína de membrana probablemente representa el blanco para los linfocitos T citotóxicos y así, tanto ésta como la EBNA 2 son antígenos importantes para la transformación y crecimiento del linfocito. Las células infectadas latentemente son también inducidas por los virus para expresar algunas proteínas celulares, incluyendo antígenos y moléculas de adhesión (19)

La evidencia serológica de infección por EBV de forma característica ocurre en la primera década de la vida, entre individuos de bajo nivel socioeconómico. La gran mayoría de las infecciones ocurren en niños asintomáticos o bien, con leve

sintomatología inespecífica del trayecto respiratorio superior. La infección primaria en niños mayores y adultos, con frecuencia resulta en mononucleosis infecciosa sintomática (17). Una vez que la infección ha ocurrido, el virus persiste como una infección activa, de bajo grado en las células epiteliales de las glándulas salivales o del epitelio orofaríngeo, pero de igual manera, en forma latente dentro de los linfocitos B (18,19). La infección cuando es de tan bajo nivel puede no ser detectable por estudios de hibridación de DNA. Estudios de hibridación *in situ*, han demostrado la presencia de DNA de EBV dentro de las porciones superiores del epitelio respiratorio en pacientes con HIV infectados por EBV (19).

### **1.7 Asociación entre el linfoma no-Hodgkin de células T/NK tipo nasal y EBV**

Una alta incidencia de linfomas de células T/NK tipo nasal diagnosticados en China, Japón y países de Latinoamérica, cuyo fenotipo es derivado de células asesinas naturales, se asocian al virus de Epstein-Barr (20,21). También en otros países como Francia y USA se ha encontrado asociación de este virus con linfomas T/NK tipo nasal (21-24). En Latinoamérica y en particular en Perú, se han reportado hallazgos similares (12).

Estos datos muestran un patrón similar de distribución del tipo de cepa de EBV entre tejidos neoplásicos y procesos reactivos, obtenidos de la misma zona geográfica. Es posible que el EBV pueda infectar células del linaje T/NK en algún momento y establecer las condiciones para el desarrollo de los linfomas tipo nasal T/NK. Estos hallazgos sugieren la posibilidad de exposición de la mucosa nasal, nasofaríngea y de paladar, al virus con la consiguiente participación de las células /NK, con probable infección inicial y posterior transformación maligna (14).



Se considera que el EBV codifica una proteína de membrana latente (LMP-1), la cual juega un papel importante en la transformación de células B *in vitro*, siendo detectada en linfoma de Burkitt, carcinoma nasofaríngeo, enfermedad de Hodgkin, desórdenes inmunoproliferativos, en pacientes con inmunodeficiencia, linfoma anaplásico de células grandes CD30, considerándose que la expresión de la LMP-1 en estos tumores es un evento tardío en la carcinogénesis (25-27). De esta manera, en linfoma nasal, la expresión del gene del antígeno nuclear del EBV (EBNA-2), así como del gene de la LMP-1, son considerados como responsables de la función oncogénica del EBV, posiblemente debido a que el sitio en el que se insertan estas moléculas induzcan hipermetilación de algunos factores de crecimiento así como del promotor de la cadherina E (26-28).

También se argumenta que el EBV puede participar en la inducción de citocinas, en particular del factor de necrosis tumoral, factor nuclear kappa-B, y de metaloproteasas en las células viralmente infectadas, lo cual puede ser causa de la presencia de necrosis coagulativa frecuentemente observada en este tipo de procesos linfoproliferativos (29-31). Por todos estos datos se considera que los linfomas angiocéntricos de células T/NK tipo nasal extraganglionares se encuentran estrechamente asociados al virus de Epstein-Barr.

## **1.8 Metaloproteasas y cáncer:**

La diseminación, invasión y metástasis de las neoplasias malignas es un proceso de múltiples pasos, que involucran la degradación de la membrana basal y de la matriz

extracelular. Estos mecanismos son facilitados con la participación de enzimas proteolíticas como las metaloproteasas (32).

Las metaloproteasas de matriz (MMPs) son una familia de enzimas dependientes de zinc y calcio, que participan de manera importante en la invasión y metástasis tumoral, ya que son capaces de degradar la mayoría de los componentes de matriz extracelular (32). Hasta el momento se han descrito alrededor de 30 tipos diferentes de metaloproteasas con algunos de sus inhibidores (33). Anteriormente las MMPs fueron divididas en colagenasas, gelatinasas, estromelinas y metrilisinas, con base en su especificidad para degradar componentes de la matriz extracelular, y así, sus nombres comunes reflejaban la base para su clasificación. Sin embargo, como la lista de sustratos de metaloproteasas ha crecido, se ha adoptado un sistema numérico secuencial para su clasificación, y ahora se agrupan de acuerdo a su estructura. Hay ocho distintas clases estructurales de metaloproteasas: cinco son secretadas y tres son tipo-membrana (MT-MMP's) (**Figura 1**) (33). Muchos de los eventos de señalización extracelular que regulan el desarrollo celular ocurren en o cerca de la membrana celular y son regulados por proteólisis pericelular. Las metaloproteasas tipo membrana celular están covalentemente vinculadas a la membrana celular, siendo la manera idónea de unir la actividad de la MMP a la membrana celular (32,33).

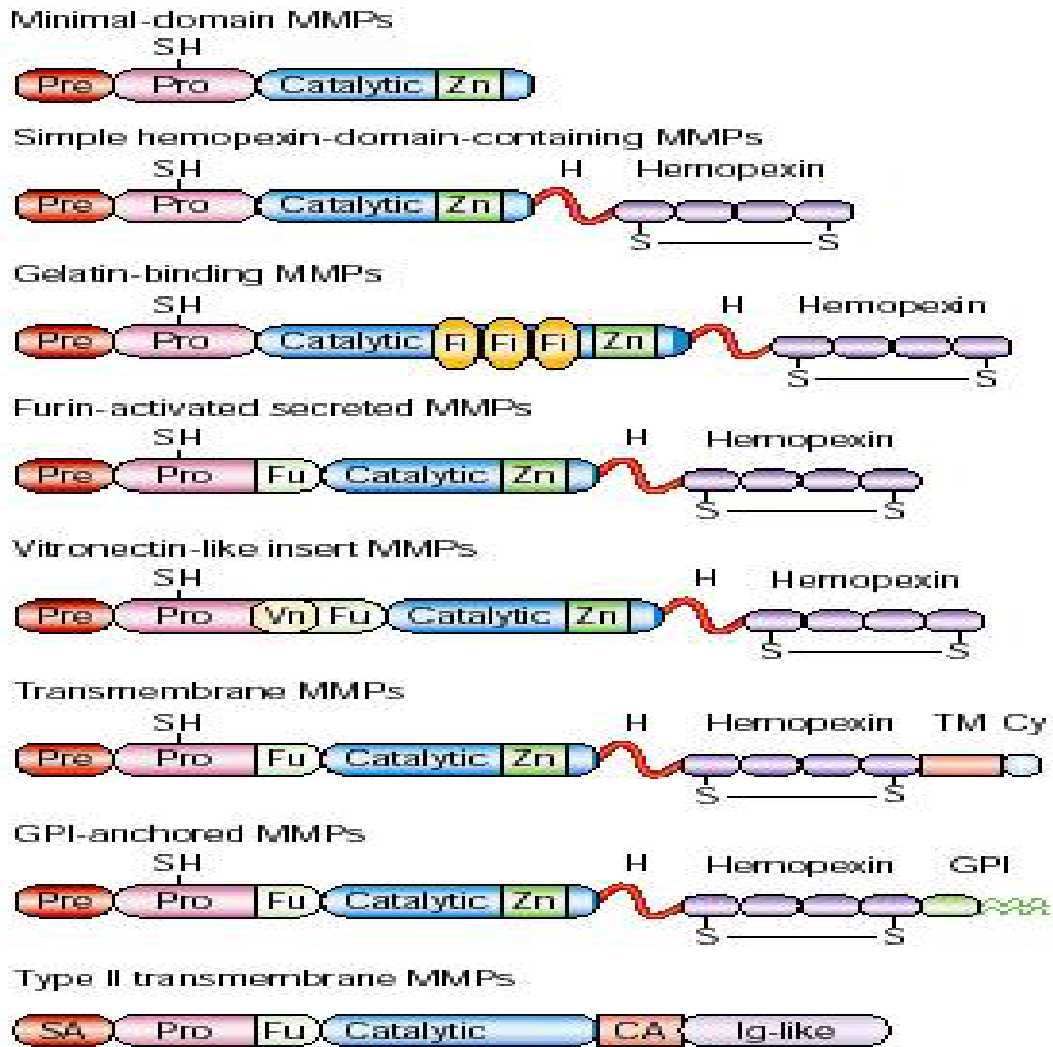
Las metaloproteasas son sintetizadas como zimógenos inactivos (pro-MMPs), y se mantienen inactivos por la interacción entre el grupo sulfidril-cisteína y el ion zinc. Su activación requiere de remoción proteolítica a nivel del dominio pro-péptido, de esta manera, la mayoría de las metaloproteasas son activadas fuera de la célula por otras metaloproteasas activadas o proteinasas de serina (33-35). Aunque algunas

metaloproteasas como la MMP-11 y las MT-MMPs también se pueden activar por proteinasas de serina intracelulares, antes de que ellas sean liberadas a la superficie de la célula (33). La actividad de las MMPs es igualmente controlada por inhibidores endógenos, el principal inhibidor de MMPs en los tejidos es la alfa-macroglobulina, la cual está presente en el plasma (36). Hay otros inhibidores endógenos de MMPs mejor estudiados y son los inhibidores de tejido de las metaloproteasas (TIMPs) 1, 2, 3 y 4, los cuales de manera reversible inhiben a las MMPs en una forma estequiométrica 1:1; sin embargo, en ocasiones estos inhibidores de MMPs, pueden actuar induciendo la activación de otras MMPs, a través de la ruptura de componentes moleculares de la matriz extracelular y de esta manera participar como inductores de MMPs (36, 37).

### **1.8.1 Sustratos de las metaloproteasas**

Las MMPs predominantemente degradan componentes estructurales de la matriz extracelular, y de esta forma facilitan la migración celular. Sin embargo, la ruptura de los componentes de la matriz extracelular por las MMPs, puede también generar fragmentos que llevan a nuevas funciones: por ejemplo, la incisión de laminina-5 y colágena tipo IV resulta en la exposición de sitios críticos que promueven la migración celular (38,39). La participación de estas sobre las moléculas de adhesión celular afectan el desarrollo tumoral, por ejemplo, la incisión de Caderina-E y CD44 resulta en la liberación de fragmentos de los dominios extracelulares y con ello el aumento del desarrollo invasivo de las células neoplásicas (39). Los receptores de factores de crecimiento también actúan como sustratos de las metaloproteasas (33,40,41).

**Esquema estructural de las principales metaloproteasas:**



**Figura 1.** Tipos de metaloproteasas mostrando sus diferentes dominios de forma estructural y membranal (Tomado de *Nature Reviews/cancer*, 2002;2, pp 164).

### **1.8.2 Inhibidores de las metaloproteasas en cáncer humano:**

La expresión y actividad de las metaloproteasas están aumentadas en casi cualquier tipo de cáncer humano, y se correlacionan por lo general con el estado avanzado del tumor (33,42). La mayor capacidad de invasión, metástasis y por ende pobre pronóstico, se demuestra al efectuar correlaciones entre la expresión de metaloproteasas, la etapa clínica de algunos tumores y su correlación con la supervivencia de los pacientes (42). La actividad de las enzimas proteolíticas depende en gran medida del balance con sus inhibidores naturales, que pueden ser producidos por las células tumorales mismas, o bien por las células estromales adyacentes al tejido lesionado. Para cada familia de enzimas proteolíticas se han descrito inhibidores específicos. De estos inhibidores naturales, los que más se han estudiado en patología tumoral son los inhibidores tisulares de metaloproteasas, y hasta el momento se han identificado cuatro tipos (TIMPs 1,2,3 y 4) (37, 43-45). Se trata de glucoproteínas que se unen estrechamente a las formas activas de las MMPs, ocasionando una inhibición de su actividad (43). La importancia de los TIMPs en fisiopatología tumoral viene avalada por diferentes estudios experimentales, que demostraron que la administración exógena de TIMPs puede bloquear o inhibir la invasión o progresión tumoral (44,46). Además e independientemente de la acción inhibitoria sobre las MMPs, se han señalado otras acciones de los TIMPs, como la inducción de apoptosis o la capacidad de bloquear la formación de nuevos vasos sanguíneos, condicionando con ello una disminución del crecimiento tumoral (45, 47).

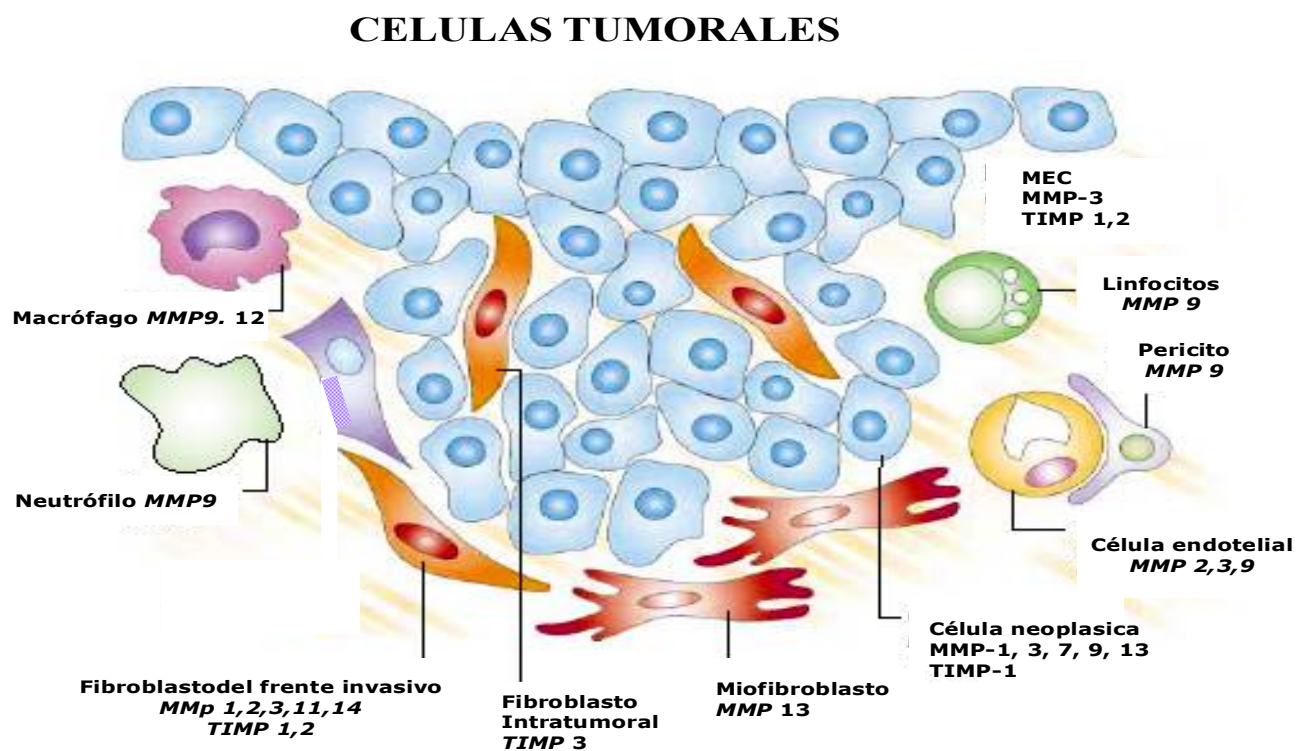
Sin embargo, a pesar de esos datos que indican una regulación negativa de los TIMPs en el proceso de invasión tumoral y metástasis, el significado biológico de la expresión tumoral de estos inhibidores parece, al menos hasta ahora, controvertida. Hay algunos estudios donde se ha demostrado que la sobre expresión de mRNA de TIMPs se relacionan con un aumento en el potencial invasivo y metastásico de carcinomas de estómago, colon-recto, páncreas y de cabeza y cuello (46,48). De esta manera parece ser que la mayor expresión de TIMPs crea un desbalance que ocasiona activación de moléculas inductoras de las MMPs, similar a como lo hacen los factores de crecimiento (36,37,46,48).

### **1.8.3 Regulación de MMPs en los tumores**

El aumento en la expresión de metaloproteasas en tumores, es probablemente debido a cambios transcripcionales más que a alteraciones genéticas (37). A diferencia de los oncogenes clásicos, las MMP's parecen no ser reguladas por amplificación de genes o activación de mutaciones (49,50). Las únicas dos condiciones reportadas de alteraciones genéticas en células de cáncer son la translocación de la MMP23 en genes del neuroblastoma y la amplificación del gene MMP24. Esto podría ser el resultado de activación de oncogenes o pérdida de supresores de tumor. La transcripción de MMP-1 y MMP-13 es reprimida por el supresor de tumor p53 (49,50).

