



Universidad de Buenos Aires
Facultad de Farmacia y Bioquímica

**“ANÁLISIS DE LA PARTICIPACIÓN DEL VIRUS DE
EPSTEIN BARR EN LA PATOGÉNESIS DEL LINFOMA
DIFUSO A GRANDES CÉLULAS B Y SU INTERACCIÓN CON
EL MICROAMBIENTE TUMORAL”**

TRABAJO DE TESIS PARA OPTAR POR EL TÍTULO DE DOCTOR DE LA
UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

AUTOR: BIOQ. MELINA COHEN

DIRECTOR: DRA. PAOLA CHABAY

CONSEJERO DE ESTUDIOS: DRA. ÉLIDA ÁLVAREZ

LUGAR DE TRABAJO: LABORATORIO DE BIOLOGÍA MOLECULAR,
DIVISIÓN ANATOMÍA PATOLÓGICA, HOSPITAL DE NIÑOS RICARDO
GUTIÉRREZ

Buenos Aires, 2014

Trabajo de Tesis doctoral de la Bioq. Melina Cohen, para optar por el título de Doctor de la Universidad de Buenos Aires.

El presente trabajo de Tesis Doctoral titulado “Análisis de la participación del virus de Epstein Barr en la patogénesis del Linfoma difuso a grandes células B y su interacción con el microambiente tumoral”, fue realizado en el Laboratorio de Biología Molecular, División Anatomía Patología del Hospital de Niños Ricardo Gutiérrez bajo la dirección de la Dra. Paola Chabay.

V°B

Melina Cohen

Tesista

V°B

Dra. Paola Chabay

Directora

V°B

Dra. Élica Álvarez

Consejero de estudios

Parte de los resultados presentados en esta Tesis dieron origen a las siguientes publicaciones científicas:

- 1) “EBV-positive diffuse large B-cell lymphoma association is not only restricted to elderly patients” **Melina Cohen**, Marina Narbaitz, Fernanda Metrebián, Elena De Matteo, María V. Preciado And Paola A. Chabay. (2014). Int. J. Cancer. 135(12):2816-24. doi: 10.1002/ijc.28942.

- 2) “Epstein–Barr Virus presence in pediatric Diffuse Large B-Cell Lymphoma reveals a particular association and latency patterns: analysis of viral role in tumor microenvironment” **Melina Cohen**, Elena De Matteo, Marina Narbaitz, Fernanda Agost-Carreño, María V. Preciado And Paola A. Chabay. (2013). Int. J. Cancer. 132(7):1572-80. doi: 10.1002/ijc.27845

El presente trabajo ha sido financiado por:

- La Agencia Nacional de Promoción Científica y Técnica (ANPCyT):
 - Beca Inicial 07/2010-4/2013
 - Subsidio PICT N° 1071 (2007-2010)
 - Subsidio PICT N° 0478 (2011-2014)

- El Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET):
 - Beca Interna de Postgrado tipo II 4/2013-4/2015



AGRADECIMIENTOS

¡Qué tarea difícil! Los que me conocen saben que no soy una persona que se lleve mucho con las formalidades. Así que, fiel a mi estilo, voy a tratar de agradecer a todas las personas que han sido importantes en este camino que comencé hace mucho más de 4 años.

En primer lugar, agradecer a mi directora de tesis la Dra. Chabay (para mí siempre fue Pao), no solo por aceptarme (de segunda mano), brindarme la oportunidad de realizar mi doctorado y por transmitirme todo tu conocimiento, sino también por inculcarme confianza en mi trabajo, darme aliento cuando algo no salía bien y festejarlo cuando si salía, enseñarme que se pueden lograr muchas cosas si uno persevera lo suficiente. Que se puede ser un gran científico y a la vez tener una vida llena de experiencias y emociones por fuera de la ciencia. Y por mostrarme que aunque “la vida apesta”, de vez en cuando deja de hacerlo un poquito, ¿no?

A la Dra. Preciado (Vicky), por compartir humildemente, junto con Pao, toda su sabiduría en el tema, por incorporarme rápidamente al grupo a pesar de la falta de espacio, por ser guía de todos y a la vez darnos libertad. Por preocuparte por el crecimiento de la gente de tu grupo. Por demostrarme que se puede ser una grande, hacer mil cosas a la vez y aún así tener una familia, amigos y mucho más. Y por sobre todo, que lo más importante de un laboratorio es su gente y eso vale oro

A la Dra. Elida Álvarez, mi consejera de estudios, por brindarme su experiencia y consejo en muchos aspectos académicos (y no tanto) de esta tesis

Al CONICET y al ANPCyT por darme el apoyo institucional y los recursos necesarios para que este trabajo se desarrolle

Muchas gracias a la División Anatomía Patología del Hospital de Niños Ricardo Gutiérrez, a todos (patólogos y técnicos) por realizar el laburo de clasificar histologicamente muchos de los tumores incluidos en este trabajo y por compartir el espacio con nosotros. En especial a la Dra. Elena De Matteo, por su esencial

colaboración en el diagnóstico histológico y el recuento de poblaciones de los casos incluidos en este trabajo de tesis, y por la continua colaboración en todos los proyectos

A la División de Onco-Hematología del HNRG por permitirme acceder a la información de los pacientes contenida en las historias clínicas

A la División Patología del Instituto de Investigaciones Hematológicas de la Academia Nacional de Medicina por entusiasmarse con el proyecto y permitir que se lleve a cabo. Un agradecimiento especial a la Dra. Marina Narbaitz, la Dra. Fernanda Metrebián y el histotécnico Carlos Nastasi, por su invaluable y continua ayuda, por su buena onda y predisposición y por hacer que realmente sea un placer trabajar con ustedes

Del labo, les estoy agradecida a todos, los que estuvieron, están y estarán: Magui, Aldu, Romi, Mario, Pam, Dani, Juan, Gusy, Marce, Sandra (x2), Deby y Patri. Porque saben que parte de esta tesis les pertenece, si pude hacerla se debe a la buena onda que se vive todos los días y porque uno va al trabajo sabiendo que el grupo humano está lleno de gente hermosa, con la que comparte la mayor parte del día y cuya vida personal, con sus altibajos, son importantes en todos y cada uno de nosotros. Con algunos somos compañeros que traspasan el protocolo de un ensayo o los límites del laboratorio, somos AMIGOS. Gracias por bancar mis locuras y reírse conmigo, e incorporar los “afterlab” como un ritual de purificación de grupo que cada vez tiene más beodos... digo, ¡adeptos! ¡¡Los quiero!!

Como dije antes, mi camino científico comenzó hace más de 4 años, y no puedo dejar de agradecer a lo que fue mi primera casa, el IDEHU, donde di mis primeros pasos y conocí a muchas personas maravillosas que me enseñaron lo valioso de estar rodeado de buena gente. A Vir, mi gran compa y amiga del LIP, a los LIME (Ber, Andre, Santi, Mark, Pool, July y Mari), las Brucelitas (Romi, Cora y Sole), a los LIT (Marilyn y Carlis), LIBAP (Eli) y a muchos otros más que me brindaron su cariño y consejo en los 3 años que trabajé ahí, y que todavía lo siguen haciendo cuando voy de visita cada tanto

Voy a seguir con los que acompañaron este recorrido desde la amistad y, la mayoría sin ser “del palo”, me bancaron todos estos años, y principalmente estos últimos meses de “desaparición”: a Maxi, Pau, Ricky, Tefy, Migue, Guada, Juli, Facu, Mati, Sil, Vere, Yeipi, Marie y Martin. Gracias grupete por las salidas y charlas compartidas, por preguntarme por mi trabajo e interesarse y gracias simplemente por ser mis amigos. ¡¡Los adoro!!