En tumores humanos, las células neoplásicas y estromales son fuente de metaloproteasas. Mientras algunas MMPs son sintetizadas por células neoplásicas (por ejemplo, MMP-7), muchas otras MMPs (incluyendo la MMP-2 y MMP- 9) son predominantemente sintetizadas por las células estromales (36). Las células tumorales podrían estimular a las células estromales del tumor para sintetizar MMPs

de una manera parácrina a través de la secreción de interleucinas, interferones y factores de crecimiento (**Figura 2**). Las metaloproteasas que son secretadas por las células estromales pueden aún ser reclutadas en la membrana de la célula tumoral (40,41).



**Figura 2.** *Microambiente tisular, interactuando algunas metaloproteasas producidas por células estromales y células neoplásicas. (Tomado de Nature Reviews/Cancer 2002;2 pp 168).*

#### **1.8.4 Las metaloproteasas y su papel en la respuesta inmunitaria al cáncer:**

Las reacciones inflamatorias son importantes componentes de la neoplasia humana. El sistema inmunitario es capaz de reconocer y atacar las células neoplásicas, pero éstas han desarrollado muchas maneras de escapar a la vigilancia inmunológica. Las metaloproteasas están involucradas en los mecanismos de escape (51). Los linfocitos T citotóxicos tumor específicos, células asesinas naturales (NK), neutrófilos y macrófagos son las células que mas participan e infiltran los tumores (52). La proliferación de linfocitos T es regulado a través de citocinas, por medio del receptor alfa de la IL-2 (IL-2 R alfa). Dentro de los diferentes tipos de MMPs, la 9 puede dividir la IL-2 R alfa y por ello suprimir la proliferación de los linfocitos T. Las MMPs pueden activar TGF-B, un importante inhibidor de respuesta de linfocitos T contra los tumores. Un producto de la ruptura de alfa-1-inhibidor de proteinasa, es generado por otro tipo del grupo de las MMPs, como la 11, la cual disminuye la sensibilidad de las células tumorales ante las células NK (53).

Algunas quimoquinas como la IL-2 son blancos conocidos para las MMPs, resultando en la infiltración aumentada o reducida de leucocitos. Aun cuando las células inflamatorias actúan en contra de las células neoplásicas, de manera indirecta pueden favorecer la progresión tumoral, ya que algunas de ellas como macrófagos y neutrófilos sintetizan y liberan MMPs tipo 9,12 y 14 (33).



### **1.8.5 Expresión de metaloproteasas en linfomas:**

Las neoplasias de origen linfoide, difieren de otros tumores sólidos, por el papel de inmunosupervivencia en el que participan. Los linfocitos se encuentran en los órganos y tejido conectivo del cuerpo, por lo mismo tienen un fenotipo normalmente invasivo (54). Algunas evidencias sugieren que las interleucinas podrían estar involucradas en la trans migración de linfocitos desde el compartimiento vascular (55); con este mismo principio es posible que con la ruptura de elementos de la matriz extracelular, las MMPs pudieran participar en un mecanismo similar.

En neoplasias linfoides agresivas, las células linfoides pueden observarse “invadiendo” a través de la cápsula del ganglio linfático, así como en los diferentes órganos del cuerpo infiltrando los tejidos blandos (4-7, 56).

En linfomas no-Hodgkin se han efectuado estudios sobre la expresión de metaloproteasas, demostrando que células T tumorales (*in vitro*) secretan MMP-9 con aumento en la expresión y estímulo de IL-2, así como de las células tumorales (55).

Se postula que las células linfoides malignas pueden inducir la producción de MMPs, las cuales interactúan con componentes de la membrana basal, tales como la laminina, colágena tipo IV, proteoglicanos del tipo sulfato de heparan o en respuesta a interacciones con otros componentes celulares, como con las células endoteliales (57). La MMP-9 está aumentada en líneas celulares de linfoma infectado por EBV, principalmente cuando hay una mayor expresión de la oncoproteína LMP-1, lo que puede actuar como facilitador de la invasividad tumoral (58). Así, en la mayoría de las series estudiadas, se ha observado un pobre pronóstico, con mayor número de

recurrencia tumoral cuando hay aumento en la expresión de MMPs. De esta manera la medición en la expresión de la MMP-9 puede ser un marcador útil como factor pronóstico. Bajo este concepto, algunos estudios fueron dirigidos para inhibir la acción de las metaloproteasas en este tipo de linfomas, cuyos resultados aún han sido controversiales (57,59,60). En el caso particular de los linfomas angiocéntricos, hasta este momento no se han efectuado estudios para observar la expresión de metaloproteasas, así como tampoco para efectuar correlaciones de tipo pronóstico. Actualmente, se están desarrollando algunos agentes para bloquear la síntesis de metaloproteasas para prevenir que éstas interactúen con las moléculas que dirigen sus actividades a la superficie celular e inhibir su actividad enzimática (60). En especial el Marimastato que es un inhibidor de MMPs se ha utilizado en algunos tumores sólidos, como en cáncer gástrico avanzado, logrando estabilidad y aumento en el tiempo libre de enfermedad y supervivencia global, comparado con un grupo placebo (61).

## **2. Planteamiento del problema:**

Los linfomas son neoplasias malignas frecuentes de distribución universal, responsables de alrededor de 197, 000 muertes por año en el mundo. Los linfomas no-Hodgkin representan un grupo heterogéneo de neoplasias, con una amplia variación entre las diferentes regiones geográficas del mundo. En México, esta enfermedad ocupa el cuarto lugar entre los tumores malignos más frecuentes, considerándose un problema de salud pública. Dentro del grupo de linfomas no-Hodgkin, algunos son de presentación extra-ganglionar, de los cuales el 10 % se presentan en cabeza y cuello, principalmente en la región centrofacial. De éstos, la mayoría pertenecen a la categoría de linfomas extra-ganglionares de células T/NK,

tipo nasal. Su evolución por lo general es rápida, progresiva, destructiva, con gran participación e involucro óseo, tejidos blandos periorbitarios y ulceración de la piel. Debido a lo destructivo de la lesión y la rapidez de su curso clínico, la mayoría de los pacientes que son sometidos a estudios de biopsia, muestran extensas zonas de necrosis, lo que además de retrasar el diagnóstico, dificulta el manejo loco-regional y el empleo de terapia específica.

La necrosis observada en estos pacientes se ha atribuido a la interacción que muestran las células malignas T/NK con el EBV, al inducir factores de necrosis tumoral, además de la liberación de gránulos citotóxicos observados en las células linfoides malignas en contacto con las células endoteliales y pared del vaso sanguíneo. Sin embargo, hay que considerar que además de estos mecanismos, hay participación de enzimas proteolíticas que degradan moléculas de matriz extracelular, como las metaloproteasas.

Se han intentado diferentes modalidades de tratamiento para estos pacientes, sin haber alcanzado un modelo óptimo de manejo hasta la actualidad. Para entender el microambiente en el que se desarrolla este tipo de neoplasias y poder emplear agentes terapéuticos más específicos, se estudia la caracterización fenotípica de este tipo de linfomas extra-ganglionares de células T/NK del área centrofacial, así como su relación con moléculas citotóxicas y enzimas degradativas del tipo de las metaloproteasas, a fin de proponer una terapia específica capaz de disminuir la invasividad tumoral a los tejidos blandos y hueso.

### **Justificación:**

Los linfomas extraganglionares de células T/NK de tipo nasal, con frecuencia muestran un patrón de crecimiento angiocéntrico y angiodestructivo de la línea medio facial, con pronóstico habitualmente pobre a corto plazo, diseminación frecuente y alta mortalidad. Algunas evidencias sugieren que la actividad de las metaloproteasas, podría estar involucrada en la trasmigración de linfocitos al compartimiento vascular. En el caso

particular de los linfomas angiocéntricos, hasta este momento no se han efectuado estudios para observar la expresión de metaloproteasas.

### **Pregunta de investigación:**

¿ Qué metaloproteasas se expresan en linfomas angiocéntricos centofaciales y que tipo de células las expresan”

### **Objetivo General:**

El objetivo del presente estudio, fue determinar la expresión de diferentes tipos de metaloproteasas por reacciones de inmunohistoquímica e identificar el tipo de células que están participando en su secreción.

### **Objetivos particulares:**

- Evaluación de la expresión de diferentes clases de metaloproteasas en este tipo de linfomas extraganglionares de tipo nasal de células T/NK.
- Se correlacionó el tipo de células (tumoraes, estromales, endoteliales, epiteliales) que expresan cada uno de los tipos de metaloproteasas estudiadas.
- Se correlacionaron los datos generales de los pacientes y evolución de los pacientes con la presencia de las MMPs.
- Identificación de gránulos intracitoplásmicos en las células malignas a través de microscopía electrónica.

## **Metodología:**

Tipo de investigación: **Observacional**

Tipo de análisis: **Descriptivo**

Método de observación: **Transversal**

Temporalidad: **Retrospectivo**

Tipo de diseño: **Descriptivo**

## **Material y métodos:**

Del departamento de patología del Instituto Nacional de Cancerología, México, se obtuvieron 20 casos de linfoma de células T/NK tipo nasal, los cuales previamente fueron identificados por análisis inmunohistoquímico e hibridación *in situ*. Los casos seleccionados correspondieron a linfoma centrofacial de células T/NK CD 56+, relacionados a EBV (+), positividad citoplásmica a CD3, con expresión a proteínas asociadas a gránulos citotóxicos (TIA-1) y algunos de ellos (5 casos) a mutación de p53 (13, 62).

### Datos generales:

Del archivo clínico se obtuvieron datos clínicos de los 20 pacientes incluidos en el estudio, así, edad, sexo, localización del tumor, etapa clínica, tratamiento y seguimiento.

Nuevamente se revisaron las laminillas teñidas con hematoxilina y eosina, así como de inmunohistoquímica de todos los casos. El término de linfoma de células T/NK extra-ganglionar tipo nasal correspondió a la clasificación de la WHO (15). Estos casos estuvieron localizados en cavidad nasal, paladar y/o nasofaringe. Desde el

punto de vista histopatológico se corroboró angiocentricidad y angiodestrucción por las células linfoides atípicas, tipo celular, presencia de necrosis, afección a estructuras epiteliales y endoteliales.

#### Inmunohistoquímica:

Se efectuó estudio de inmunohistoquímica. La inmunotinción fue realizada en un equipo immunostainer automatizado (Dako Corp) de acuerdo a los protocolos de la compañía. Después de la desparafinación del tejido y rehidratación de las laminillas, éstas fueron colocadas en una olla de presión a 0.001 mol/L búfer de citrato pH 6.0 conteniendo 0.1% tween 20, y calentado en estufa de microondas con un máximo de 30 minutos, para recuperación antigénica. El panel de anticuerpos utilizados fueron MMP-1, MMP-2, MMP-3, MMP-9, y dos inhibidores de metaloproteasas TIMP-1 y TIMP-2 de Oncogene, Research Products (Boston, MA, USA); MMP-11 y MMP-13 de Neomarkers, Inc (Fremont, California, USA). Fueron utilizados de acuerdo a las indicaciones por catálogo de anticuerpos monoclonales. Los anticuerpos primarios diluidos a una concentración de 1:50 por 5 minutos. Se utilizó un segundo anticuerpo universal marcado con biotina. Esta inmunotinción se evaluó en células tumorales, estromales, en endotelio y en las células epiteliales residuales (epitelio de superficie y de los conductos). Para ello, se utilizó un microscopio de doble cabeza y con un objetivo de alta resolución (40 x) y el porcentaje de células positivas reportada de 0 a 100.

De los estudios de inmunohistoquímica se valoró la expresión de las metaloproteasas en porcentaje celular (rango 0 a 100%) e intensidad (0, +, ++, +++), así como en el tipo de células que la expresan. La expresión positiva fue evaluada

en células neoplásicas, endoteliales, estromales y del epitelio residual, ya sea epitelio de superficie o epitelio glandular y/o ductal. Cuando en los casos no hubo expresión inmunohistoquímica o esta fue leve ( + ) fueron considerados negativos; la expresión inmunohistoquímica ++ y +++ se consideraron positivos. De la misma manera, cantidad menor a 20% de células con inmunotinción fueron consideradas como negativas, 21% a más con inmunotinción consideradas como positivas.

#### Estudio de microscopia electrónica:

Se obtuvo material de dos casos para análisis ultraestructural. El material obtenido fue fijado en glutaraldehído. Incluidas en resina epóxica y se realizaron cortes finos para analizar la morfología del microambiente tumoral y seleccionar las áreas a fotografiar. Se utilizó un microscopio electrónico marca JEOL Modelo JEM 1010; contrastadas con acetato de uranilo y citrato de plomo.

#### Análisis estadístico:

Para evaluar la expresión de los anticuerpos monoclonales de las metaloproteasas se utilizó la prueba exacta de Fisher.

### **Resultados:**

#### Características de los pacientes e histopatología:

Los datos clínicos relevantes y la histología se resumen en la tabla 2. De los 20 pacientes, 13 fueron hombres y siete mujeres (M:F rango 1.8:1), con una mediana de edad de 43 (rango, 22 a 93 años). En 13 de los casos el tumor primario se

localizó en cavidad nasal (65%), cuatro casos en paladar y tres en nasofaringe (**Figura 3a y 3b**). En 12 pacientes el tratamiento fue quimioterapia y radioterapia combinada, cuatro pacientes sólo recibieron quimioterapia, tres únicamente radioterapia y un paciente falleció antes de iniciar cualquier esquema de tratamiento. Nueve pacientes presentaron enfermedad temprana (45%) (etapas clínicas I y II) y 11 pacientes (55%) en etapas clínicas avanzadas (III y IV). Catorce pacientes fallecieron con enfermedad (70%); cinco pacientes están vivos sin actividad tumoral; un paciente se encuentra con actividad tumoral y aún vive (Tabla 2).



**Tabla 2. Características clínico-histopatológicas de 20 pacientes con linfoma de células T/NK tipo nasal.**

CASO	EDAD	SEXO	LOCALIZACIÓN DEL TUMOR	HISTOLOGIA	CD56	ETAPA CLINICA	TRATAMIENTO	SEGUIMIENTO
1	57	M	Paladar	Mixto	+	III-B	QT+RT	MCE (10m)
2	30	F	Cav. nasal	Mixto	+	I-B	QT+RT	MCE (16m)
3	42	F	Cav. Nasal	Mixto	+	IV-B	QT	MCE (3m)
4	32	M	Paladar	Mixto	+	II-A	QT+RT	MCE (8m)
5	93	F	Cav. Nasal	Cél. grandes	+	II-B	RT	MCE (1m)
6	49	M	Cav. Nasal	Mixto	+	II-B	QT+RT	VST (16m)
7	38	M	Nasofaringe	Mixto	+	I-A	QT+RT	VST (10m)
8	23	F	Paladar	Mixto	+	II-B	QT+RT	VST (12m)
9	23	M	Nasofaringe	Mixto	+	III-A	QT+RT	VST (60m)
10	28	F	Cav. Nasal	Mixto	+	III-B	QT+RT	MCE (4m)
11	67	F	Nasofaringe	Mixto	+	III-B	QT+RT	MCE (36m)
12	43	M	Cav. nasal	Mixto	+	IV-B	QT	MCE (1m)
13	62	M	Cav. nasal	Mixto	+	II-B	RT	MCE (1m)
14	66	M	Cav. nasal	Cél. grandes	+	II-A	QT+RT	VST (60m)
15	36	M	Cav. Nasal	Mixto	+	IV-B	QT	MCE (1m)
16	54	M	Cav. Nasal	Mixto	+	IV-B	QT+RT	MCE (3m)
17	57	F	Cav. Nasal	Cél. grandes	+	IV-B	RT	MCE (1m)
18	63	M	Cav. Nasal	Mixto	+	I-A	QT+RT	VCT (132m)
19	22	M	Cav. nasal	Mixto	+	IV-B	No recibió	MCE (1m)
20	43	M	Paladar	Mixto	+	IV-B	QT	MCE (3m)



**Figura 3a**



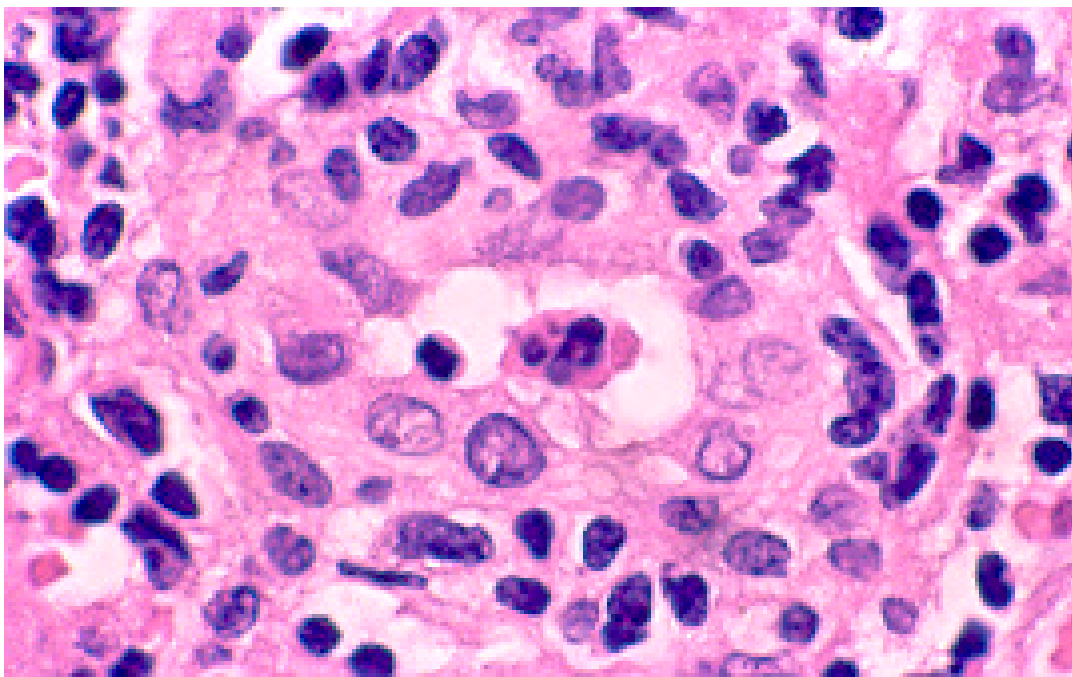
**Figura 3b**

*3a. Aspecto clínico en paciente con linfoma angiocéntrico de células T/NK que muestra lesión ulcerada destructiva de la línea medio facial y edema periorbitario.*

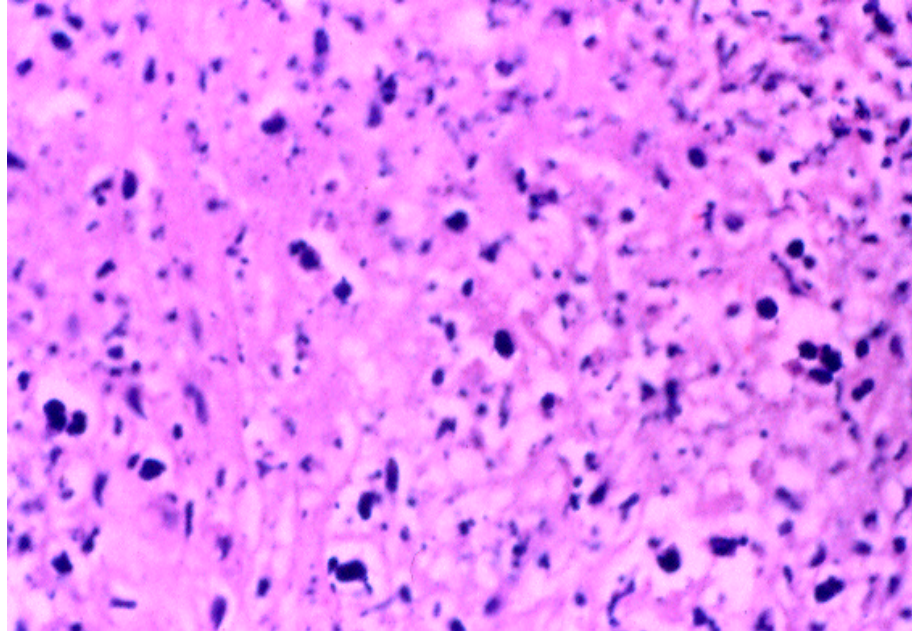
*3b. Paciente con mismo tipo de linfoma, con ulcera de paladar duro, con extensas zonas de necrosis.*

Desde el punto de vista histopatológico, todos los casos mostraron atipia en las células linfoides, con angiocentricidad, angiodestrucción (**Figura 4**), además se observó en todos los casos necrosis coagulativa focal o confluyente (**Figura 5**). El espectro morfológico de las células linfoides en relación con la atipicidad varió de caso a caso; la mayoría de los casos mostraron mezcla de células de tamaño mediano y grande (17 casos, 85%). (Tabla 2). Prominencia de las células endoteliales, fue una característica constante y frecuentemente se observó una mezcla de células inflamatorias incluyendo, plasmocitos, histiocitos, neutrófilos y

eosinófilos. Estas células estuvieron localizadas entre los nidos de células tumorales. Tres casos mostraron predominio de células grandes con núcleos vesiculosos, nucléolos aparentes y frecuentes mitosis; en éstos, el componente inflamatorio fue menos aparente.



**Figura 4.** *Aspecto histológico mostrando vaso sanguíneo con prominencia de las células endoteliales e invasión por células neoplásicas linfoides de diferentes tamaños con atipias (HE, 400 x).*



**Figura 5** *Linfoma de células T/NK nasal con extensas zonas de necrosis coagulativa (HE, 200 x).*

Hallazgos de inmunohistoquímica:

Todos los casos seleccionados fueron positivos para CD 56, EVB, TIA-1, y CD 3 citoplásmico (13, 61). La expresión de metaloproteasas 1, 2, 3, 9, 11,13 y TIMP-1, TIMP-2 y su distribución en el tejido se muestra en las Tabla 3 a la 7. Comparando la expresión entre las diferentes MMPs y su presencia en los diferentes tipos celulares, hubo significancia estadística comparando la expresión y distribución de la MMP-1 en las células tumorales ( $p= 0.008$ ), así como al relacionar MMP-11 en las células tumorales ( $p=0.006$ ), contra los otros tipos celulares (células epiteliales, endoteliales y estromales), así como contra el otro tipo de MMPs examinadas (MMP

2,3,9,13) (**Figura 6**). La MMP-1 estuvo presente en las células estromales en el 85% de los casos, siendo la única MMP que tuvo significancia estadística, comparativamente con el resto de las MMPs estudiadas en esta serie (P= 0.003). En relación con los inhibidores de las metaloproteasas, hubo 12 casos con positividad citoplásmica del TIMP-1 en el epitelio (66.6%). En cuatro de estos 12 casos se muestra intensa positividad en el epitelio de los conductos., lo que puede explicar la inhibición de la destrucción tisular y así conservación histológica de éstas estructuras, aún estando dichos conductos epiteliales inmersos en las células neoplásicas. El resto de las metaloproteasas y TIMP-2 no tuvieron significancia estadística (Tabla7) . Los casos positivos comprendieron a una distribución mayor o igual a 20% de las células y áreas a evaluar, cuya intensidad fue mayor a ++ y +++.

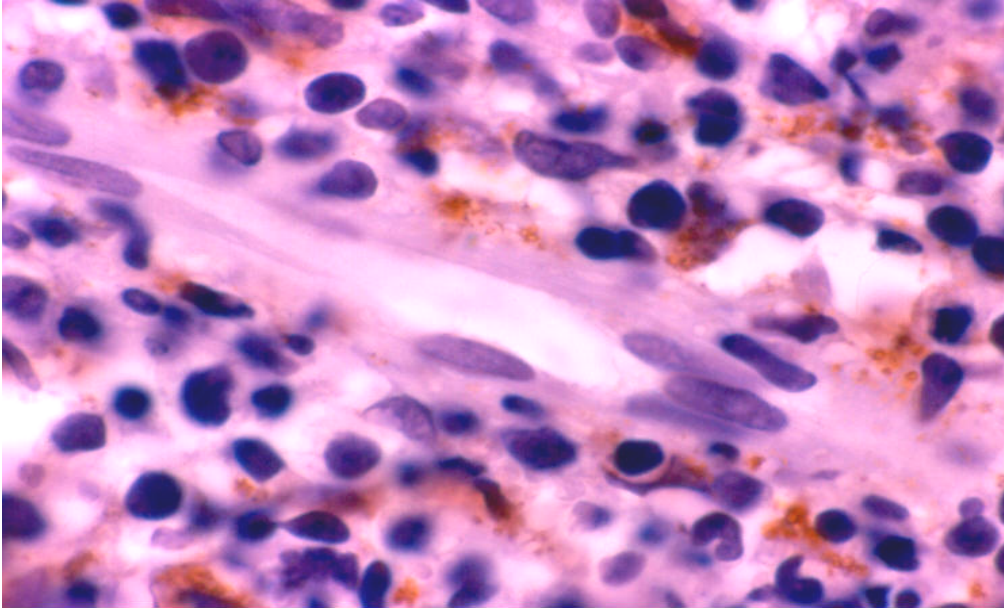


Figura 6. *Imagen microscópica mostrando expresión inmunohistoquímica a MMP-1 en el citoplasma de las células neoplásicas y tejido extracelular cercano a la pared de un vaso sanguíneo.*

**Tabla 3. Expresión de metaloproteasas en el tumor**

TUMOR								
CASOS	MMP. 1	MMP. 2	MMP. 3	MMP. 9	MMP. 11	MMP. 13	TIMP. 1	TIMP. 2
1	+	+	-	-	+	-	-	-
2	+	-	-	+	+	-	-	-
3	+	-	-	-	-	-	-	-
4	+	-	-	-	+	-	-	+
5	+	+	+	+	+	-	-	-
6	+	-	+	-	+	+	+	-
7	+	+	+	-	+	+	-	-
8	+	+	+	-	+	-	-	-
9	+	+	+	-	+	+	-	-
10	+	+	+	+	+	-	-	-
11	+	-	-	-	+	-	-	-
12	+	+	+	-	+	-	-	+
13	+	+	+	+	+	+	-	-
14	+	+	-	-	+	-	-	-
15	+	+	-	-	+	-	-	-
16	+	-	-	+	+	-	-	-
17	+	-	-	+	+	+	-	-
18	+	+	+	-	+	-	-	-
19	+	+	+	-	+	+	-	-
20	+	+	-	-	+	-	-	-

**Tabla 4. Expresión de metaloproteasas en el estroma.**

ESTROMA								
CASOS	MMP. 1	MMP. 2	MMP. 3	MMP. 9	MMP. 11	MMP. 13	TIMP. 1	TIMP. 2
1	-	+	-	-	-	-	-	-
2	-	-	-	-	-	-	-	-
3	+	-	-	+	+	+	+	+
4	-	-	+	+	+	-	-	+
5	+	+	+	-	+	-	-	-
6	+	-	-	-	+	-	+	-
7	+	+	+	-	+	+	-	-
8	+	-	-	-	-	+	-	-
9	+	+	+	-	+	+	+	-
10	+	+	+	-	-	-	-	-
11	+	-	+	-	+	-	-	-
12	+	-	+	-	+	-	-	-
13	+	+	+	-	-	+	+	-
14	+	-	+	+	-	-	-	+
15	+	-	-	-	+	-	+	-
16	+	-	-	-	-	-	+	-
17	+	-	-	-	-	-	+	-
18	+	-	-	+	+	-	-	+
19	+	+	-	-	+	+	+	-
20	+	-	-	-	+	-	+	-



**Tabla 5. Expresión de metaloproteasas en el epitelio.**

EPITELIO								
CASOS	MMP. 1	MMP. 2	MMP. 3	MMP. 9	MMP. 11	MMP. 13	TIMP. 1	TIMP. 2
1	+	+	+	-	+	+	+	-
2	-	+	+	-	+	+	+	-
3	-	+	+	-	+	+	-	-
4	+	+	-	-	+	-	-	-
5	+	+	-	-	+	+	+	-
6	+	-	-	-	-	-	-	-
7	+	+	+	-	+	+	+	-
8	+	-	-	+	-	-	+	+
9	+	-	+	-	+	-	+	-
10	+	+	+	-	-	-	-	-
11	+	-	+	-	+	-	-	-
12	-	+	-	-	+	+	+	-
13	+	-	-	-	-	-	+	-
14	-	-	-	-	-	-	-	-
15	-	-	-	-	-	-	-	-
16	-	-	-	-	-	-	-	-
17	+	+	+	-	+	+	+	-
18	-	+	-	-	+	+	+	-
19	-	+	-	+	+	-	+	+
20	-	-	+	+	-	-	+	+

**Tabla 6. Expresión de metaloproteasas en el endotelio.**

ENDOTELIO								
CASOS	MMP. 1	MMP. 2	MMP. 3	MMP. 9	MMP. 11	MMP. 13	TIMP. 1	TIMP. 2
1	-	-	-	-	-	-	-	-
2	-	-	-	-	+	-	-	-
3	-	-	-	-	-	-	+	-
4	-	-	-	-	-	-	-	-
5	-	-	-	-	-	-	-	-
6	-	-	-	-	-	-	+	-
7	-	+	+	-	+	-	+	-
8	-	-	-	-	-	-	-	-
9	+	-	-	-	-	-	-	-
10	+	+	-	-	-	-	-	-
11	-	-	-	-	+	-	-	-
12	-	-	-	-	-	-	-	-
13	-	-	-	-	-	-	-	-
14	-	-	-	-	-	-	-	-
15	-	-	-	-	+	-	-	-
16	-	-	-	-	-	-	-	-
17	-	-	-	-	-	-	-	-
18	-	-	-	-	-	-	-	-
19	-	-	-	-	-	-	-	-
20	-	-	-	-	-	-	+	-

**Tabla 7. Expresión de metaloproteasas MMP-1, 2, 3, 9, 11, 13 y los inhibidores TIMP-1, 2**

	<b>MMP-1</b>	<b>MMP-2</b>	<b>MMP-3</b>	<b>MMP-9</b>	<b>MMP-11</b>	<b>MMP-13</b>	<b>TIMP1</b>	<b>TIMP2</b>
<b>Epitelio</b>	+ 11 - 9	+ 11 - 9	+ 9 - 11	+ 3 - 17	+ 12 - 8	+ 8 - 12	+ 12 - 8	+ 3 - 17
<b>Tumor</b>	+ 20 - 0	+ 13 - 7	+ 10 - 10	+ 6 - 14	+ 19 - 1	+ 6 - 14	+ 1 - 19	+ 2 - 18
<b>Estroma</b>	+ 17 - 3	+ 7 - 13	+ 9 - 11	+ 4 - 16	+ 12 - 8	+ 6 - 14	+ 9 - 11	+ 4 - 16
<b>Endotelio</b>	+ 2 - 18	+ 2 - 18	+ 1 - 19	+ 0 - 20	+ 4 - 16	+ 0 - 20	+ 4 - 16	+ 0 - 20

**\* La distribución e intensidad es mayor en MMP-1 que en MMP-11.**

**\* La positividad es mayor al 50 % de las células y cercano a + + +.**

Hallazgos de ultraestructura:

Los casos estudiados desde el punto de vista ultraestructural, mostraron vasos capilares con prominencia de las células endoteliales e infiltrado de células de aspecto linfoide. Estas células mostraron hendiduras prominentes en su contorno nuclear y gránulos electrodensos en el citoplasma. Algunos gránulos se encontraban extracelularmente y en contacto con fibras de colágena subendotelial (Figuras 7 a y 7 b).

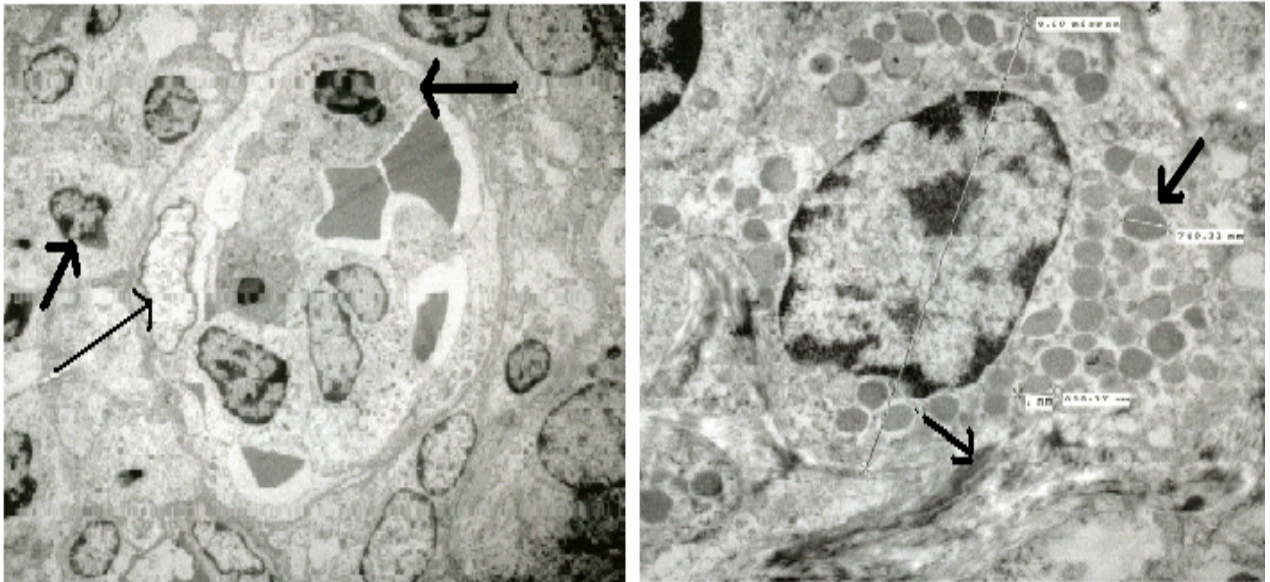


Figura 7a. *Ultraestructura de capilar, observándose núcleo de una célula endotelial en flecha delgada. En flecha gruesa, célula neoplásica con gránulos en el citoplasma. 7b. Acercamiento del anterior, en flecha delgada fibras de colágena fragmentadas. En flecha gruesa, gránulos intracitoplásmicos 13 000 A).*

## **Discusión:**

La cavidad nasal, paladar y en general la línea medio facial, son regiones continuamente estimuladas por numerosos antígenos extraños, creando una permanente y constante lucha entre antígenos y las células que participan en la defensa del huésped. Dentro de los agentes a los que el tejido mucoso de estas regiones se expone están los EBV, los cuales por una exposición crónica pueden dañar a las células asesinas naturales (NK) y linfocitos T, a través de sus receptores (CD 21), cuyas células a través del tiempo sufren transformación y dar lugar a linfomas angiocéntricos (13, 63).