Un lugar especial entre los amigos lo ocupan uds., mis grandes amigas, las que están cerca, las que están lejos y las que están muuuuy lejos, pero siempre en contacto y presentes en todos los momentos más importantes de cada una: Nani, Vera, Lau y Mumi. ¡Gracias a la vida que las cruzó en mi camino y elegimos compartirlo! ¡Como las quiero chicas! ¡¡Que haría sin uds.!!

A todas mis amigas y compañeras madres, gracias por darme sobrinos tan hermosos a los que besuquear y ver crecer con alegría

Obviamente, ni esta tesis ni muchas otras cosas más podrían haber sido si no fuera por mi familia. A mis hermanos, Eze y Gabi, gracias por compartir conmigo la infancia, y ahora, todos más grandes, compartimos nuestros logros y vivencias, muchas veces a la distancia, pero no por eso dejamos de acompañarnos. Y también a las cuñadas más lindas y cancheras del mundo: Hélène y Maru, gracias por hacer felices a mis hermanos. Mención especial para “la gorda” que me ayudó con algunos gráficos de la tesis, ¡que linda persona sos!

A mis viejos, agradecerles por todo lo que soy. Por criarme, educarme y por bancarme siempre, durante todos los años de facultad y los primeros de beca hasta que pudiera volar de casa. Ambos me enseñaron las cosas más importantes que hay que saber: mi viejo, que sin esfuerzo, constancia y dedicación no hay logros; y mi vieja, que todos esos logros sin disfrutar de la vida, no valen la pena. ¡¡Gracias por ser mi Yin y Yang en este mundo!!

A Katy (*Canidae*) y Puki (*Felidae*) por darme su amor incondicional de mascotas, ser mi terapia de mimos y soportarme redactando en voz alta muchas de las frases incluidas en este trabajo.

Finalmente, a vos Memé, tengo tanto que agradecerte... Gracias por estos 10 años de amor y compañía (de los cuales 7 corresponden a mi formación científica), por escuchar miles de veces cada una de mis presentaciones (sean seminarios, congresos o un poster) y darme tu sincera opinión, por leer mis trabajos, por aconsejarme y consolarme cada vez que sentí un “no llego”, por enviarme montones de papers e incentivar me en mi trabajo, por los mimos sin fin, por cocinar y limpiar mientras estuve escribiendo, por tu paciencia, por ser un excelente profesional y por querer ser un muchísimo mejor esposo todos los días. ¡Memé te amo infinitamente! ¡¡Gracias!!



RESUMEN

RESUMEN

El virus de Epstein Barr (EBV) es un virus oncogénico que infecta a más del 90% de la población mundial y presenta dos ciclos de infección: lítico y latente. En Argentina, la infección primaria ocurre a temprana edad y suele ser subclínica. El virus establece una infección de por vida en los linfocitos B de memoria, y es el ciclo latente el que está relacionado con patologías tumorales de origen linfoide.

El linfoma difuso a grandes células B (LDGCB) es el linfoma más frecuente en adultos. La OMS, en su clasificación del año 2008, incluyó una nueva entidad provisoria, el LDGCB EBV+ del adulto mayor, presente en pacientes mayores de 50 años inmunocompetentes, aunque se observó en algunos pacientes adultos jóvenes, con características similares. No se describió aún la presencia de EBV en LDGCB en adultos de nuestro país, ni en pacientes pediátricos a nivel mundial. La participación del virus en la patogénesis de esta entidad estaría relacionada con la inmunosenescencia inherente al envejecimiento, que causa una disminución en la respuesta de linfocitos T y permite la proliferación descontrolada de linfocitos B infectados. La interacción del virus con el sistema inmune del hospedador se describió *in vitro* y en linfoma de Hodgkin, donde el EBV modificaría las poblaciones celulares del microambiente por desregulación de sus citoquinas.

Nuestro objetivo fue determinar la participación del virus de EBV en la patogénesis del LDGCB en pacientes pediátricos, y adultos menores y mayores de 50 años de nuestro país. Además, nos propusimos caracterizar la conformación de ciertas poblaciones del microambiente tumoral en casos EBV+ y - de los 3 grupos etarios, a fin de determinar si la presencia del virus afecta su composición.

Se analizaron 102 casos de LDGCB: 52 pacientes adultos mayores de 50 años, 24 menores de 50 años y 26 pediátricos. Se realizó hibridación *in situ* (HIS) para EBERs, e inmunohistoquímica (IHQ) para EBNA2, EBNA3A, LMP1, LMP2A y BMRF1. Se determinó la expresión relativa de genes virales de latencia (EBNA1, EBNA2, EBNA3C, LMP1 y LMP2A) y líticos (BZLF1, BHRF1 y BLLF1) mediante PCR en tiempo real. Se caracterizó el microambiente tumoral en casos EBV+ y - en los 3 grupos etarios mediante IHQ para CD4, CD8, Foxp3, GrB y PD-1 junto con la

expresión de transcritos de IL-10, TGF β , IFN γ y CCL20. Finalmente, se compararon los datos obtenidos y se correlacionaron con los datos clínicos.

Establecimos un valor de corte del 20% de células tumorales EBERs+ para definir los casos como LDGCB EBV+, que exhibían características patogénicas virales diferenciales. Determinamos que la frecuencia del LDGCB EBV+ no se asoció a ninguna edad en particular. El perfil de latencia II y III junto con genes y antígenos del ciclo lítico predominó en todos los grupos. En los niños se observó una población mayoritaria linfocitos T CD8+ pero con menor fenotipo efector. Por el contrario, en los adultos jóvenes y mayores la población de células efectoras estaría conformada fundamentalmente por LT citotóxicos. En particular, los casos EBV+ tuvieron un aumento significativo en la población de células citotóxicas GrB+ de todas las edades. La presencia de PD-1 fue característica de los LDGCB. Finalmente, observamos una tendencia a una menor sobrevida libre de eventos (SLE) a los 2 años en los pacientes EBV+ comparados con los EBV-.

El desarrollo de linfomas aún en ausencia de EBV indica que el proceso de linfomagénesis en LDGCB sería multifactorial, involucrando genes virales, factores del hospedador e incluso ambientales. Sin embargo, en el LDGCB EBV+, el EBV cumpliría un rol en su patogénesis no solo en los casos mayores de 50 años, sino en todos los grupos etarios. Este hallazgo avala la sugerencia de revisión del criterio de edad definido por la OMS, resaltando la importancia de este trabajo de tesis.