Una vez establecida la lesión neoplásica en la cavidad nasal y/o región mediofacial, puede sufrir modificaciones individuales del huésped, cuya respuesta se traduce histológicamente por infiltrado inflamatorio de macrófagos, granulocitos, células linfoides y células plasmáticas, así como reduplicación de las células endoteliales de los vasos sanguíneos. Estas modificaciones tisulares pueden dificultar la realización del diagnóstico.

Es posible que la exposición crónica de las mucosas nasal y palatina al EBV, coadyuve con alguna predisposición racial y genética, y ello explique una mayor distribución geográfica observada en algunos países de Asia y Latinoamérica, incluyendo México, como uno de los países con un número cada vez mayor de pacientes (9,12,14,20).

Esta dualidad, EBV y respuesta tisular del huésped pueden llevar a la inducción de procesos enzimáticos que coadyuven a la destrucción de la matriz extracelular de la

pared de los vasos sanguíneos y así, la generación progresiva de zonas de necrosis de los tejidos blandos y de hueso. En un estudio previo, realizado a 23 casos de linfoma T/NK originarios de México, se demostró que 96% de éstos mostraron expresión de gránulos citotóxicos como TIA-1 y perforinas en las células neoplásicas (14), los cuales participan en la degradación de componentes extracelulares de la pared vascular. En esta serie 18, de 20 casos mostraron por inmunohistoquímica, positividad a TIA-1 y perforinas. Añadido a los estudios de inmunohistoquímica, dos de los casos de esta serie fueron analizados por ultraestructura, mostrando la presencia de gránulos en el citoplasma de las células neoplásicas. Estos gránulos se encontraron en la pared de los vasos sanguíneos y disgregando fibrillas de colágena subendotelial, sugiriendo una acción destructiva hacia la pared vascular y coadyuvando así a la angiodestrucción. Estos hallazgos han sido publicados por otros autores (63).

Estos fenómenos de angiodestrucción celular y necrosis podrían ser multifactoriales y además de los mecanismos mencionados, ser potencializados por la acción de enzimas proteolíticas, en particular las metaloproteasas. Estas MMPs degradan una amplia variedad de moléculas cuyos componentes principales son: fibronectina, laminina, vitronectina, colágena tipo IV, trombospondina, elastina, ácido hialurónico, factor VIII, heparan sulfato, proteoglicanos, entre otros (36). Además pueden activar y a su vez ser activados por factores de crecimiento y, con ello promover procesos de degradación, migración, diferenciación e invasión (32, 42). La expresión tumoral o estromal de estas enzimas ha sido asociada con un comportamiento más agresivo de las neoplasias malignas, en particular, de los carcinomas y coadyuvando a un pronóstico desfavorable para los pacientes (37,41,42,57). Otros estudios han

documentado la participación directa de la sobreexpresión de MMPs en el desarrollo y progresión de carcinomas epidermoides en las regiones de cabeza y cuello, cuya consecuencia es un pronóstico adverso (42,46).

Este fenómeno de invasión tumoral es explicable, considerando que las MMPs llevan a cabo mecanismos de ruptura de moléculas de la matriz extracelular. En particular en el tipo de linfomas angiocéntricos estudiados aquí, las MMP-1, presentes tanto en células tumorales como en estromales y de la MMP-11 en las células neoplásicas, en conjunto podrían estar llevando a cabo funciones de ruptura de elementos celulares relacionados con la pared de los vasos sanguíneos, como colágena tipo IV, laminina y fibronectina. En esta serie se demuestra que en el 100% de los casos las células tumorales expresaron MMP-1 y en 95% de los casos la MMP-11. Se ha mostrado que la MMP es secretada por las células tumorales en forma activa, y en este estudio inmunohistoquímico se muestra su expresión fenotípica en las células tumorales y con mayor presencia en relación cercana con los capilares sanguíneos. De la misma manera la MMP-1 entre otras, contribuye a la degradación de colágena intersticial y en colaboración con la expresión fenotípica de esta MMP en las células estromales (85% de los casos aquí estudiados), contribuir a la degradación de la pared de los vasos sanguíneos y tejidos blandos del huésped.

Hay algunos estudios que demuestran que las células de linfoma no Hodgkin degradan componentes de la matriz extracelular, a través de la expresión elevada de MMPs, principalmente se ha observado una mayor elevación de las MMP-9 y del TIMP-1, correlacionando estos hallazgos con un pobre curso clínico en los pacientes (56,59). Al respecto, resulta interesante que en algunas líneas de linfoma, la MMP-9 es inducida por EBV-LMP-1, en particular en linfoma de Burkkit (58). En estudios

experimentales de células tumorales de cultivo infectadas por EBV que expresan LMP-1 hay una sobre-expresión de MMP-9 activada a nivel de la LMP-1 a través de la vía del factor nuclear NFkB. Estos mismos estudios *in vitro*, utilizando salicilatos, demuestran que el uso de éstos (aspirina), disminuyen la capacidad invasiva de las líneas celulares tumorales, así como su capacidad de secreción de MMP-9 (60). En el presente trabajo se encontró que no hubo una mayor expresión de MMP-9, posiblemente debido a que en este tipo de linfomas extraganglionares de células T/NK, el mecanismo de activación de esta metaloproteasa este bloqueada intracelularmente, ya sea a nivel de señalización del NFkB o por un fenómeno de hipermetilación, mecanismos que habrá que estudiar.

En este estudio, además, prácticamente ninguno de los casos expresaron TIMP-1 ni TIMP-2 en las células tumorales, así como tampoco en las células endoteliales, hallazgos que sugieren un desbalance con predominio de la producción de metaloproteasas sobre los inhibidores y por ello, la relativa facilidad de las células neoplásicas y sus componentes químicos para destruir los componentes moleculares y celulares de la pared vascular, en particular de las células endoteliales. Sin embargo, en doce casos de esta serie, se observó una mayor expresión de TIMP-1 en las células epiteliales, principalmente a nivel de los conductos, cuyas estructuras mostraron poco daño morfológico, aún cuando se encontraban inmersas en las células tumorales. En tres pacientes de los cuatro casos donde hubo mayor expresión de TIMP-1 independientemente de la etapa clínica, los pacientes se encuentran vivos sin actividad tumoral entre 16 y 60 meses después de su tratamiento (casos 6 a 9). Este hallazgo puede ser debido a que las células epiteliales de los conductos anexos a las glándulas mucosas menores



secreten mayor cantidad de inhibidores en relación a las MMPs, al menos durante un periodo de la enfermedad.

En relación a las células endoteliales, esta serie muestra que en ninguno de los casos hubo expresión fenotípica de metaloproteasas, así como de ninguno de los dos inhibidores estudiados. El estudio inmunohistoquímico en este trabajo puede mostrar como expresión inmunofenotípica de MMPs en las células neoplásicas, al igual que el hallazgo ultraestructural de gránulos electrodensos son los contribuyentes en la destrucción de las células endoteliales. La falta de expresión de cualquiera de estas enzimas en las células endoteliales las hace blanco para su invasión y destrucción.

Como una nueva alternativa terapéutica, se están utilizando inhibidores sintéticos como el batismastato y marimastato, que son activos contra las MMPs y que parecen disminuir el crecimiento tumoral y reducir las metástasis pulmonares en carcinomas mamarios. En otro tipo de carcinomas humanos la respuesta farmacológica hasta el momento no ha sido exitosa debido a su baja vida media (64,65).

Como podrá observarse, los linfomas no Hodgkin representan un amplio y heterogéneo grupo de tumores, los cuales varían en su agresividad biológica y curso clínico. De esta manera, los linfomas extraganglionares de células T/NK tipo nasal, constituyen un grupo de linfomas con alta agresividad biológica, y los pacientes tienen limitadas opciones terapéuticas y un pronóstico habitualmente fatal a corto plazo (62). En el tipo de linfomas estudiado hubo una mayor expresión de las MMP-1 y 11 en las células neoplásicas. De ellas, la MMP-1 se ha asociado con un estado

de mayor proliferación celular y de agresividad, mientras que la MMP-11 además de su papel degradativo, actúan promoviendo la apoptosis de células neoplásicas (33,40).

Aoudjit et al (66), demostraron la inducción de algunas MMPs en linfomas de células T en contacto con las células endoteliales a través de la interacción de moléculas de adhesión intercelular (molécula 1/LFA-1).

Con los estudios publicados por otros autores y los hallazgos observados en esta serie, se puede explicar que este tipo de linfoma extraganglionar tipo nasal de células NK/T asociado a EBV debe su mayor agresividad a la presencia y participación de moléculas citotóxicas como las perforinas demostradas por estudios de inmunohistoquímica, a la presencia de gránulos secretorios observados por ultraestructura, así como a la evidencia de mayor expresión citoplásmica y extracelular de las metaloproteasas tipo 1 y 11, cuya inmuno-expresión se observó más intensa en cercanía con las células endoteliales de los vasos sanguíneos. La falta de expresión del resto de las metaloproteasas analizadas posiblemente se deba a una falta de inducción por el EBV o por otros mecanismos de bloqueo bioquímico, los cuales habrá que explorar. Para demostrar esto, habrá que realizar algunos estudios experimentales relacionados con las vías de señalización inducidas por el EBV y las MMPs.

En conclusión, este tipo de linfomas son un grupo particular de neoplasias agresivas, de distribución geográfica particular, predominante de países orientales y de Latinoamérica, asociados a EBV y acompañados histológicamente y clínicamente por extensas zonas de necrosis, explicados por la angioinvasión, angiodestrucción,

liberación de gránulos citotóxicos, así como por la participación en la degradación de la matriz extracelular y de la pared vascular por enzimas proteolíticas, en particular de las metaloproteasas MMP-1 y MMP-11 y probablemente este mecanismo este relacionado con el virus de Epstein-Barr.

Por lo mismo se puede sugerir el diseño de protocolos con el uso de algunos agentes inhibitorios de metaloproteasas sintéticos para bloquear la acción de MMP-1, MMP-11 y añadiendo el uso de aspirina para bloquear la acción de LMP-1 del EBV en la probable inducción de metaloproteasas.

Se puede señalar que hay una sobreexpresión fenotípica en las células neoplásicas linfoides de estirpe T/NK al menos la MMP-1 y 11. Además que las células estromales en un porcentaje significativo expresan la MMP-1. También se pudo demostrar que en este tipo de linfomas la expresión a MMP-2 y 9, no fue significativa como se ha observado en los carcinomas, particularmente de cabeza y cuello. En cuatro pacientes se mostró una mayor expresión fenotípica a TIMP-1 en las células epiteliales de los conductos, tres de los pacientes se encuentran vivos sin actividad tumoral, independientemente de la etapa clínica de ellos. De los trece pacientes que recibieron quimioterapia seguido de radioterapia, seis de ellos (46%), se encuentran vivos, en control y con un seguimiento postratamiento que varía de 10 meses a 132 meses, independientemente de la etapa clínica en que fueron diagnosticados. A pesar de que este trabajo muestra una serie corta de casos, puede sugerirse implementar protocolos de tratamiento dirigidos a inhibir la acción de ciertas metaloproteasas específicas y presentes en las células neoplásicas, así como intentar inhibir la producción de gránulos citotóxicos por parte de las células NK,

además de implementar el uso de salicilatos en linfomas expuestos a la expresión del EVB.

## Referencias:

1. Pisan P, Parkin DM, Bray F, Ferlay J. Estimates of the worldwide mortality from 25 cancers in 1990. *Int J Cancer* 1999;83:18-29.
2. Meneses y Mohar, Principales Neoplasias Malignas en México, 1999. Edit. Manual Moderno, México pp119-135.
3. Registro Histopatológico de las Neoplasias Malignas en México. Secretaria de Salud. Dir. Epidemiología. 1998.
4. Kassel SH, Echeverria RA, Guzzo FP. Midline malignant reticulosis (So-called lethal midline granuloma). *Cancer* 1969;23:920-935.
5. Jaffe ES. Pathologic and clinical spectrum of post-thymic T cell malignancies. *Cancer investigation* 1984;2:413-426.
6. Fechner RE, Lampin DW: Midline malignant reticulosis. A clinicopathologic entity. *Arch Otolaryngol* 1972; 95: 467-476.
7. Meneses García A, Zarate Osorno A, Sobrevilla Calvo P, Reynoso Gómez E, Ochoa Carrillo F, Gómez González E, Mohar Betancourt A. Linfoma Angiocéntrico centrofacial (Reticulosis polimorfa). Estudio clínico patológico de 35 casos. *Patología* 1993;31:163-168.
8. Sobrevilla CP, Meneses GA, Alfaro P, Bares JP, Amador J, Reynoso E. Radiotherapy compared to chemotherapy as initial treatment of angiocentric centrofacial lymphoma (Polymorphic reticulosis). *Acta Oncologica* 1993;32:69-72.

9. Liang R, Todd D, Chan TK, Chiu E, Lie A, Kwong YL, Choy D, Ho FCS. Treatment outcome and prognostic factors for primary nasal lymphoma. *J Clin Oncol* 1995;13:666-670.
10. Mc Bride P. Case of rapid destruction of nose and face. *J Laryngol Otolaryngol* 1897;12:64-66.
11. Harris NL, Jaffe ES, Stein H, et al. A revised European-American classification of lymphoid neoplasms: A proposal from the international lymphoma study group. *Blood* 1994;84:1361-1392.
12. Arber Da, Weiss LM, Albuja PF, Chen YY, Jaffe ES. Nasal lymphomas in Peru, high incidence of T-cell immunophenotype and Epstein-Barr virus infection. *Am J Surg Pathol* 1993;17:392-399.
13. Navarro-Roman L, Zarate-Osorno A, Meneses A, Kingma DW, Jaffe ES. High grade AIL and Epstein-Barr virus infection in 22 cases from Mexico. *Mod Pathol* 1994;7:117 A.
14. Elenitoba-Johnson K, Zarate A, Meneses A, Krenacs L, Kingma D, Raffelt M, Jaffe ES. Cytotoxic granular protein expression, Epstein-Barr virus strain type, and latent membrane protein-1 oncogene deletions in nasal T lymphocyte-natural killer cell lymphomas from Mexico. *Mod Pathol* 1998;11:754-761.
15. Harris NL, Jaffe ES, Diebold J, Flandrin G, Muller-Hermelink K, Vardiman J, Lister TA, Bloomfield CD. World Health Organization classification of neoplastic diseases of the hematopoietic and lymphoid tissues: Report of the clinical advisory committee meeting-Airlie House, Virginia, November 1997. *J Clin Oncol* 1999;17:3835-3849.
16. Epstein MA, Achong BG, Barr YM. Virus particles in cultured lymphoblasts from

- Burkitt's lymphoma. *Lancet* 1964;1:702
17. Lindhal T, Adams A, Bjursell G, et al. Covalently closed circular duplex DNA of Epstein-Barr virus in a human lymphoid cell line. *J Mol Biol.* 1976;102:511.
  18. Cohen JI, Wong F, Mannick J, Kieff E. Epstein-Barr virus nuclear protein 2 is a key determinant of lymphocyte transformation. *Proc Natl Acad Sci.* 1989;86:9558
  19. De Suuza YG, Greenspan D, Felton JR, et al. Localization of Epstein-Barr virus DNA in the epithelial cells of oral hairy leukoplakia by in-situ hybridization on tissue sections. *N Engl J Med* 1989;320:1559.
  20. Van Gorp J, Weiping L, Jacobse K, Yong HL, de Weger RA, Li G. Epstein-Barr virus in nasal T-cell lymphomas (polimorphic reticulosis/ midline malignant reticulosis) in western China. *J Pathol* 1994;173:81-87.
  21. Harabuchi Y, Yamanaka N, Kataura A, et al. Epstein-Barr virus in nasal T-cell lymphomas in patients with lethal midline granuloma. *Lancet* 1990;335:128-130.
  22. Kanavaros P, Leses M, Briere J, et al. Nasal T-cell lymphoma: a clinicopathologic entity associated with peculiar phenotype and with Epstein-Barr virus. *Blood* 1993;81:2688-2695.
  23. Ho FCS, Srivastava G, Loke SL, et al. Presence of Epstein-Barr virus DNA in nasal lymphomas of B and T cell type. *Haematol Oncol* 1990;8:271-281.
  24. Weiss LM, Gaffey MJ, Chen YY, Frierson HF. Frequency of Epstein-Barr viral DNA in "Western sinonasal and Waldeyer's ring non-Hodgkin's lymphomas. *Am J Surg Pathol* 1992;16:156-162.

25. Wang F, Gregory CD, Rowe M, et al. Epstein-Barr virus nuclear antigen 2 specifically induces expression of the B-cell activation antigen CD23. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987;84:3452-56.
26. Young L, Alfieri C, Hennessy K, et al. expression of Epstein-Barr virus transformation-associated genes in tissues of patients with EBV lymphoproliferative disease. *N Engl J Med* 1989;321:1080-85.
27. Smir BN, Hauke RJ, Bierman PJ, Gross TG, d'Amore F, Anderson JR, et al. Molecular epidemiology of deletions and mutations of the latent membrane protein 1 oncogene of the Epstein-Barr virus in post-transplant lymphoproliferative disorders. *Lab Invest* 1996;75:575-88.
28. Tsai C-N, Tsai C-L, Tse K-P, Chang H-Y, Chang Y-S. The Epstein-Barr virus oncogene product, latent membrane protein 1, induces the down-regulation of E-cadherin gene expression via activation of DNA methyltransferases. *PNAS* 2002,99:10084-10089.
29. Wang F, Gregory CD, Rowe M, et al. Epstein-Barr virus nuclear antigen 2 specifically induces expression of the B-cell activation antigen CD23. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987;84:3452-56.
30. Young L, Alfieri C, Hennessy K, et al. expression of Epstein-Barr virus transformation-associated genes in tissues of patients with EBV lymphoproliferative disease. *N Engl J Med* 1989;321:1080-85.



31. Smir BN, Hauke RJ, Bierman PJ, Gross TG, d'Amore F, Anderson JR, et al. Molecular epidemiology of deletions and mutations of the latent membrane protein 1 oncogene of the Epstein-Barr virus in post-transplant lymphoproliferative disorders. *Lab Invest* 1996;75:575-88.
32. Stetler-Stevenson WG, Liotta LA, Kleiner DE Jr. Extracellular metastasis : role of matrix metalloproteinases in tumor invasion and metastasis. *FASEB J* 1993;7:1434- 1441.
33. Egeblad M, Werb Z. New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression. *Nature Reviews/Cancer* 2002;2:161-174.
34. Brooks PC, et al. Localization of matrix metalloproteinase integrin avb3. *Cell* 1996;85:683-693.
35. Yu Q, Stamenkovic I. Localization of matrix metalloproteinase 9 to the cell surface provides a mechanism for CD44-mediated tumor invasion. *Genes Dev* 1999;13:35-48.
36. Ioachim EE, Athanassiadou SE, Kamina S, Carassavoglou K, Agnantis NJ. Matriz metalloproteinase expresión in human breast cancer: an immunohistochemical study including correlation with cathepsin D, Type IV collagen, Laminin, Fibronectin, EFGR, c-erbB2 oncoprotein, p53, steroid receptors status and proliferative activity. *Anticancer Res* 1998;18:1665-1770.
37. Vizoso PFJ, Martínez MA, Vázquez RJ, Lamelas SP, García MJL. Significación biológica y clínica de las enzimas proteolíticas y sus inhibidores en los carcinomas humanos. *Cir Esp* 2000;68:471-485.

38. Brian J, Wang Y, Smith MR, Kim H, Jacobs C, Jackman J et al. Suppression of in vivo tumor growth and induction of suspension cell death by tissue inhibitor of metalloproteinases (TIMP-3). *Carcinogenesis* 1996;9:1805 -1811.
39. Giannelli G, Falk-Mrzillier J, Schiriadi O, Stetler-Stevenson WG, Quranta V. Induction of cell migration by matrix metalloproteinase-2 cleavage of laminin-5. *Science* 1997;277:225-228.
40. Kajita M, et al. Membrana-type 1 matrix metalloproteinase cleaves CD44 and promotes cell migration. *J Cell Biol* 2001;153:893-904.
41. Scambia G, Benedetti-Panici P, Ferrandina G, Battaglia F, Baiocchi G, Mancuso S. Cathepsin D in ovarian cancer, correlation with pathological features and receptors for oestrogen, progesterone and epidermal growth factor. *Br J Cancer* 1991;64:182-184.
42. Kurahara S, Shinohara M, Ikebe T, et al. Expression of MMPs, MT-MMP, and TIMPs in squamous cell carcinoma of the oral cavity: correlations with tumor invasion and metastasis. *Head Neck* 1999;21:627-638.
43. Backer AH, George SJ, Zaltsman AB, Murphy G, Nawby AC. Inhibition of invasion and induction of apoptotic cell death of cancer cell lines by overexpression of TIMP-3. *Br J Cancer* 1999;79:1347-1355.
44. De Clerck YA, Perez N, Shimada H, Boone TC, Langley KE, Taylor SM. Inhibition of invasion and metastasis cells transfected with and inhibitor of metalloproteinases. *Cancer Res* 1992;52:701-708.
45. Coussens LM, Fingleton B, Matrisian L. Matrix metalloproteinase inhibitors and cancer: trials and tribulations. *Science* 2002;295:2387 -2392.

46. Polette M, Clavel C, Birembaut P, De Cleck YA. Localization by in situ hybridization of mRNA encoding stromelysin 3 and tissue inhibitors of metalloproteinases TIMP-1 and TIMP-2 in human head and neck carcinomas. *Path Res Pract* 1993;189:1052-1057.
47. Valente P, Fassina G, Melchiori A, Masiello L, Cilli M, Vacca A et al. TIMP-2 over-expression reduces invasion and angiogenesis and protects B16F10 melanoma cells from apoptosis. *Int J Cancer* 1998;75:246-253.
48. Zeng ZC, Cohen AM, Zhang ZF, Stetler-Stevenson W, Guillem JG. Elevated tissue inhibitor of metalloproteinase 1 RNA in colorectal cancer stroma correlates with lymph nodes and distant metastases. *Clin Cancer Res* 1995;1:899-906.
49. Sun Y, et al. P53 down-regulates human matrix metalloproteinase-1 (collagenase-1) gene expression. *J Biol Chem* 1999;274:11535-11540.
50. Sun Y, et al. Wild type and mutant p53 differentially regulate the gene expression of human collagenase-3 (hMMP-13). *J Biol Chem* 2000;275:11327-11332.
51. Sheu BC, et al. A novel role of metalloproteinase in cancer-mediated immunosuppression. *Cancer Res* 2001;61:237-242.
52. Meneses Abelardo, Verastegui Emma, Barrera JL, Zinser Juan, De la Garza Jaime, Hadden JH. Histologic findings in patients with head and neck squamous cell carcinoma receiving perilymphatic natural cytokine mixture (IRX-2) prior to surgery. *Arch Path Lab Med* 1998;122:447-454.
53. Gorelik L & Flavell RA. Immune-mediated eradication of tumors through the blockade of transforming growth factor-B signaling in T cells. *Nature Med* 2001;7:1118-1122.

54. Burke JS: The diagnosis of extranodal lymphomas and lymphoid hyperplasias ("pseudolymphomas") other than those involving the lung. In Jaffe ES (ed): *Surgical Pathology of the Lymph Nodes and Related Organs*. Philadelphia, PA, Saunders, 1985, p 298.
55. Natwhani BN: Diagnostic significance of morphologic patterns in lymph node proliferations. In Knowles DM (ed): *Neoplastic Hematopathology*. Baltimore, MD, Williams & Wilkins, 1992, p 407.
56. Stetler-Stevenson M, Mansoor A, Lim M, Fukushima P, Kehrl J, Marti G, Ptaszynski K, Wang J, Stetler-Stevenson WG. Expression of matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in reactive and neoplastic lymphoid cell. *Blood* 1997;89:1708-1715.
57. Liabakk NB, Talbot I, Smith RA, Wilkinson K, Balkwill F. Matrix metalloprotease 2 (MMP-2) and matrix metalloproteinase 9 (MMP-9) type collagenases in colorectal cancer. *Cancer Res* 1996;56:190-196.
58. Yoshizaki T, Sato H, Furukawa M, Pagano JS. The expression of matrix metalloproteinase 9 is enhanced by Epstein-Barr virus latent membrane protein 1. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998;95:3621-3626.
59. Kossakowska AE, Edwards DR, Prusinkiewicz C, Zhang MC, Guo D, Urbanski SJ, Grogan T, Marquez LA, Janowska-Wieczorek A. Interleukin 6 regulation of matrix metalloproteinase (MMP-2 and MMP-9) and tissue inhibitor of metalloproteinase (TIMP-1) expresión in malignant non-Hodgkin's lymphomas. *Blood* 1999;94:2080- 2089.
60. Murono S, Yoshizaki T, Sato H, Takeshita H, Furukawa M, Pagano JS. Aspirin inhibits tumor cell invasiveness induced by Epstein-Barr virus latent membrane

protein 1 through suppression of matrix metalloproteinase-9 expression.

Cancer Res 2000;60:2555-2561.

61. Hidalgo M, Eckhardt SG. Development of matrix metalloproteinase inhibitors in cancer therapy. *J Natl Cancer Inst* 2001;93:178-93.
62. Quintanilla-Martínez L, Kremer M, Séller G, Nathrath M, Gamboa-Domínguez A, Meneses A, Luna-Contreras L, Cabras A, Hoefler H, Mohar A, Fend F. p53 mutations in nasal natural killer/T-cell lymphoma from Mexico. Association with large cell morphology and advanced disease. *Am J Pathol* 2001;159:2095-2105.
63. Yamanaka N, Kataura A, Minase T, Sambe S, Ishi Y. Midfacial T-cell lymphoma: characterization by monoclonal antibodies. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 1985;94:207- 211.
64. Sledge GW, Qulali M, Goulet R, Bone EA, File R. effect of matrix metalloproteinase inhibitor batimastat on breast cancer regrowth and metastasis in athymic mice. *J Nat Cancer Inst* 1996;87:1546-1550.
65. Brown PD. Clinical studies with matrix metalloproteinase inhibitors. *APMIS* 1999;107:174-180.
66. Aoudjit F, Potworowski EF, St-Pierre Y: bi-directional induction of matrix metalloproteinase-9 and tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-1 during T-lymphoma/endothelial cell contact. Implication of ICAM-1. *J Immunol* 1998;160:2967-1971.

## p53 Mutations in Nasal Natural Killer/T-Cell Lymphoma from Mexico

### Association with Large Cell Morphology and Advanced Disease

Leticia Quintanilla-Martinez,\* Marcus Kremer,\*†  
Gisela Keller,† Michaela Nathrath,\*  
Armando Gamboa-Dominguez,†  
Abelardo Meneses,<sup>§</sup> Lourdes Luna-Contreras,<sup>§</sup>  
Antonello Cabras,\*† Heinz Hoefler,\*†  
Alejandro Mohar,<sup>§</sup> and Falko Fend†

From the Institutes of Pathology,\* GSF-National Research Center for Environment and Health, Neuberger, Germany; and Technical University,† Munich, Germany; and the Instituto Nacional de la Nutrición,<sup>§</sup> and the Instituto Nacional de Cancerología,<sup>§</sup> Mexico City, Mexico

Nasal NK/T-cell lymphoma is a unique form of lymphoma highly associated with Epstein-Barr virus, and with a characteristic geographic distribution. Recently, we showed that p53 is overexpressed in a high percentage of nasal NK/T-cell lymphomas. The aim of this study was to analyze the status of the p53 gene, and correlate it with the expression of p53 protein and its downstream target, the cyclin-dependent kinase inhibitor p21, in a series of 25 cases of well-characterized nasal NK/T-cell lymphoma from Mexico. The highly conserved exons 5 to 8 of the p53 gene were amplified by polymerase chain reaction and screened for mutations by denaturing high-pressure liquid chromatography. Abnormal polymerase chain reaction products detected by denaturing high-pressure liquid chromatography and additional selected cases were sequenced. In addition, the incidence of loss of heterozygosity at the p53 locus was analyzed in 12 cases. Of the 25 patients, 17 were male and 8 female (M:F ratio, 2.1:1), with a median age of 43 years (range, 21 to 93 years). Morphologically, most of the cases were composed of a mixture of medium-sized cells and large transformed cells (21 cases), and four cases were composed exclusively of large transformed cells. Three different groups determined by p53 gene status and expression of p53 protein were identified: group 1 was p53 +/p53 mutated (five cases, all with p53 missense mutations). Morphologically, three of the five cases were composed of large cells. All five cases revealed overexpression of p53 in the majority of the tumor cells with a mean of 86%. Unexpectedly, three of these cases also showed over-

expression of p21. Four of the five patients presented with clinical stage IVB and died with disease. Group 2 was p53+/p53 wild-type (10 cases). Histologically, nine cases were of the mixed type, and one of the large cell type. The percentage of p53 overexpressing cells was lower than in the previous group with a mean of 23%. p21 was positive in 7 of the 10 cases. Six patients in this group presented with clinical stages I to II and four patients with advanced disease (stage III and IV). Five patients are alive 12 to 120 months later (mean, 24 months), three with no evidence of disease. Group 3 was p53-/p53 wild-type (10 cases). All cases showed mixed cell morphology. p21 was positive in 5 of 10 cases. Four patients presented with clinical stage I to II and six patients with advanced disease. Four patients are alive with no evidence of disease 9 to 60 months later (mean, 10 months). Overall, p53 mutations were present in 24% (5 of 21) of the evaluable cases, all of them overexpressing p53 in the majority of tumor cells. Cases with p53 mutations were associated with large cell morphology ( $P = 0.0162$ ) and presented more often with advanced stage disease. Loss of heterozygosity at chromosome 17p was found only in 2 of the 12 (17%) cases investigated, both cases showed p53 mutations of the remaining allele. P21 overexpression (60% of cases) is frequent in nasal NK/T-cell lymphoma and seems to be independent of p53 gene status. The overexpression of p53 and p21, independent of p53 mutations, although as yet not clear, might be the result of Epstein-Barr virus infection, and warrants further investigation. (*Am J Pathol* 2001, 159:2095-2105)

Nasal natural killer (NK)/T-cell lymphoma is a distinct clinicopathological entity characterized by progressive necrotic lesions associated with frequent invasion and

Supported in part by grants from the Hochschulsonderprogramm of the Technical University of Munich (to M. N.) and by the German Science Fund Wilhelm Sander Stiftung (to L. Q. M. and F. F.).

Accepted for publication August 17, 2001.

Address reprint requests to Leticia Quintanilla-Martinez M.D., Institute of Pathology, GSF-Research Center for Environment and Health, Ingolstädter Landstrasse 1, D-85764, Oberschleissheim, Germany. E-mail: quintanilla-fend@gsf.de.

2095

destruction of blood vessels.<sup>1,2</sup> Although the midline nasal area is the most common site of presentation, nasal-type NK/T lymphoma may present in diverse extranodal sites such as gastrointestinal tract, skin, testis, liver, and spleen.<sup>3</sup> It is a relatively rare disease associated with a poor prognosis and a strong geographic predilection. Most cases are reported from Asia,<sup>4-6</sup> Mexico, and South America,<sup>7,8</sup> and this tumor is extremely rare in the United States and in Europe.<sup>9</sup>

Immunophenotypic and genotypic studies have shown that nasal NK/T-cell lymphomas, in addition to the almost universal association with Epstein-Barr virus (EBV),<sup>10,11</sup> express the NK cell marker CD56,<sup>12</sup> and are usually negative for surface CD3 (Leu4), although cytoplasmic CD3 can be detected in paraffin sections. This phenotype, together with the lack of clonal T-cell receptor gene rearrangements, strongly supports the notion that these tumors are derived from NK cells, and not from conventional T cells.<sup>13</sup>

Although our understanding of nasal NK/T-cell lymphoma has increased in the last years, very little is known about the cytogenetic and molecular changes of this disease.<sup>14</sup> This might be because, in part, of the small samples available with frequently extensive necrotic changes, and to the rarity of this entity. In a recent immunohistochemical study, we showed that p53 was over-expressed in a high percentage of cases of nasal NK/T-cell lymphoma from Peru.<sup>15</sup> However, the mutational status of the p53 gene was not determined.

In the present study of a series of nasal NK/T-cell lymphoma from Mexico, we aimed to investigate the frequency of p53 gene alterations [mutations and loss of heterozygosity (LOH)], and to correlate them with the expression of p53 protein, and its downstream target, the cyclin-dependent kinase inhibitor p21, as a surrogate marker of p53 functionality. In addition, we examined the potential prognostic implication of p53 alterations for clinical outcome.

## Materials and Methods

### Tissue Samples

Thirty-six paraffin-embedded blocks of nasal lymphoma biopsy material from the Instituto Nacional de la Nutrición and the Instituto Nacional de Cancerología, Mexico City, Mexico were studied. Eight cases immunophenotypically corresponded to B-cell non-Hodgkin's lymphomas (NHLs) and three cases showed extensive necrosis with lack of viable tissue and, therefore, were excluded from the series. The remaining 25 cases form the basis of this study. Clinical information was obtained from the patients' medical records. Hematoxylin and eosin-stained slides and immunoperoxidase studies were reviewed in all cases by two of the authors (LQ-M and FF). In addition, cytological features and immunophenotype were recorded. The term NK/T-cell lymphoma is used in this study as defined in the new World Health Organization classification<sup>16</sup> and corresponds to angiocentric lymphoma in the Revised European American Lymphoma

classification (REAL).<sup>17</sup> Cases of lymphoma presenting in nasal or paranasal tissues were included in this study if they showed expression of cytoplasmic CD3ε, cytotoxic granule associated proteins (TIA-1), EBERs, and in most cases CD56.