CONTENIDOS

CONTENIDOS

1	INTRODUCCIÓN	1
1.1	VIRUS DE EPSTEIN BARR (EBV)	1
1.1.1	GENERALIDADES	1
1.1.2	ESTRUCTURA VIRAL Y EXPRESIÓN GÉNICA	2
1.1.2.1	GENES Y ANTÍGENOS DEL CICLO LÍTICO	4
1.1.2.2	GENES Y ANTÍGENOS DEL CICLO LATENTE	5
1.1.3	EPIDEMIOLOGÍA Y REPLICACIÓN	8
1.1.4	PERFILES DE LATENCIA DE EBV EN NEOPLASIAS ASOCIADAS	12
1.1.4.1	LATENCIA TIPO III	12
1.1.4.2	LATENCIA TIPO II	13
1.1.4.3	LATENCIA TIPO I	13
1.2	LINFOMAS NO HODGKIN	14
1.2.1	CONCEPTO Y CLASIFICACIÓN	14
1.2.2	EPIDEMIOLOGÍA DE LOS LNH-B	14
1.3	LINFOMA DIFUSO A GRANDES CÉLULAS B	16
1.3.1	CARACTERÍSTICAS Y EPIDEMIOLOGÍA	16
1.3.2	LDGCB EBV POSITIVO DEL ADULTO MAYOR	17
1.4	MICROAMBIENTE TUMORAL	20
2	HIPÓTESIS	24
3	OBJETIVOS	25
3.1	OBJETIVOS GENERALES	25
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	25
4	METODOLOGÍA	26
4.1	POBLACIÓN EN ESTUDIO	26
4.2	MUESTRAS	27
4.3	DIAGNÓSTICO Y CARACTERIZACIÓN HISTOLÓGICA	27
4.4	HIBRIDACIÓN IN SITU (HIS) PARA EBERS	27
4.5	INMUNOHISTOQUÍMICA (IHQ)	28
4.5.1	DETECCIÓN DE PROTEÍNAS VIRALES DE LATENCIA Y CICLO LÍTICO	28
4.5.2	CUANTIFICACIÓN DE LAS POBLACIONES CELULARES	32

4.6 AISLAMIENTO Y PURIFICACIÓN DE ARN	32
4.7 CUANTIFICACIÓN DE ARN TOTAL	33
4.8 OBTENCIÓN DE ADN COPIA (ADNC)	33
4.9 PCR EN TIEMPO REAL.....	34
4.9.1 DETERMINACIÓN DE LA EXPRESIÓN RELATIVA DE TRANSCRIPTOS VIRALES	34
4.9.2 DETERMINACIÓN DE LA EXPRESIÓN RELATIVA DE TRANSCRIPTOS DE CITOQUINAS Y QUIMIOQUINAS.....	36
4.9.3 CÁLCULO DE LA DE EXPRESIÓN GÉNICA	37
4.10 ANÁLISIS ESTADÍSTICO	38
5 RESULTADOS	39
5.1 CARACTERIZACIÓN DE LA POBLACIÓN ESTUDIADA.....	39
5.1.1 ESTADÍO CLÍNICO Y LOCALIZACIÓN ANATÓMICA	39
5.1.2 ANÁLISIS HISTOLÓGICO E INMUNOFENOTÍPICO.....	40
5.2 DETERMINACIÓN DE LA PRESENCIA DE EBV	41
5.3 DEFINICIÓN DE LOS PERFILES DE EXPRESION VIRAL.....	45
5.3.1 DETECCIÓN DE TRANSCRIPTOS VIRALES	45
5.3.2 DETECCIÓN DE ANTÍGENOS VIRALES	49
5.3.3 DEFINICIÓN DE PERFILES DE LATENCIA VIRAL EN LOS LDGCB EBV+.....	50
5.4 CARACTERIZACIÓN DEL MICROAMBIENTE TUMORAL.....	53
5.4.1 CARACTERIZACIÓN DE POBLACIONES CELULARES	53
5.4.1.1 ANÁLISIS DE LAS POBLACIONES CELULARES EN RELACIÓN CON EL GRUPO ETARIO.....	55
5.4.1.2 ANÁLISIS DE LAS POBLACIONES CELULARES EN RELACIÓN CON LA PRESENCIA DE EBV	57
5.4.2 DETERMINACIÓN DE TRANSCRIPTOS DE CITOQUINAS Y QUIMIOQUINAS	60
5.4.2.1 ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE TRANSCRIPTOS DE CITOQUINAS Y QUIMIOQUINAS EN RELACIÓN CON EL GRUPO ETARIO	61

5.4.2.2	ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE TRANSCRIPTOS DE CITOQUINAS Y QUIMIOQUINAS EN RELACIÓN CON LA PRESENCIA DE EBV	62
5.5	ANÁLISIS DE SOBREVIDA	64
6	DISCUSIÓN	67
7	CONCLUSIONES	91
8	REFERENCIAS	93
9	APÉNDICES	106
9.1	APÉNDICE A	106
9.2	APÉNDICE B	107
9.3	APÉNDICE C	114
9.4	APÉNDICE D	115
9.5	APÉNDICE E	116
9.6	APÉNDICE F	117
9.7	APÉNDICE G	118
9.8	APÉNDICE H	120
9.9	APÉNDICE I	121
9.10	APÉNDICE J	122

ABREVIATURAS

µg	microgramo
µl	microlitros
ADN	ácido desoxirribonucleico
ADNasa	desoxirribonucleasa
ADNc	ácido desoxirribonucleico complementario
Akt	proteína quinasa B (del inglés <i>serine/threonine-specific protein kinase</i>)
ANM	Academia Nacional de Medicina
ARN	ácido ribonucleico
ARNasa	ribonucleasa
ARNm	ARN mensajero
ATF-2	factor de transcripción activador 2 (del inglés <i>Activating Transcription Factor 2</i>)
AUROC	Área bajo la curva ROC
BARTs	transcriptos de ARN no traducibles expresados a partir del fragmento A de restricción por la enzima BamHI (del inglés <i>BamHI A Rightward Transcripts</i> .)
Bcl	proteína del linfoma de células B
BCR	receptor celular del linfocito B
BHRF1	del inglés <i>Bam HI fragment H rightward open reading frame 1</i>
BLLF1	gen que codifica la glicoproteína mayor de envoltura gp350/220
BMRF1	gen que codifica la proteína accesoria de la ADN polimerasa viral (<i>idem EA/D</i>)
BZLF1	del inglés <i>BamHI Z fragment leftward open reading frame 1</i>
CCL20	quimioquina tipo CC 20 (del inglés <i>Chemokine (C-C motif) ligand 20</i>)
CCR6	receptor de quimioquina tipo CC (del inglés <i>CC chemokine receptor protein 6</i>)
CD	<i>cluster</i> de diferenciación
CG	centro germinal
CHOP	(acrónimo para ciclofosfamida, vincristina, doxorubicina y prednisona)
C-jun	factor de transcripción C-jun
CMSP	células mononucleares de sangre periférica
CMV	citomegalovirus humano
CNF	carcinoma nasofaríngeo
Ct	ciclo umbral (del inglés <i>cycle threshold</i>)
CTLA-4	antígeno 4 del linfocito T citotóxico (acrónimo del inglés <i>cytotoxic T lymphocyte antigen-4</i>)
DAB	diaminobencidina
dNTPs	desoxinucleótidos trifosfato
DTT	ditiotreitól
E	eficiencia
EBERs	pequeños ARN codificados por EBV (del inglés <i>Epstein Barr Encoded RNAs</i>)
EBNAs	antígenos nucleares de Epstein Barr (del inglés <i>Epstein Barr nuclear antigens</i>)
EBV	virus de Epstein Barr
FITC	Isotiocianato de Fluoresceína

Foxp3	factor regulador de la transcripción (del inglés <i>forkhead box P3</i>)
GATLA	Grupo Argentino de Tratamiento de Leucemia Aguda
Gi	gen de interés
GrB	granzima B
Gref	gen de referencia
h	horas
H&E	Hematoxilina y Eosina
HHV-4	herpes virus humano 4
HIS	hibridación <i>in situ</i>
HIV	virus de inmunodeficiencia humana
HLA	complejo mayor de histocompatibilidad (del inglés <i>human leucocitary antigen</i>)
HNRG	Hospital de Niños Ricardo Gutiérrez
HPRT	hipoxantina-guanina fosforribosiltransferasa
HRP	peroxidasa de rábano picante, (del inglés <i>horseradish peroxidase</i>)
IgG	inmunoglobulina G
IFN γ	Interferón- γ
IgM	inmunoglobulina M
IHQ	inmunohistoquímica
IL-10	interleuquina 10
ITAM	motivos de activación en inmunorreceptores basados en tirosina (del inglés <i>Immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motif</i>)
JAK	quinasa Janus (del inglés <i>Janus kinase</i>)
Kpb	kilo pares de bases
LAG-3	gen de activación linfocitaria 3 (del inglés <i>lymphocyte activation gene-3</i>)
LB	linfoma de Burkitt
LCLs	líneas celulares linfoblastoideas
LDGCB	linfoma difuso a grandes células B
LF	linfoma folicular
LH	linfoma de Hodgkin
LL	linfoma linfoblástico
LMPs	proteínas latentes de membrana (del inglés <i>latent membrane proteins</i>)
LNH	linfomas no Hodgkin
LT	linfocitos T
LTc	LT citotóxicos
LTh	LT <i>helper</i>
LTreg	LT reguladores
MAP	proteína quinasa activada por mitógenos (del inglés <i>mitogen activated protein kinase</i>)
miARN	micro ARN
min	minutos
Mín-máx	mínimo-máximo
ml	mililitros
mM	milimolar
MNI	mononucleosis infecciosa
MUM-1 <i>Oncogene 1</i>)	oncogén de mieloma múltiple 1 (del inglés <i>Multiple Myeloma</i>

NBT/BCIP	cloruro de nitro-blue/5-bromo-4-cloro-3'-indolfosfato
NFκB	factor nuclear κB (del inglés <i>nuclear factor κB</i>)
ng	nanogramos
NK	Células <i>Natural Killer</i>
NTC	control sin templado (del inglés <i>no template control</i>)
OMS	Organización Mundial de la Salud
O.N	del inglés <i>overnight</i>
ORF	marco de lectura abierto (del inglés <i>open reading frame</i>)
pb	pares de bases
PBS	<i>buffer</i> fosfato salino
PCR	reacción en cadena de la polimerasa
PD-1	proteína de muerte programada 1 (del inglés <i>programmed death-1</i>)
PDL-1	ligando de la proteína de muerte programada 1
PEL	linfoma primario de cavidades (del inglés <i>primary effusion lymphoma</i>)
PI3K	fosfatidilinositol 3-quinasa (del inglés <i>phosphatidylinositol 3-kinases</i>)
PMA	12-O-tetradecanoilforbol-13-acetato (<i>idem</i> TPA)
PTLD	Desorden Linfoproliferativo Post Transplante
qPCR	<i>idem</i> PCR en tiempo real
RBPJκ:	proteína de unión a la señal de recombinación J-Kappa (del inglés <i>recombination signal-binding protein for J-Kappa</i>)
ROC	del inglés <i>Receiver Operating Characteristic</i>
rpm	revoluciones por minuto
RT	retrotranscripción
HRS	célula de Hogdkin Reed-Sternberg
seg	segundos
SFB	siero fetal bovino
SLE	sobrevida libre de eventos
STAT	traductor de señales y activador de la transcripción (del inglés <i>signal transducer and activator of transcription</i>)
TBS	Buffer Tris salino
TBS-T	TBS- <i>Tween</i> 20
TGFβ	factor de crecimiento transformante β (del inglés <i>Transforming Growth Factor</i>)
TNF	factor de necrosis tumoral (del inglés <i>tumor necrosis factor</i>)
TNFR	receptor del factor de necrosis tumoral (del inglés <i>tumor necrosis factor receptor</i>)
TPA	12-O-tetradecanoilforbol-13-acetato (<i>idem</i> PMA)
TRAD	dominios de muerte asociados a TNFR (del inglés <i>TNFR associated death domain</i>)
TRAFs	factores asociados a TNFR (del inglés <i>TNFR associated factors</i>)
UV	ultravioleta
VCA	antígeno de cápside viral (del inglés <i>viral capsid antigen</i>)



INTRODUCCIÓN

1 INTRODUCCIÓN

1.1 VIRUS DE EPSTEIN BARR (EBV)

1.1.1 GENERALIDADES

El virus de Epstein Barr (EBV) es un gamma herpes virus humano del género *Lymphocryptovirus* que infecta más del 90% de la población adulta mundial. Como miembro de este género, el EBV tiene tropismo hacia los linfocitos B y es capaz de infectar e inmortalizar estas células tanto *in vitro* como *in vivo* (Young y col. 2004)

El EBV fue descubierto en el año 1964 a partir de un linfoma derivado de células B, linfoma de Burkitt (LB), con características epidemiológicas, clínicas e histopatológicas particulares (Burkitt 1958; Epstein y col. 1964). Su capacidad de transformar linfocitos B *in vitro* se comprobó poco después de su descubrimiento (Henle y col. 1967; Pope y col. 1968).

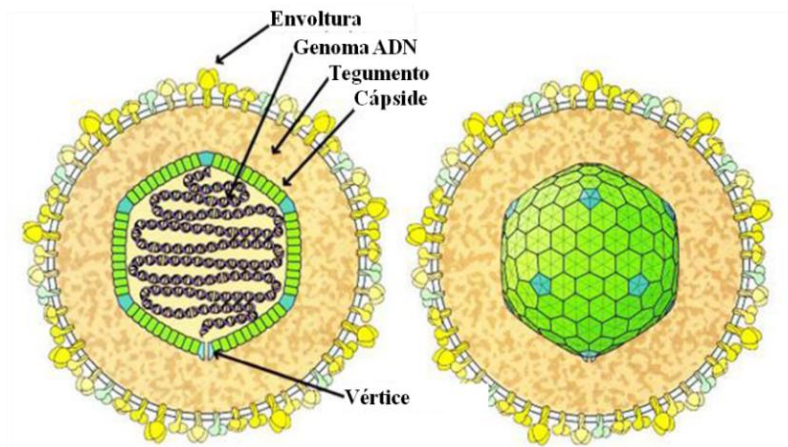
Durante la infección primaria por EBV, en los linfocitos B adyacentes a la mucosa faríngea, ocurre un primer ciclo replicativo o fase lítica del virus con producción de partículas virales infectivas, el cual es eficientemente controlado por el sistema inmune del hospedador. Luego de infectar los linfocitos B vírgenes y transitar la maduración a linfocito B de memoria, simulando una estimulación por antígeno, el virus establece una infección latente de por vida en estos linfocitos B de memoria en sangre periférica. Ocasionalmente, algunas de estas células B latentemente infectadas, entre 1 y 50 por cada millón, pueden experimentar la reactivación del virus, lo que resulta en la producción de nuevas partículas infecciosas a nivel de la faringe y en la posibilidad de que el virus se disemine entre la población (Cohen 2000).