### Immunohistochemistry

Immunohistochemistry was performed on an automated immunostainer (Ventana Medical System, Inc., Tucson, AZ) according to the company's protocols, with slight modifications. After deparaffinization and rehydration, the slides were placed in a microwave pressure cooker in 0.001 mol/L citrate buffer, pH 6.0, containing 0.1% Tween 20, and heated in a microwave oven at maximum power for 30 minutes. The antibody panel used included L26 (CD20; DAKO, Glostrup, Denmark) polyclonal-CD3 (DAKO), CD56 (Novocastra, Newcastle, UK), TIA-1 (Coulter, Miami, FL), the monoclonal antibody DO7 against the wild-type/mutant p53 (DAKO), and p21 (BD Transduction Laboratories, San Diego, CA). Tissues were scored as p53-positive if  $\geq 10\%$  of the tumor cells had nuclear staining. Because p21 expression is found only in isolated lymphocytes and in the epithelium of normal tonsils, any staining  $\geq 5\%$  was considered positive. A grid ocular objective was used to count 300 cells over three high-power fields ( $\times 40$ ) and the percentage of positive cells was reported as 0 to 100%.

### In Situ Hybridization

*In situ* hybridization for EBV early RNA (EBER) was performed on fixed paraffin-embedded sections as previously described.<sup>15</sup> The *in situ* hybridization procedure was performed under RNase-free conditions. The fluorescein-conjugated EBER peptide nucleic acid probe was obtained from DAKO. A well-characterized EBV+ Hodgkin's lymphoma case was used as positive control.

### DNA Extraction and Polymerase Chain Reaction (PCR) Amplification of p53 Gene

Genomic DNA was extracted from serial, dewaxed paraffin sections mounted on glass slides. In the majority of cases, depending on the amount and distribution of the tumor infiltrate, neoplastic cells were enriched either by manual microdissection or by laser capture microdissection of hematoxylin-stained slides as previously described.<sup>18</sup> Adjacent sections stained for CD56 or p53 were used to identify the areas with the highest tumor cell content. The tissue fragments were digested with proteinase K overnight at 56°C, and the crude extract was used for PCR.

The highly conserved exons 5 to 8 of the p53 gene, including the intron/exon boundaries, were amplified by PCR. The primers used are listed in Table 1. The integrity of the DNA was assessed by amplification of a 268-bp fragment of the  $\beta$ -globin gene. The quality and correct size of the PCR products were checked on agarose gels.

**Table 1.** p53 Primers and PCR Conditions

Exon	Forward primer sequence	Reverse primer sequence	Amplicon length (bp)	Annealing-temperature (°C)
5	ATC TGT TCA CTT GTG CCC TG	AAC CAG CCC TGT CGT CTC TC	200	60
6	AGG GTC CCC AGG CCT CTG AT	CAC CCT TAA CCC CTC CTC CC	199	62
7	CCA AGG CGC ACT GGC CTC ATC	CAG AGG CTG GGG CAC AGC AGG	207	56
8	TTC CTT ACT GCC TCT TGC TT	TGT CCT GCT TGC TTA CCT CG	217	56

#### Denaturing High-Pressure Liquid Chromatography (DHPLC)

Mutational screening was performed according to the method described by Oefner and Underhill<sup>19</sup> on an automated DHPLC analysis system (Transgenomic, Omaha, NE). The PCR products were denatured for 4 minutes at 94°C and cooled to room temperature at a rate of 1°C/minute. Three to 15 µl of PCR product were applied to a preheated reverse-phase column (DNA-Sep, Transgenomic). Elution of DNA was performed in a linear acetonitrile gradient. The temperature for optimal resolution of heteroduplex and homoduplex DNA detection was determined by analyzing the melting behavior of each PCR fragment while the temperature was increased at 1°C steps beginning at 50 to 55°C until the fragment was completely melted. The optimal temperatures for the identification of mutations was established for each of the four examined exons using a set of test DNA samples with known mutations. The overall sensitivity of this method for the detection of p53 mutations in exons 5 to 8 is in the range of 95%. A detailed discussion of this technique is given in a separate report.<sup>20</sup> A mutation can be detected reliably, if ~10 to 20% of the PCR product shows the mutation. In cases with a high tumor cell content, DHPLC was performed both with and without admixture of wild-type PCR product of the corresponding exon to ensure detection of mutations, because absence of wild-type DNA as a result of LOH at the p53 locus, could potentially lead to a false-negative result.

#### Direct Sequencing

Automated fluorescent sequencing was performed with the BigDye Terminator Cycle Sequencing kit (PE Applied Biosystems, Foster City, CA) and ABI Prism 377 automated sequencer (PE Applied Biosystems). All chromatograms were evaluated independently by two observers (GK and FF). Comparison with the wild-type sequences was performed with DNASIS 2.6 software (Hitachi Software Engineering, Yokohama, Japan).

#### LOH Analysis

Normal and neoplastic tissues were obtained by laser capture microdissection of hematoxylin-stained slides as described above. The primer sequences of the microsatellite marker TP53 used in this study target a highly informative dinucleotide repeat polymorphism.<sup>21</sup> PCR amplification was performed using a TC1 thermal cycler (Perkin Elmer) under standard conditions in a final vol-

ume of 15 µl containing 2 µl of template DNA, 1.5 µl of 10× PCR buffer (15 mmol/L MgCl<sub>2</sub>, 0.5 mol/L KCl, 0.1 mol/L Tris-HCl, pH 9.0), 1.25 mmol/L dNTPs, 20 pmol of each primer oligonucleotide (forward primer is fluorescently labeled), and 1.5 U of *Taq* polymerase (Amersham Pharmacia). PCR cycles of denaturation, primer annealing, and extension were performed at 94°C for 30 seconds, 55°C for 30 seconds, and 72°C for 90 seconds for 35 cycles. Reaction products were separated and detected using an automated sequencer (ABI 377) and analyzed with the ABI Prism GeneScan software. LOH was defined as a reduction of one allele in tumor tissue by at least 50% when compared to the corresponding allele in normal tissue. Homozygous cases were considered to be not informative.

#### Statistical Analysis

The significance of the association of p53 mutations with morphology and clinical stage at presentation and the significance of overall survival and clinical stage was assessed using Fisher's exact test.

#### Results

##### Patient Characteristics and Histological Findings

Clinical data and histology are summarized in Table 2. Of the 25 patients, 17 were male and 8 female (M: F ratio, 2.1:1), with a median age of 43 years (range, 21 to 93 years). The most common presenting symptom was nasal obstruction. In 16 cases the tumor sample was from the nasal cavity, in 5 cases from the nasopharynx, and in 4 cases from the palate. Patients were treated with combined radiation and chemotherapy modalities in 15 cases, chemotherapy alone in 4 cases, and radiation alone in 1 case. Eleven patients presented with early stage disease (stage I to II), and 14 patients with advanced disease (stage III to IV). Thirteen patients died with disease; 1 patient declined treatment because of advanced disease, 2 patients died before treatment could be started, and 10 patients died despite treatment. Two of these patients initially had a complete response (cases 7 and 16) and died with recurrence of the disease at 16 and 8 months after the initial diagnosis, respectively. Nine patients are alive; seven with no evidence of disease, and two patients with disease. Three patients were lost to follow-up, one during the treatment period, and two patients (cases 2 and 11), because the treatment was declined.



**Table 2.** Clinicopathological Features from 25 Cases of Nasal NK/T-Cell Lymphomas from Mexico

Case	Age	Sex	Tumor sample	Histology	Stage	Treatment	Follow-up
Group 1. p53+/p53 mutated							
1	42	F	Nasal cavity	Mixed	IVB	CT	DwD 3 months
2	93	F	Nasal cavity	Large cell	IIB	Declined	LFU
3	57	F	Nasal cavity	Large cell	IVB	Declined	DwD <1 month
4	36	F	Nasopharynx	Large cell	IVB	***	DwD <1 month
5	36	M	Nasal cavity	Mixed	IVB	CT	DwD <1 month
Group 2. p53+/p53 wild type							
6	57	M	Palate	Mixed	IIIB	CT+RT	DwD 10 months
7	30	F	Nasal cavity	Mixed	IB	CT+RT	DwR 16 months
8	49	M	Nasal cavity	Mixed	IIB	CT+RT	ANED 16 months
9	21	F	Palate	Mixed	IIB	CT+RT	ANED 12 months
10	66	F	Nasopharynx	Mixed	IIIB	CT+RT	AwD 24 months
11	62	M	Nasal cavity	Mixed	IIB	Declined	LFU
12	65	M	Nasal cavity	Large cell	IIA	CT+RT	ANED 4 years
13	54	M	Nasal cavity	Mixed	IVB	CT+RT	DwD 3 months
14	22	M	Nasal cavity	Mixed	IVB	***	DwD <1 month
15	61	M	Nasal cavity	Mixed	IA	CT+RT	AwD§ 10 years
Group 3. P53-/p53 wild type							
16	32	M	Palate	Mixed	IIA	CT+RT	DwR 8 months
17	38	M	Nasopharynx	Mixed	IA	CT+RT	ANED 10 months
18	23	M	Nasopharynx	Mixed	IIIA	CT+RT	ANED 5 years
19	28	F	Nasal cavity	Mixed	IIIB	CT+RT	DwD 4 months
20	43	M	Nasal cavity	Mixed	IVB	CT	LFU
21	60	M	Palate	Mixed	IIB	CT+RT	ANED 9 months
22	53	M	Nasal cavity	Mixed	IB	CT+RT	ANED 9 months
23	36	M	Nasopharynx	Mixed	IIIB	RT	DwD 8 months
24	74	M	Nasal cavity	Mixed	IVB	CT	DwD <1 month
25	41	M	Nasal cavity	Mixed	IVB	CT+RT	DwD 3 months

\*\*\*Died before treatment could be started.  
 CT, chemotherapy; RT, radiotherapy; DwD, died with disease; LFU, lost to follow-up; AwD, alive with disease; ANED, alive no evidence of disease; DwR, died with recurrence of the disease; AwD§, the patient recurred locally after 10 years.

Histologically, the lymphoid infiltrate was either diffuse or patchy with angioinvasion identified in some of the cases. Karyorrhexis was usually prominent, and focal or confluent necrosis was frequently observed. The cytological spectrum differed from case to case, however, most of the cases were composed of a mixture of medium-sized cells and large transformed cells (21 cases) (Figure 1A). Cytological atypia characterized by nuclear irregularities and clumped chromatin were often identified. Inflammatory cells including neutrophils, eosinophils, plasma cells, and histiocytes, frequently were intermingled with the tumor cells. In the remaining four cases, the tumor was composed almost exclusively of large transformed cells with irregular nuclei, clumped chromatin and often prominent nucleoli (Figure 1B). The mitotic activity was high and the inflammatory component was less prominent.

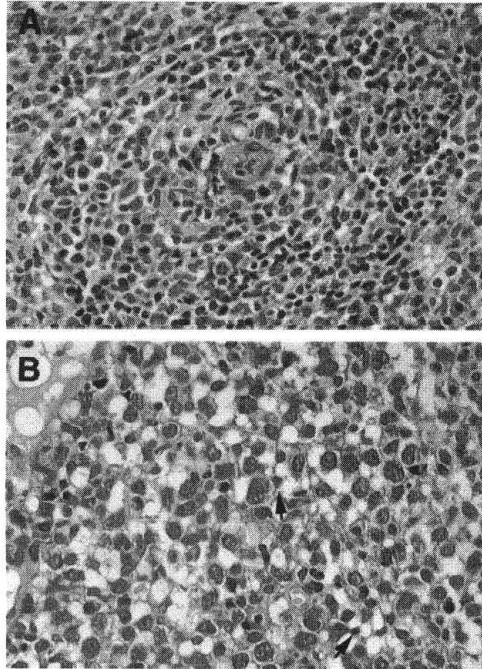
#### Immunohistochemical Findings and in Situ Hybridization

The results of the immunophenotypic studies and the EBV analysis are summarized in Table 3. All cases expressed CD3ε. The neoplastic cells showed CD56 expression in 20 of 25 cases (80%). TIA-1, which is a well-characterized cytotoxic molecule primarily restricted to cytotoxic T cells and NK cells, was strongly positive in the cytoplasm of the tumor cells in all cases. Overexpression of p53 was observed in >10% of the tumor cells in 15 of the 25 cases (60%). In 9 of these 15 cases the

percentage of p53+ cells ranged between 14% and 45%, the intensity of the expression varied from cell to cell in any given case. In the remaining six cases, p53 was strongly positive in >50% of the tumor cells. Overexpression of p21 was observed in 15 cases (60%). All cases showed labeling for EBERs in a large proportion of viable, neoplastic cells.

#### Mutational Analysis of the p53 Gene

The results of the mutational analysis are summarized in Table 3. Successful DNA amplification was obtained in 21 of the 25 cases. In 9 of 21 cases the mutational screening of exons 5 to 8 of the p53 gene showed an abnormal (five cases) or questionable (four cases) DHPLC pattern in at least one of the analyzed exons (Figure 2; A, B, and C). All PCR products showing an abnormal or questionable DHPLC pattern were subjected to direct sequencing of both DNA strands. In all five cases with abnormal DHPLC curve, missense mutations leading to amino acid substitutions were detected (one each in exon 5 and 6, and three in exon 7) (Figure 2C). In contrast, in none of the four questionable cases were p53 mutations found (Figure 2B). In addition, all four exons from the cases with a high level of p53 staining without abnormalities of the DHPLC pattern (cases 8, 9, 11, and 12), and further randomly chosen PCR products were sequenced. In none of these cases were p53 mutations identified.



**Figure 1.** A: Nasal lymphoma with angiomas. The neoplastic cells infiltrate the wall of a medium-sized vessel. The neoplastic infiltration is composed of a mixture of medium-sized cells and large transformed cells intermingled with rare eosinophils and plasma cells. B: In contrast to the previous example, the neoplastic population is composed of large transformed cells with cytological atypia, nuclear irregularities, and clumped chromatin. Note the presence of rare small lymphocytes (arrows). H&E; original magnifications,  $\times 400$ .

#### Correlation between p53 Gene Status, and p53 and p21 Protein Expression

Three different groups determined by the expression of p53 protein and p53 gene status were identified (Figure 3; A to D). Group 1 contained the five cases with p53 missense mutations. All five cases revealed strong nuclear overexpression of p53 in the majority of the tumor cells with a mean of 86% (range, 53 to 90%) (Figure 3A). Unexpectedly, three of these cases also showed overexpression of p21 (Figure 3B). Group 2 included the 10 cases that showed overexpression of p53, but retained wild-type (wt) configuration of the p53 gene in the nine amplifiable cases. The percentage of p53-positive cells was lower than in the previous group with a mean of 23% (range, 14 to 52%). Only one case in this group showed p53 positivity in  $>50\%$  of the tumor cells. Although this case revealed a normal DHPLC elution curve, direct sequencing of exons 5 to 8 was performed to corroborate the presumable wt status of the p53 gene. P21 was positive in 7 of the 10 cases including the case with high p53 expression (Figure 3C). Group 3 included 10 cases with low or null expression of p53. All seven amplifiable cases in this group showed a wt p53 gene. P21 was

overexpressed in 5 of the 10 cases. In two cases (cases 16 and 20) the expression of p21 was relatively high in comparison with the other tumors (Figure 3D).

#### Correlation between p53 Gene Status/Expression, Clinicopathological Characteristics, and Outcome

The tumor morphology and clinical characteristics of the patients were analyzed in the three different groups described above (Table 2). Group 1 included five cases of mutated p53+/p53. Histologically, three cases were composed of large transformed cells and two cases were composed of a mixture of medium-sized cells and large cells. Four patients in this group presented with advanced disease (Stage IVB) and died shortly after diagnosis. The fifth patient presented with stage IIB, declined treatment and was lost to follow-up. Group 2 included 10 cases of p53+/p53 wild type. Histologically, nine cases were composed of a mixture of medium and large-sized cells, and one case was composed predominantly of large cells. Five patients are alive 12 to 120 months later (mean, 24 months), three with no evidence of disease, and two with disease. The three patients that are alive with no evidence of disease presented clinically with stage IIA-B. Case 15 presented with stage IA and recurred locally (stage IA) after 10 years of complete remission. He is currently undergoing chemotherapy. Four patients died with disease, three of them had presented with advanced disease. Case 7 presented with stage IB and initially had a complete remission; however, 16 months later recurred and died with disease shortly thereafter. Case 11 presented with stage IIB, the patient refused treatment and was lost to follow-up. Group 3 included 10 cases of p53-/p53 wild type. Histologically, all cases in this group were composed of a mixed population of medium-sized and large cells. Four patients are alive with no evidence of disease 9 to 60 months later (mean, 10 months), three of these patients presented clinically with stages IA-B and IIB. Five patients died with disease, four of them presented with advanced disease. Case 16 presented with clinical stage IIA and had initially a complete remission, however, recurred 8 months later with disease in lung and liver and died with disease. Case 20 presented with clinical stage IVB and was lost to follow-up during the treatment period.

No significant differences in the frequency of the main clinical parameters, ie, B symptoms (100% versus 80% versus 70%), advanced disease (stage III and IV; 80% versus 40% versus 60%), and overall survival (0% versus 56% versus 44%) was observed between groups 1, 2, and 3. Nevertheless, it is of clinical interest that four of five (80%) patients in group 1 presented with stage IVB and died with disease. Furthermore, morphologically, three of five cases in group 1 were composed of large transformed cells (60%), in contrast to only one case in groups 2 and 3 (5%). Comparison between morphology and the presence of p53 mutations showed that nasal NK/T-cell lymphomas with large cell morphology were more likely to be associated with p53 mutations ( $P = 0.0162$ ).