En países subdesarrollados o en vías de desarrollo, la infección primaria por EBV en general ocurre durante la infancia temprana y es normalmente asintomática. Por el contrario, en países desarrollados la primoinfección, que se desencadena con mayor frecuencia en la adolescencia o en adultos, resulta en una patología benigna, auto limitada llamada Mononucleosis Infecciosa (MNI) (Klein y col. 2007). Esta enfermedad es también llamada “enfermedad del beso”. Los síntomas de la misma son consecuencia de la respuesta inmune generada ante la infección, la cual desencadena una linfocitosis atípica que está compuesta de linfocitos T CD4+ (LT *helper*, LTh) y CD8+ (LT citotóxicos, LTc) específicos contra el virus. La infección primaria es fácilmente diagnosticada por la detección de anticuerpos IgM dirigidos contra el

antígeno de cápside viral (VCA). Los anticuerpos contra las proteínas codificadas por el genoma de EBV involucradas en la infección latente y lítica se detectan de forma secuencial. La presencia de EBV también puede ser determinada en saliva, en líneas celulares linfoblastoideas establecidas (LCLs) y en células mononucleares de sangre periférica (CMSP) por técnicas de reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

1.1.2 ESTRUCTURA VIRAL Y EXPRESIÓN GÉNICA

Como otros miembros de la familia *Herpesviridae*, posee un genoma a ADN doble cadena rodeado por una cápside proteica icosaédrica compuesta por 162 capsómeros que conforman la nucleocápside viral. A su vez, ésta se encuentra rodeada de una matriz proteica, dispuesta asimétricamente, denominada tegumento. La envoltura viral es parte de la membrana nuclear interna de la célula infectada, la cual ha sido modificada mediante la inserción de las glucoproteínas virales. Éstas son las responsables de la interacción con receptores celulares específicos y en consecuencia determinan el tropismo celular de la partícula viral. La gp350, la más abundante de las glucoproteínas presentes en la envoltura viral, interactúa en forma específica con el receptor del componente C3d del complemento, el marcador celular CD21, presente en la superficie de los linfocitos B (Rickinson y col. 2007). Sumado a esto, las moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad tipo II (HLA-II) actúan como co-receptores mediante la interacción con la glucoproteína viral gp42 (Li y col. 1997).



Virus de Epstein-Barr

Familia: *Herpesviridae* (ANDdc)

Género: *Lymphocryptovirus*

Especie: Herpesvirus humano 4 (HHV-4)

Figura 1. Diagrama de la estructura del EBV (Adaptación de <http://cullenlab.duhs.duke.edu/>)

El genoma de EBV es una molécula de ADN doble cadena de 172Kpb que contiene aproximadamente 85 marcos de lectura abiertos (ORFs). La gran mayoría de ellos se expresan únicamente durante el ciclo lítico y solamente 12 son transcritos durante la latencia, de los cuales 9 se traducen a proteína (Rickinson y col. 2007). Como todos los otros miembros de la familia, el EBV presenta dos ciclos de infección; el ciclo lítico y ciclo latente (Rickinson y col. 2007). Los distintos ORFs del genoma de EBV se expresan en forma diferencial al establecer diversos tipos de infección (lítica o latente). Durante la fase replicativa o lítica del virus, se expresan todos los marcos de lectura, los cuales se clasifican en inmediatamente tempranos, tempranos y tardíos. Por su parte, durante el ciclo latente, el virus regula en forma negativa la expresión de la mayoría de sus genes y solo expresa un subgrupo de ellos, los denominados genes de latencia, y de esta forma puede establecer una infección latente de por vida en los linfocitos B memoria, evadiendo así al sistema inmune del hospedador. Estos antígenos de latencia son: seis antígenos nucleares de Epstein Barr (*Epstein Barr Nuclear Antigens, EBNA*s), tres proteínas latentes de membrana (*Latent Membran Proteins, LMP*s), dos transcritos de ARN no traducibles, (*Epstein Barr Encoded RNAs, EBER*s) y los transcritos de ARN no traducibles expresados a partir del fragmento A de restricción por la enzima

BamHI (*BamHI* “A” *Rightward Transcripts*, *BARTs*) (Rickinson y col. 2007). Actualmente se han descrito cuatro perfiles de latencia asociados a la infección latente por EBV que dependen del tipo celular infectado (linfocito B virgen, de centro germinal o de memoria) o de la neoplasia asociada. Estos perfiles se describen en forma detallada en la sección 1.1.4.

1.1.2.1 GENES Y ANTÍGENOS DEL CICLO LÍTICO

Los genes de ciclo lítico se expresan en la primoinfección o bien durante la reactivación de la infección *in vivo* o la inducción lítica *in vitro* de células infectadas latentemente. Si bien en los portadores sanos la mayoría de las células infectadas por EBV están en ciclo de latencia, con expresión nula o limitada de antígenos, un pequeño porcentaje de las células puede expresar el patrón de ciclo lítico, fundamentalmente en orofarínge, y dicho porcentaje puede aumentar en el caso de una reactivación.

Genes inmediatamente tempranos: Son los genes BZLF1 y BRLF1 que codifican para los antígenos Zta y Rta, respectivamente. Estos genes se transcriben inmediatamente luego de la infección, sin necesidad de síntesis *de novo* de proteínas virales, y su expresión no se altera si se inhibe la síntesis de ADN viral. Dichos antígenos poseen la capacidad de unirse a la región promotora de los genes virales tempranos y activar su transcripción, por lo cual actúan como factores de transcripción viral. Son los responsables del cambio del ciclo de latencia al ciclo lítico, momento en el cual su activación desencadena una cascada de eventos que conllevan a la expresión secuencial de proteínas virales tempranas y tardías del ciclo lítico (Rickinson y col. 2007).

Genes tempranos: Entre estos se describieron a los genes BGLF5 (ADNasa alcalina), BARF1 y BORF2 (ribonucleótido reductasa), BXLF1 (timidina quinasa), BALF5 (ADN polimerasa), BALF2 (proteína putativa de unión al ADN), BLRF2 (p23), BMRF1 (antígeno temprano difuso EA/D, factor de procesividad y replicación) y BHRF1 (p17, análogo viral a la proteína anti-apoptótica bcl-2). Su expresión requiere la existencia de las proteínas inmediatamente tempranas y no se altera si se inhibe la síntesis de ADN viral. Codifican principalmente para enzimas involucradas en la replicación viral o proteínas transactivadoras de los genes tardíos (Rickinson y col. 2007).

Genes tardíos: Los genes virales BNRF1 (proteína de tegumento, p143), BCLF1 (antígeno de cápside viral, VCA, p150), BALF4 (gp85) y BLLF1 (glucoproteína gp350/220, ambas glucoproteínas, gp350 y gp220, se traducen desde el ARNm sin y con *splicing*, respectivamente), son algunos de los principales. Se expresan, en general, luego de la síntesis de ADN viral y codifican, predominantemente, para proteínas estructurales de las partículas virales, algunas de ellas conforman el ligando de la molécula CD21 (Rickinson y col. 2007).

1.1.2.2 GENES Y ANTÍGENOS DEL CICLO LATENTE

Las infecciones latentes son definidas como aquellas en las que persisten copias completas del genoma viral sin que se produzca virus infeccioso. En el caso de la infección por EBV, en general los individuos son portadores sanos de la infección latente y no presentan manifestaciones clínicas evidentes, pero pueden reactivarse por alguna circunstancia particular, como por ejemplo por inmunosupresión del hospedador, y dar lugar a patologías específicas. El virus persiste como episoma transcribiendo un número limitado de genes de latencia y expresando diferentes ARNs y proteínas de latencia virales (Tselis y col. 2006).

Los genes que se expresan en latencia son:

Epstein Barr Nuclear Antigen 1 (EBNA1): proteína nuclear de unión al ADN. Su rol fundamental es el mantenimiento y la replicación del genoma viral para su división en las células hijas. Sin embargo, la función de EBNA1 no es del todo eficaz y el genoma puede perderse durante la replicación (Altmann y col. 2006). EBNA1 no es presentado en forma eficiente por moléculas de CMH clase I, por lo que los linfocitos B infectados que solo expresan esta proteína no son reconocidos por los linfocitos T citotóxicos (Apcher y col. 2010). EBNA1 puede además mediar algunos de los efectos anti-apoptóticos que presenta el EBV en células tumorales de LB (Kennedy y col. 2003).

Epstein Barr Nuclear Antigen 2 (EBNA2): es la primera proteína del virus expresada luego de la infección en linfocitos B. Es un transactivador por excelencia, se une a proteínas secuencia específica de unión al ADN para activar la transcripción de genes celulares en linfocitos B y de algunos genes virales como LMP1, LMP2A y el promotor Cp (Lam y col. 2003). EBNA2 secuestra a la proteína que une la señal de recombinación κ (RBP- κ), que es el factor de transcripción más importante de la vía de

señalización de Notch (Young y col. 2004). EBNA2 también puede interactuar con PU.1 y el heterodímero ATF-2/c-Jun los cuales tienen un rol importante en la transactivación de genes celulares involucrados en la inmortalización (Robertson 2010).

Epstein Barr Nuclear Antigen 3 (EBNA3): las proteínas EBNA3A, 3B y 3C son un grupo de proteínas nucleares importantes en la transformación de linfocitos B. Los tres miembros de la familia se caracterizan por tener un origen común y estar codificados por fusiones de genes en tándem. EBNA3A aumenta la proliferación celular y EBNA3C regula y activa la transcripción de CD21 y LMP1 (Young y col. 2003).

Epstein Barr Nuclear Antigen Leader Protein (EBNALP): favorece la transactivación de LMP2 mediada por EBNA2 y puede formar complejo con p53 y Rb (Jiang y col. 1991; Szekely y col. 1993).

Latent Membrane Protein 1 (LMP1): es una proteína de membrana considerada el oncogén de EBV por excelencia, debido a su capacidad de transformar fibroblastos de ratón *in vitro* (Tsao y col. 2002) y promover el desarrollo de linfomas *in vivo* en ratones transgénicos para LMP1 (Kulwichit y col. 1998). Tiene la capacidad de actuar como CD40 constitutivamente activado, un miembro de la superfamilia de receptores del factor de necrosis tumoral (TNFR), y estimular en consecuencia una serie de vías de señalización en forma independiente de ligando (Vaysberg y col. 2008). Se une a los factores asociados a TNFR (TRAF) y/o a la proteína que contiene el dominio de muerte asociado a TNFR (TRADD), y activa ambas vías clásica y no clásica de las MAP quinasas y la vía JAK/STAT (Young y col. 2004; Shair y col. 2007). También induce la expresión de múltiples genes celulares involucrados en la inhibición de la apoptosis, así como también citoquinas, moléculas de adhesión y marcadores de activación y metástasis tumoral (Bentz y col. 2011).

Latent Membrane Protein 2 (LMP2): LMP 2A y 2B, son proteínas de membrana estructuralmente semejantes. LMP2A posee la capacidad de formar una estructura similar al motivo ITAM (*Immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motif*) presente en el receptor celular del linfocito B (BCR). Cuando este motivo ITAM es fosforilado en presencia de un antígeno, se desencadena una cascada de señalización que estimula el crecimiento y diferenciación del linfocito B. La habilidad de LMP2A de interactuar con proteínas mediadoras de esta cascada como *src* y *syk*, a través de su motivo ITAM, conlleva al bloqueo de la señalización del receptor y en consecuencia a la inhibición del linfocito para crecer y diferenciarse, lo cual favorece la infección latente a largo plazo

(Young y col. 2003; Young y col. 2004). Recientemente se describió la capacidad de LMP2A de modular otras vías de señalización como la vía Akt/PI3-K, NFκB y la vía de β-cateninas (Morrison y col. 2003; Stewart y col. 2004; Fukuda y col. 2007). La proteína LMP2B estaría involucrada en la regulación de la expresión de LMP2A (Longnecker 2000).

Epstein Barr encoded RNAs (EBERs): se trata de pequeños ARNs, EBER 1 y EBER 2, que no se traducen a proteínas. Estas moléculas no serían necesarias durante la transformación primaria de linfocitos B, pero ciertos estudios *in vitro* señalan una posible función en la estimulación de la persistencia viral. Son los transcritos virales más abundantes en las células con infección latente, en el orden de 1×10^5 a 1×10^6 copias de EBERs por cada episoma viral presente. Los EBERs poseen la capacidad de interactuar con la proteína quinasa celular PKR, que media la respuesta celular por interferón y se ha sugerido que podrían rescatar a la célula infectada de la apoptosis inducida por esta vía (Nanbo y col. 2002). Otros estudios describieron que la transfección de EBERs en células linfoides EBV- aumenta los niveles de expresión de IL-10 (Kitagawa y col. 2000) y la capacidad de éstas para crecer en agar blando (Komano y col. 1999). Si bien la participación de los EBERs en el proceso neoplásico no está todavía completamente definida, estos estudios sugieren que podrían tener una participación más importante a la previamente considerada (Young y col. 2004).

Bam HI-A Rightward Transcripts (BARTs): fueron originalmente descriptos en muestras de carcinoma nasofaríngeo (CNF). Luego se los caracterizó en otros procesos neoplásicos como el LB, LH, e incluso en las células mononucleares de pacientes sanos. Si bien no se conoce su función, su detección tanto en patologías tumorales como en portadores sanos sugiere su participación en la persistencia de la infección (Thorley-Lawson y col. 2004; Young y col. 2004).