**Table 3.** Immunophenotype, *in Situ* Hybridization and Mutation Analyses of the p53 Gene in 25 Cases of Nasal NK/T-Cell Lymphoma

Case	CD3	TIA-1	CD56	p21	p53	EBER	p53 Mutation			
							Exon	Codon	Nucleotide	Amino acid
Group 1. p53+/p53 mutated										
1	+	+	+	25%	53%	+	7	258	GAA-AAA	Glu → Lys
2	+	+	+	<5%	89%	+	5	134	TTT-CTT	Phe → Leu
3	+	+	+	<5%	86%	+	7	242	TGC-CGC	Cys → Arg
4	+	+	+	18%	52%	+	7	226	GGC-GAC	Gly → Asp
5	+	+	+	22%	90%	+	6	218	GTG-GAG	Val → Glu
Group 2. p53+/p53 wild type										
6	+	+	+	15%	26%	+	WT*			
7	+	+	+	32%	14%	+	WT†			
8	+	+	+	38%	45%	+	WT†			
9	+	+	+	<5%	29%	+	WT†			
10	+	+	neg	<5%	16%	+	WT†			
11	+	+	neg	35%	52%	+	WT†			
12	+	+	+	20%	30%	+	WT†			
13	+	+	+	<5%	14%	+	NA			
14	+	+	neg	12%	17%	+	WT†			
15	+	+	+	35%	20%	+	WT†			
Group 3. P53-/p53 wild type										
16	+	+	neg	41%	<5%	+	WT†			
17	+	+	+	35%	<5%	+	WT†			
18	+	+	+	<5%	<5%	+	NA			
19	+	+	+	27%	<5%	+	WT*			
20	+	+	neg	43%	<5%	+	WT†			
21	+	+	+	<5%	<5%	+	NA			
22	+	+	+	<5%	<5%	+	NA			
23	+	+	+	<5%	<5%	+	WT*			
24	+	+	+	25%	<5%	+	WT*			
25	+	+	+	<5%	<5%	+	WT†			

NA, DNA not amplifiable; WT, wild type.  
 \*The DHPLC pattern was suspicious for mutation, the sequence analysis was normal.  
 †The DHPLC pattern and sequence analysis were normal.  
 ‡The DHPLC pattern was normal, no sequence analysis was performed.

### LOH Analysis

Despite the use of laser capture microdissection, only 12 cases rendered sufficient normal tissue for LOH analysis. Three cases corresponded to group 1 (cases 1 to 3), six to group 2 (cases 6, 9, 10, 13 to 15), and three to group 3 (cases 16, 17, and 20). Analysis of informative loci showed LOH in 2 of 12 cases (17%), both of which were associated with p53 mutations of the remaining allele (cases 1 and 3) (Figure 4). In one case with p53 mutation in exon 5, no LOH was identified (case 2). One case in group 3 (case 17) was noninformative.

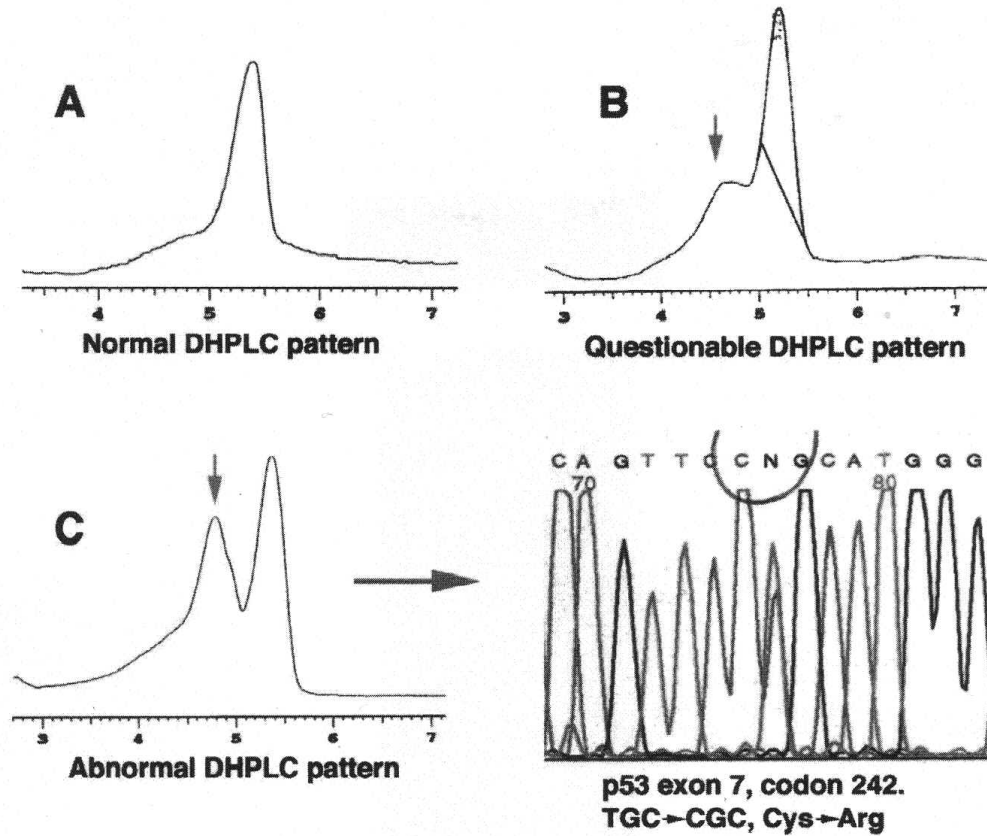
### Discussion

Recently, we reported that p53 was expressed in a high percentage of nasal NK/T-cell lymphomas from Peru.<sup>15</sup> In this study of nasal NK/T-cell lymphomas from Mexico, we extended our analysis to the genetic level. p53 mutations were identified only in a minority of cases (24%), and were restricted to tumors with high levels of p53 overexpression. Interestingly, cases with p53 mutations were associated with large cell morphology ( $P = 0.0162$ ) and presented more often with advanced stage disease.

The p53 gene is the most frequently mutated gene in human cancer, and the prototype of checkpoint regulator.<sup>22</sup> However, p53 gene mutations are relatively rare in

NHL. In a large study of B- and T-cell NHL, only Burkitt's lymphoma and progressed B-cell chronic lymphocytic leukemia (Richter's transformation) were associated with p53 mutations.<sup>23</sup> Among peripheral T-cell lymphomas, with the exception of adult T-cell leukemia/lymphoma,<sup>24</sup> p53 mutations are found in <10% of the cases.<sup>25</sup> In comparison, we found a relatively high incidence of p53 mutations in nasal NK/T-cell lymphoma from Mexico (24%). Accordingly, a high incidence of p53 mutations (47.6%) was also found in a recent study of nasal NK/T-cell lymphomas from Japan and China.<sup>26</sup> The incidence of p53 mutations observed in that study varied depending on the geographic origin of the patients, suggesting that the development of p53 mutations is influenced by geographic, environmental, or ethnic differences. The mutational pattern observed in the five cases in our study is similar to previous findings in NHL.<sup>23,27</sup> All mutations corresponded to missense mutations, with a predominance of transitions over transversions. However, none of our mutations involved a CpG dinucleotide or any of the predominant mutational hot spots. In contrast to our series, Li and colleagues<sup>26</sup> observed a relatively high percentage of silent mutations, as well as an absence of p53 expression in some cases with missense mutations. The reasons for these differences are not clear.

As a screening method for the detection of p53 mutations we used DHPLC, a relatively new technique based

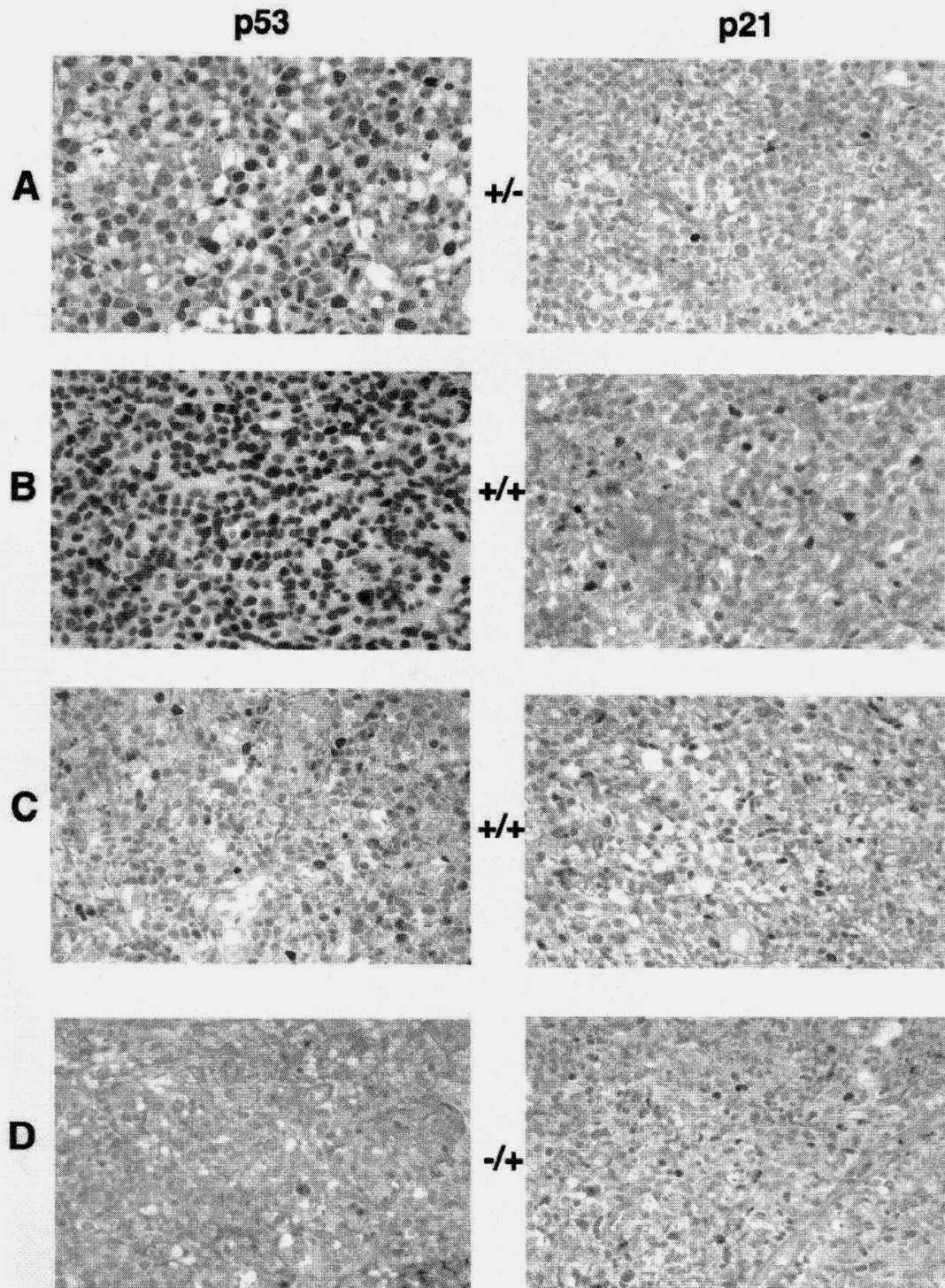


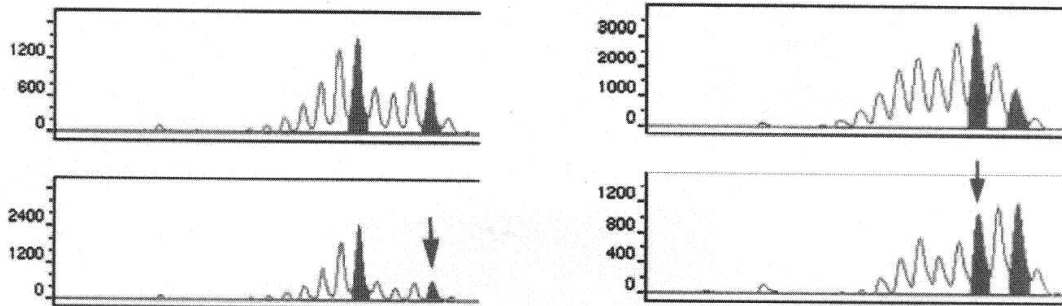
**Figure 2.** Mutational analysis of p53 in nasal NK/T-cell lymphomas from Mexico by DHPLC. **A:** A normal DHPLC melting curve of any given exon, suggestive of wild-type p53. **B:** A questionable DHPLC melting curve, suspicious in this case of a p53 mutation in exon 6. The sequence analysis was normal. The red arrow highlights the area where an equivocal second peak is seen. **C:** Abnormal DHPLC pattern strongly suggestive of a p53 mutation (red arrow). The sequence analysis confirmed a mutation in exon 7, codon 242 (case 3).

on the different melting characteristics of hetero- and homoduplex forms between wild-type and mutated DNA fragments.<sup>19</sup> Until now, the method has mainly been used to detect germline mutations in various inherited diseases for which a high degree of sensitivity ranging from 95 to 100% has been reported.<sup>28-31</sup> Compared to currently used conventional screening techniques including single-strand conformation polymorphism and denaturing gradient gel electrophoresis, DHPLC is an easy and reliable screening method that significantly reduces the screening time for large numbers of tumors. Its sensitivity, in the range of 95%, compares favorably with these more labor-intensive techniques. All mutations in this study confirmed by sequencing had shown a clearly abnormal DHPLC pattern. None of the PCR products with questionable (four cases) or normal DHPLC elution curves were found to have a mutation. Although we cannot completely exclude that mutations outside of the examined exons 5

to 8 were responsible for p53 overexpression in some of the cases of group 2, we consider this unlikely. Hematological neoplasms, in general, show a very low rate of mutations outside the conserved domain, and when present, these are frequently nonsense mutations not leading to p53 protein accumulation.<sup>27</sup>

In an effort to see whether the overexpressed p53 protein in cases of nasal NK/T-cell lymphoma with retention of wild-type p53 gene is functional, we studied the level of expression of its downstream target, the cyclin-dependent kinase inhibitor p21.<sup>22</sup> Previous studies have shown that the expression of p21 is a very good surrogate marker for the status of the p53 gene.<sup>32,33</sup> In cases with overexpression of wild-type p53, p21 protein is usually detectable, whereas the absence of p21 correlates with the presence of missense p53 mutations. To our surprise, even though most of the cases in group 2 (p53+/p53 wild-type) showed expression of p21, as ex-





**Figure 4.** LOH analysis. Electropherogram of normal/tumor pair in cases 1 and 3 (left and right side, respectively). The p53 informative locus is shown. The y axis represents the peak height in fluorescence units. **Top:** Amplification from normal tissue. The green peaks represent the heterozygous alleles. **Bottom:** Amplification from tumor tissue, the red arrows mark the lost allele.

pected, three of five cases with missense p53 mutations (group 1), as well as 5 of 10 cases without p53 expression also showed high expression of p21. This finding indicates that p21 is up-regulated independent of p53 gene status. An interesting, but still speculative possibility is that EBV might be responsible for, or contributes to p21 nuclear accumulation. Accordingly, in the study of Villuendas and colleagues<sup>32</sup> a tendency for EBV-positive cases to harbor high levels of both p53 and p21 was found, indicating that EBV could be involved in the nuclear accumulation of both proteins in NHL. In nasopharyngeal carcinoma, another EBV-associated malignancy, p53 gene mutations are rarely identified despite the frequent detection of p53 overexpression, again suggesting a role for EBV in the p53 accumulation in EBV-associated neoplasias.<sup>34</sup> A further support for the notion that EBV itself, rather than the neoplastic transformation, is responsible for p53 overexpression in tumors with wild-type p53 is the up-regulation of p53 in EBV-infected, nonneoplastic B-cells in infectious mononucleosis,<sup>35</sup> and in angioimmunoblastic T-cell NHL.<sup>36</sup> The mechanism(s) through which EBV could potentially achieve accumulation of p53 and p21 is still unresolved. For p53, several hypotheses have been proposed, including p53 binding to EBV nuclear antigen 5 (EBNA-5)<sup>37</sup> or ZEBRA protein,<sup>38,39</sup> and up-regulation of p53 through induction of nuclear factor kappa B (NF- $\kappa$ B) by EBNA-2 and LMP1.<sup>40</sup>

In accordance with the tumor suppressor gene model, mutation of one allele is often accompanied by deletion of the remaining allele, although this loss is not a requisite. In this study, of the 12 cases analyzed, only 2 cases (17%) showed LOH on chromosome 17p13, both of which showed p53 mutations of the remaining allele. A recent LOH study of different NK-cell neoplasias from China<sup>41</sup> showed that LOH at chromosome 17p13 occurred only in nasal NK/T-cell lymphoma (four of nine, 44%), with a higher incidence at presentation (three of six) than at relapse (one of three). However, in addition to

the small number of cases, the clinical stage of the patients at presentation was not mentioned, nor was a mutational analysis of p53 performed in that study.