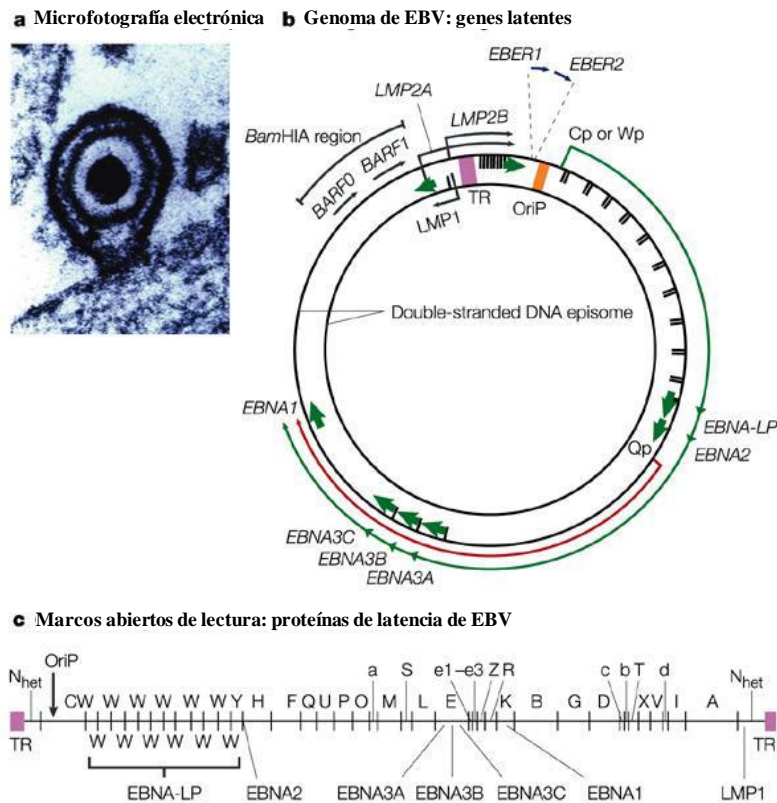


Figura 2. Genoma de EBV (Adaptación de (Young y col. 2004).a) Microfotografía electrónica del virión de EBV. b) Diagrama de localización y transcripción de los genes de latencia de EBV en el episoma viral. c) Localización de los marcos de lectura abiertos para las proteínas de latencia sobre el mapa de restricción de la enzima *Bam* *HI* sobre el genoma prototipo de la línea celular B95.8.

1.1.3 EPIDEMIOLOGÍA Y REPLICACIÓN

El EBV es uno de los virus humanos más ampliamente distribuidos entre la población a nivel mundial, dado que más del 90% de los individuos adultos presenta indicios de infección pasada.

En países en vías de desarrollo, como la Argentina, el primer contacto con el virus ocurre a edad temprana, y es casi universal hacia los 6 años de edad (Chan y col. 2001). Un estudio serológico realizado por nuestro grupo de trabajo demostró que en Argentina la presencia de anticuerpos de tipo IgG anti VCA de EBV era detectable en aproximadamente el 80% de los niños a los tres años de edad (Chabay y col. 1999; Chabay y col. 2013). En estos casos la primoinfección frecuentemente cursa de manera subclínica o con síntomas leves e inespecíficos y solo, ocasionalmente, con la sintomatología típica del síndrome mononucleósico. Por el contrario, cuando la primoinfección por EBV se produce en la adolescencia o adultez temprana, como ocurre

en los países desarrollados, suelen presentarse los síntomas típicos de la mononucleosis infecciosa en una gran proporción de los casos (Vetsika y col. 2004; Luzuriaga y col. 2010; Vouloumanou y col. 2012). Los factores socio económicos como el hacinamiento en la vivienda, la edad de escolarización y las condiciones de higiene, contribuirían, entre otros factores, a esta diferencia epidemiológica (Crawford 2001).

No existen evidencias consistentes con respecto a la distribución de EBV por sexos. Sin embargo, un estudio en niños en China describió que los varones son más susceptibles a la primoinfección durante el primer año de vida y esta tendencia se revierte significativamente hacia los dos años de edad (Chan y col. 2001). Por otro lado se observó una distribución preferencial de la infección en los varones adultos en países desarrollados; sin embargo, se describió que las mujeres presentan títulos de anticuerpos ligeramente mayores y a menor edad que los varones (Higgins y col. 2007).

La entrada del virus al organismo del hospedador se produce a través de la orofaringe, en donde el virus infecta a los linfocitos B vírgenes que expresan el receptor celular CD21 (Figura 3). Estos linfocitos B sufren un primer ciclo de replicación con producción de partículas virales infectivas, lisis celular e infección de nuevos linfocitos.

La infección primaria por EBV en general es eficientemente controlada por el sistema inmune, el cual desencadena una respuesta tanto de inmunidad humoral como celular, aunque el virus no se elimina completamente. Si bien se generan anticuerpos contra proteínas estructurales (VCA y gp350) y ciertos antígenos nucleares (EBNAs), la respuesta celular es la más importante en el control de la infección. Las células *natural killer* (NK), los LT CD4+ y los CD8+ son los responsables de controlar la población de linfocitos B infectados en proliferación inducida por la primoinfección (Cohen 2000; Luzuriaga y col. 2010).

Luego de la infección primaria, al igual que otros herpesvirus, el EBV establece una infección latente y de por vida en los linfocitos B de memoria. Esta infección latente se caracteriza por la expresión nula o limitada de un grupo reducido de genes de latencia, lo cual le permite al virus escapar de la vigilancia del sistema inmunitario (Young y col. 2003). El modelo actual de persistencia viral indica que el virus altera el patrón de expresión de sus antígenos de latencia de modo tal de impulsar la transformación del linfocito B virgen a un linfoblasto en proliferación, para luego transitar su maduración en centro germinal y finalmente diferenciarse en linfocito B de memoria, imitando la proliferación y diferenciación estimulada por antígeno (Figura 3)

(Thorley-Lawson 2005). Durante la infección primaria, el virus expresa todos sus genes de latencia, perfil de latencia III (Tabla 1), y esto desencadena la activación y proliferación del linfocito B. Posteriormente, en su ingreso al centro germinal del linfocito B infectado, se regula en forma negativa la expresión de algunas de las proteínas de latencia y solo se expresan los antígenos EBNA1, LMP1, LMP2A y 2B (latencia II). Tanto LMP1 como LMP2A poseen la capacidad de imitar la estimulación por antígeno producida en el centro germinal y dirigir la diferenciación del linfocito B hacia el estadio de diferenciación de memoria. Finalmente, cuando este linfocito B de memoria sale a circulación, la expresión de todos los antígenos virales se silencia completamente (latencia 0) y solo ocasionalmente, durante la división del mismo, el virus expresa el antígeno EBNA1, que es fundamental para la duplicación del genoma viral (latencia I) y su división a las células hijas. Eventualmente, estos linfocitos B de memoria se diferencian en células plasmáticas y durante esta diferenciación se desencadena la replicación viral, iniciada por las proteínas líticas inmediatamente tempranas, con ensamblaje final de partículas infectivas. De esta forma el virus puede propagarse hacia un nuevo hospedador, pero también infectar nuevos linfocitos vírgenes dentro del mismo individuo y de esta manera mantener la infección persistente (Thorley-Lawson y col. 2004).