Although the number of cases in our study is too small to allow any firm conclusion to be drawn, it is important to mention that four of the five patients whose tumors revealed p53 mutations, presented with advanced disease and died soon after diagnosis. Secondly, seven of the nine patients that presented with clinical stages I and II from whom follow-up was available, are alive, six with no evidence of disease. The seventh patient had recently a local recurrence after 10 years of complete remission. In contrast, 11 of 13 patients with stages III and IV are dead, some of them despite combined treatment. (overall survival, 78% versus 15%;  $P = 0.0059$ ) The high percentage of cases with advanced stages (III and IV) in this study, most probably reflects the fact that many patients in Mexico seek medical help late in their disease allowing it to take its natural course. Nevertheless, our data suggest that similar to other NHL subtypes,<sup>23,42,43</sup> p53 mutations in nasal NK/T-cell lymphoma are associated with tumor progression and late-stage disease. The outcome of the patients in this series is in agreement with other studies that have identified clinical stage as probably the most important prognostic parameter.<sup>44-51</sup> Although patients in stages I and II seem to have a good response to combined treatment, the relapse rate in extranodal sites, especially in those patients treated only with radiotherapy, is still relatively high and confers a poor prognosis.<sup>46,52,53</sup>

Interestingly, three of the five cases with p53 mutations revealed large cell morphology, in contrast to only 1 of the 20 cases without p53 mutations (60% versus 5%,  $P = 0.0162$ ). To our knowledge, there are no studies so far that have analyzed the possible relationship of morphology and molecular changes and/or prognosis in nasal NK/T-cell lymphoma. Our study indicates that large cell

**Figure 3.** Immunohistochemical study of p53 and p21 in nasal NK/T-cell lymphomas from Mexico with p53 missense mutations (A and B) and wild-type p53 gene (C and D). **A:** Nasal lymphoma with strong nuclear overexpression of p53 in the majority of tumor cells and negative p21 expression (case 3, group 1). **B:** In contrast to the previous example, note the positive nuclear expression of p21 in some tumor cells (case 5, group 1). **C:** Nasal lymphoma positive for p53 with variable nuclear intensity and p21 expression (case 11, group 2). **D:** Nasal lymphoma with p53 expression in <5% of tumor cells and high expression of p21 (case 17, group 3). Immunoperoxidase staining, original magnifications,  $\times 400$ .

morphology is associated with the presence of p53 mutation in this neoplasm.

In summary, p53 mutations in nasal NK/T-cell lymphoma from Mexico are present in 24% of the cases and show a good correlation with high overexpression of p53. LOH at chromosome 17p13 was found in 2 of 12 (17%) cases investigated, and associated with mutations of the remaining allele. p53 mutations are associated with large cell morphology and advanced disease, and thus, might be involved in tumor progression. So far, clinical stage seems to be the most important prognostic indicator. The overexpression of p53 and p21 independent of p53 gene status, although as yet not clear, might be the result of EBV infection and an important mechanism of viral pathogenesis.

### Acknowledgments

We thank Elenore Samson, Jacqueline Müller, Sandra Rath, and Birgit Geist for their expert technical assistance; and Dr. Peter Hutzler for his photographic assistance.

### References

1. Jaffe ES: Nasal and nasal-type NK/T cell lymphoma: a unique form of lymphoma associated with the Epstein-Barr virus. *Histopathology* 1995, 27:581-583
2. Jaffe ES, Chan JKC, Su I-J, Frizzera G, Mori S, Feller AC, Ho FCS: Report of the workshop on nasal and related extranodal angiocentric T/natural killer cell lymphomas. Definitions, differential diagnosis, and epidemiology. *Am J Surg Pathol* 1996, 20:103-111
3. Chan JKC, Sin VC, Wong KF, Ng CS, Tsang WYW, Chan CH, Cheung MMC, Lau WH: Nonnasal lymphomas expressing the natural killer cell marker CD56: a clinicopathologic study of 49 cases of an uncommon aggressive neoplasm. *Blood* 1997, 89:4501-4513
4. Ng CS, Chan JKC, Lo STH, Poon YF: Immunophenotypic analysis of non-Hodgkin's lymphomas in Chinese: a study of 75 cases in Hong Kong. *Pathology* 1986, 18:419-425
5. Ho FCS, Todd D, Loke SL, Ng RP, Khoo RKK: Clinicopathological features of malignant lymphomas in 294 Hong Kong Chinese patients, retrospective study covering an eight year period. *Int J Cancer* 1984, 34:143-148
6. Aozasa K, Ohsawa M, Tajima K, Sasaki R, Maeda H, Matsunaga T, Friedmann I: Nation-wide study of lethal mid-line granuloma in Japan: frequencies of Wegener's granulomatosis, polymorphic reticulosis, malignant lymphoma and other related conditions. *Int J Cancer* 1989, 44:63-66
7. Arber DA, Weiss LM, Albujar PF, Chen Y-Y, Jaffe ES: Nasal lymphomas in Peru. High incidence of T-cell immunophenotype and Epstein-Barr virus infection. *Am J Surg Pathol* 1993, 17:392-399
8. Elenitoba-Johnson KSJ, Zarate-Osorno A, Meneses A, Krenacs L, Kingma DW, Raffeld M, Jaffe ES: Cytotoxic granular protein expression, Epstein-Barr virus strain type, and latent membrane protein-1 oncogene deletions in nasal T-lymphocyte/natural killer cell lymphomas from Mexico. *Mod Pathol* 1998, 11:754-761
9. Gaal K, Sun NCJ, Hernandez AM, Arber DA: Sinonasal NK/T-cell lymphomas in the United States. *Am J Surg Pathol* 2000, 24:1511-1517
10. Kanavaros P, Lescs M-C, Briere J, Divine M, Galateau F, Joab I, Bosq J, Farcet J-P, Reyes F, Gaulard P: Nasal T-cell lymphoma: a clinicopathologic entity associated with peculiar phenotype and with Epstein-Barr virus. *Blood* 1993, 81:2688-2695
11. Chan JKC, Yip TTC, Tsang WYW, Ng CS, Lau WH, Poon YF, Wong CCS, Ma VWS: Detection of Epstein-Barr viral RNA in malignant lymphomas of the upper aerodigestive tract. *Am J Surg Pathol* 1994, 18:938-946
12. Ng CS, Chan JKC, Lo STH: Expression of natural killer cell markers in non-Hodgkin's lymphomas. *Hum Pathol* 1987, 18:1257-1262
13. Jaffe ES, Harris NL, Diebold J, Müller-Hermelink HK: World Health Organization classification of neoplastic diseases of the hematopoietic and lymphoid tissues. *Am J Clin Pathol* 1999, 111(Suppl1):S8-S12
14. Quintanilla-Martinez L, Jaffe ES: Aggressive NK cell lymphomas: insights into the spectrum of NK cell derived malignancies. *Histopathology* 2000, 37:372-374
15. Quintanilla-Martinez L, Franklin JL, Guerrero I, Krenacs L, Naresh KN, Rama-Rao C, Bhatia K, Raffeld M, Magrath IT: Histological and immunophenotypic profile of nasal NK/T cell lymphomas from Peru: high prevalence of p53 overexpression. *Hum Pathol* 1999, 30:849-855
16. Chan JKC, Jaffe ES, Raffkiaer E: Extranodal NK/T cell lymphoma, Nasal type. *Pathology and Genetics of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues*. Edited by ES Jaffe, NL Harris, H Stein, JW Vardiman. Lyon, World Health Organization Classification of Tumours and IARC Press, 2001, pp 204-207
17. Harris NL, Jaffe ES, Stein H, Banks PM, Chan JKC, Cleary ML, Delsol G, De Wolf Peeters C, Falini B, Gatter KC, Grogan TM, Isaacson PG, Knowles DM, Mason DY, Müller-Hermelink H-K, Pileri SA, Piris MA, Raffkiaer E, Warnke RA: A revised European-American classification of lymphoid neoplasms: a proposal from the International Lymphoma Study Group. *Blood* 1994, 84:1361-1392
18. Fend F, Quintanilla-Martinez L, Kumar S, Beaty MW, Blum L, Sorbara L, Jaffe ES, Raffeld M: Composite low grade B-cell lymphomas with two immunophenotypically distinct cell populations are true biconal lymphomas. A molecular analysis using laser capture microdissection. *Am J Pathol* 1999, 154:1857-1866
19. Oefner PJ, Underhill PA: DNA mutation detection using denaturing high performance liquid chromatography (DHPLC). *Curr Protocols Hum Genet* 1998, 19(Suppl):1-7
20. Keller G, Hartman A, Mueller J, Hoefler H: Denaturing high pressure liquid chromatography (DHPLC) for the analysis of somatic p53 mutations. *Lab Invest* 2001 (in press)
21. Jones MH, Nakamura Y: Detection of loss of heterozygosity at the human TP53 locus using a dinucleotide repeat polymorphism. *Genes Chromosom Cancer* 1992, 5:89-90
22. Levine AJ: p53, the cellular gatekeeper for growth and division. *Cell* 1997, 88:323-331
23. Gaidano G, Ballerini P, Gong JZ, Inghirami G, Neri A, Newcomb EW, Magrath IT, Knowles DM, Dalla-Favera R: p53 mutations in human lymphoid malignancies: association with Burkitt lymphoma and chronic lymphocytic leukemia. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991, 88:5413-5417
24. Cesarman E, Chadburn A, Inghirami G, Gaidano G, Knowles DM: Structural and functional analysis of oncogenes and tumor suppressor genes in adult T-cell leukemia/lymphoma shows frequent p53 mutations. *Blood* 1992, 80:3205-3216
25. Matsushima AY, Knowles DM, Chadburn A, Cesarman E: Post-thymic T-cell lymphomas frequently overexpress p53 protein but infrequently exhibit p53 gene mutations. *Am J Pathol* 1994, 144:573-584
26. Li T, Hongyo T, Syaifulin M, Nomura T, Dong Z, Shingu N, Kojya S, Nakatsuka S, Aozasa K: Mutations of the p53 gene in nasal NK/T-cell lymphoma. *Lab Invest* 2000, 80:493-499
27. Greenblatt MS, Bennett WP, Hollstein M, Harris CC: Mutations in the p53 tumor suppressor gene: clues to cancer etiology and molecular pathogenesis. *Cancer Res* 1994, 54:4855-4878
28. O'Donovan MC, Oefner PJ, Roberts SC, Austin J, Hoogendorn B, Guy C, Speight G, Upadhyaya M, Sommer SS, McGuffin P: Blind analysis of denaturing high performance liquid chromatography as a tool for mutation detection. *Genomics* 1998, 52:44-49
29. Gross E, Arnold N, Goette J, Schwarz-Boeger U, Kiechle M: A comparison of BRCA1 mutation analysis by direct sequencing, SSCP and DHPLC. *Hum Genet* 1999, 195:72-78
30. Nickerson ML, Weirich G, Zbar B, Schmidt LS: Signature-based analysis of mel proto-oncogene mutations using DHPLC. *Hum Mutat* 2000, 16:68-76
31. Holinski-Feder E, Müller-Koch Y, Friedl W, Moeslein G, Keller G, Plaschke J, Ballhausen W, Gross M, Baldwin-Jedele K, Jungck M, Mangold E, Vogelsang H, Schackert H, Lohse P, Murken J, Meitinger T: DHPLC mutation analysis of the hereditary nonpolyposis colon

- cancer (HNPC) genes hMLH1 and hMSH2. *J Biochem Biophys Methods* 2001, 47:21-32
32. Villuendas R, Pezzella F, Gatter K, Algara P, Sanchez-Beato M, Martinez P, Martinez JC, Muñoz K, Garcia P, Sanchez L, Kocialkowsky S, Campo E, Orradre JL, Piris MA: p21/WAF1/CIP1 and MDM2 expression in non-Hodgkin's lymphoma and their relationship to p53 status: a p53+, MDM2-, p21- immunophenotype associated with missense p53 mutations. *J Pathol* 1997, 181:51-61
  33. Chilosi M, Doglioni C, Magalini A, Inghirami G, Krampera M, Nadali G, Raphael D, Pedron S, Benedetti A, Scardoni M, Macri E, Lestani M, Menestrina F, Pizzolo G, Scarpa A: p21/WAF1 cyclin-kinase inhibitor expression in non-Hodgkin's lymphomas: a potential marker of p53 tumor-suppressor gene function. *Blood* 1996, 1996:4012-4020
  34. Guiley ML, Burton MP, Allred DC, Nicholls JM, Amin MB, Ro JY, Schneider BG: Epstein-Barr virus infection is associated with p53 accumulation in nasopharyngeal carcinoma. *Hum Pathol* 1998, 29: 252-259
  35. Ehsan A, Fan H, Eagan PA, Siddiqui HA, Guiley ML: Accumulation of p53 in infectious mononucleosis tissues. *Hum Pathol* 2000, 31:45-50
  36. Petit B, Leroy K, Kanavaros P, Boulland M-L, Druet-Cabanac M, Haïoun C, Bordessoule D, Gaulard P: Expression of p53 protein in T- and natural killer cell lymphomas is associated with some clinicopathologic entities but rarely related to p53 mutations. *Hum Pathol* 2001, 32:196-204
  37. Szekely L, Selivanova G, Magnusson KP, Klein G, Wiman KG: EBNA-5 an Epstein-Barr virus nuclear antigen, binds to the retinoblastoma and p53 proteins. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993, 90:5455-5459
  38. Dreyfus DH, Nagasawa M, Kelleher CA, Gelfand EW: Stable expression of Epstein-Barr virus BZLF1-encoded ZEBRA protein activates p53-dependent transcription in human Jurkat T-lymphoblastoid cells. *Blood* 2000, 96:625-634
  39. Zhang Q, Gutsch D, Kenney S: Functional and physical interaction between p53 and BZLF1: implications for Epstein-Barr virus latency. *Mol Cell Biol* 1994, 14:1929-1938
  40. Chen W, Cooper NR: Epstein-Barr virus nuclear antigen 2 and latent membrane protein independently transactivate p53 through induction of NF- $\kappa$ B. *J Virol* 1996, 70:4849-4853
  41. Siu LLP, Chan V, Chan JKC, Wong K-F, Liang R, Kwong Y-L: Consistent patterns of allelic loss in natural killer cell lymphoma. *Am J Pathol* 2000, 157:1803-1809
  42. Sander CA, Yano T, Clark HM, Harris C, Longo DL, Jaffe ES, Raffeld M: p53 mutation is associated with progression in follicular lymphomas. *Blood* 1993, 82:1994-2004
  43. Hernandez L, Fest T, Cazarola M, Teruya-Feldstein J, Bosch F, Peinado MA, Piris MA, Montserrat E, Cardesa A, Jaffe ES, Campo E, Raffeld M: p53 gene mutations and protein overexpression are associated with aggressive variants of mantle cell lymphoma. *Blood* 1996, 87:3351-3359
  44. Cuadra-Garcia I, Proulx GM, Wu CL, Wang CC, Pilch BZ, Harris NL, Ferry JA: Sinonasal lymphoma. A clinicopathologic analysis of 58 cases from the Massachusetts general hospital. *Am J Surg Pathol* 1999, 23:1356-1369
  45. Aviles A, Diaz NR, Neri N, Cleto S, Talavera A: Angiocentric nasal T/natural killer cell lymphoma: a single centre study of prognostic factors in 108 patients. *Clin Lab Haematol* 2000, 22:215-220
  46. Lei KI, Suen JJ, Hui P, Tong M, Li W, Yau SH: Primary nasal and nasopharyngeal lymphomas: a comparative study of clinical presentation and treatment outcome. *Clin Oncol* 1999, 11:379-387
  47. Li YX, Coucke PA, Li JY, Gu DZ, Liu XF, Zhou LQ, Mirmanoff RO, Yu ZH, Huang YR: Primary non-Hodgkin's lymphoma of the nasal cavity: prognostic significance of paranasal extension and the role of radiotherapy and chemotherapy. *Cancer* 1998, 83:449-456
  48. Cheung MM, Chan JK, Lau WH, Foo W, Chan PT, Ng CS, Ngan RK: Primary non-Hodgkin's lymphoma of the nose and nasopharynx: clinical features, tumor immunophenotype, and treatment outcome in 113 patients. *J Clin Oncol* 1998, 16:70-77
  49. Logsdon MD, Ha CS, Kavadi VS, Cabanillas F, Hess MA, Cox JD: Lymphoma of the nasal cavity and paranasal sinuses: improved outcome and altered prognostic factors with combined modality therapy. *Cancer* 1997, 80:477-488
  50. Harbo G, Grau C, Bundgaard T, Overgaard M, Elbrond O, Sogaard H, Overgaard J: Cancer of the nasal cavity and paranasal sinuses. A clinico-pathological study of 277 patients. *Acta Oncol* 1997, 36:45-50
  51. Nakamura S, Katoh E, Koshikawa T, Yatabe Y, Nagasaka T, Ishida H, Tokoro Y, Koike K, Kagami Y, Ogura M, Kojima M, Nara Y, Mizoguchi Y, Hara K, Kurita S, Seto M, Suchi T: Clinicopathologic study of nasal T/NK-cell lymphoma among the Japanese. *Pathol Int* 1997, 47:38-53
  52. Yu KH, Yu SC, Teo PM, Chan AT, Yeo W, Chow J: Nasal lymphoma: results of local radiotherapy with or without chemotherapy. *Head Neck* 1997, 19:251-259
  53. Kim GE, Cho JH, Yang WI, Chung EI, Suh CO, Park KR, Hong WP, Park Y, Hahn JS, Roh JK, Kim BO: Angiocentric lymphoma of the head and neck: patterns of systemic failure after radiation treatment. *J Clin Oncol* 2000, 18:54-63