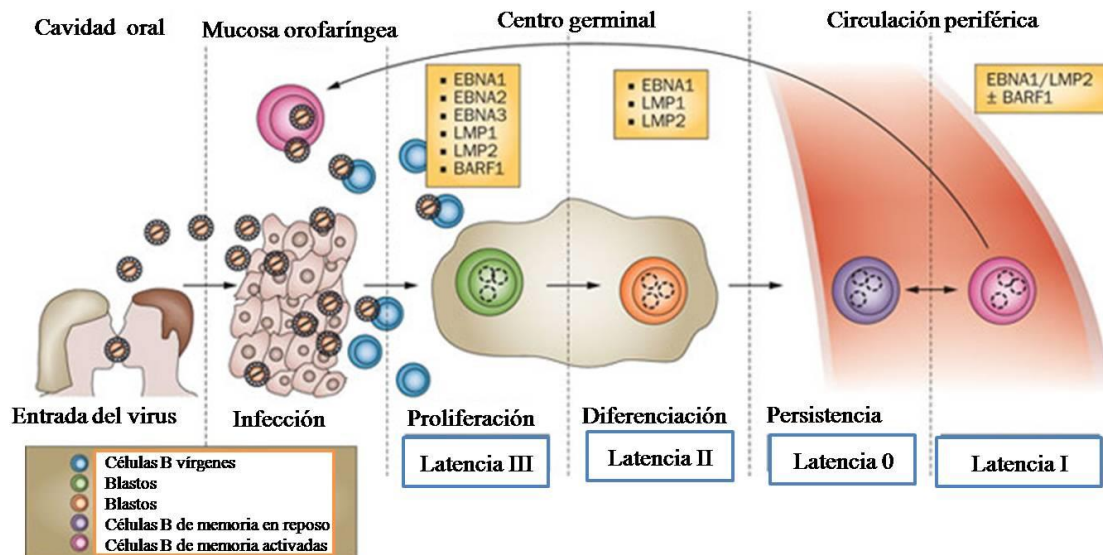


Figura 3. Ciclo de vida de EBV (Adaptación de (Bollard y col. 2012)). Este ciclo involucra al menos 5 pasos. Durante la infección primaria, el EBV infecta células B vírgenes y expresa todos sus antígenos de latencia (latencia III). Esta latencia promueve la transformación y proliferación del linfocito B, pero dado que son altamente inmunogénicos, se eliminan rápidamente por parte de los LTc específicos. El virus sobrevive en las células disminuyendo la expresión de sus antígenos inmunogénicos en 2 fases. Inicialmente el linfocito B ingresa al ganglio linfático donde proliferan y expresan solo 4 proteínas virales (latencia II). Finalmente, salen del ganglio y silencian la expresión de todos sus antígenos (latencia 0), haciéndose invisibles al sistema inmune. Si las células B en sangre periférica se dividen, expresan una sola proteína (latencia I) que asegura que el genoma viral sea heredado a las células hijas. Cuando las células infectadas circulan por el epitelio orofaríngeo transfieren el virus a las células epiteliales, donde este se replica para infectar nuevos hospedadores o nuevas células B, y así mantener la reserva de células infectadas

Si bien ya se conocen varios aspectos de la biología del EBV, a cincuenta años luego de su descubrimiento, las causas que contribuyen al desarrollo de los tumores no están del todo esclarecidas. Es probable que factores tanto genéticos como ambientales puedan determinar la susceptibilidad a la infección de distintos tipos celulares, y activar vías de señalización complementarias con aquellas inducidas por el EBV, que a su vez afecten el crecimiento y la proliferación celular. Por ejemplo, muchas de las patologías tumorales asociadas a EBV se desarrollan en el contexto de la inmunosupresión, como los PTLD y los linfomas asociados a HIV, o poseen patrones de incidencia endémicos como el LB endémico, el carcinoma gástrico y el CNF. Otras, como el LH o el LB esporádico, no tienen características inmunes o epidemiológicas tan definidas (Bornkamm 2009; Carbone y col. 2009; Bollard y col. 2012; Asano y col. 2013). Por este motivo el EBV continúa siendo una variable de análisis en el desarrollo de varios

tumores en humanos, mediante el estudio y la búsqueda de factores virales que sean exclusivamente inherentes a aquellos tumores a los que el EBV se asocia.

Si bien la mayoría de la población mundial se encuentra infectada por EBV, y en gran parte de la misma el virus es inocuo para el hospedador, en cada patología neoplásica asociada al virus, tanto de origen linfoide como epitelial, se presenta un perfil de latencia específico, que coincide con los descriptos durante el ciclo de vida del EBV, con excepción de la latencia 0 (Delecluse y col. 2007; Lorenzetti y col. 2010; Hippocrate y col. 2011; Pereira Suarez y col. 2013).

1.1.4 PERFILES DE LATENCIA DE EBV EN NEOPLASIAS ASOCIADAS

1.1.4.1 LATENCIA TIPO III

El EBV establece una infección latente y desencadena la proliferación continua del linfocito B, dando como resultado final el desarrollo de LCLs, en respuesta a la infección *in vitro*. Tanto en LCLs como durante la primoinfección *in vivo*, dos promotores virales, primero Wp y luego Cp, se utilizan para generar un ARNm policistrónico. Este ARNm experimenta corte y empalme (*splicing*) y genera los ARNm de los 6 antígenos nucleares (EBNA1, 2, 3A, 3B, 3C, LP). Sumado a esto, se expresan tres proteínas latentes de membrana (LMP1, 2A, 2B). Este perfil de expresión génica es llamado perfil de latencia tipo III. Finalmente, para completar el perfil se expresan también los 3 tipos de ARN de latencia no codificantes: EBER1 y 2, BARTs y microARN (miARN). Se considera que los EBERs son expresados en todas las células que poseen el virus, sean normales o malignas, donde el EBV se mantiene en un estado latente. Es más, 24hs después de la primoinfección, 2 genes líticos homólogos de bcl-2 (BALF1 y BHRF1) se expresan en células B, ambos con una función inmunomoduladora específica (Young y col. 2003; Altmann y col. 2005).

Debido a su alta inmunogenicidad, las células con latencia de tipo III solo sobreviven de forma transitoria en los pacientes con MNI, dado que son reconocidas y eliminadas en forma eficiente por los LTc. Sin embargo, en los tejidos linfoides de pacientes con PTLD y linfomas asociados a HIV-SIDA estas se mantienen debido a la falta de control por parte del sistema inmune.

1.1.4.2 LATENCIA TIPO II

Este perfil fue descrito por primera vez en CNF, y se caracteriza por la expresión de EBNA1, LMP1 y LMP2 (A y B). Las patologías malignas clásicamente asociadas con este perfil son el LH, linfoma T/NK y el CNF. Hay estudios esporádicos en la literatura que describen otros linfomas de origen B, aparte del LH, que presentan este perfil de latencia. Es importante notar que, aunque las proteínas sean idénticas, el ARNm de EBNA1 es transcrito en este perfil de latencia a partir del promotor Cp/Wp, diferente al del Qp, activo en latencia I (Rowe y col. 2009). Dado que EBNA2 está ausente en este perfil de latencia, otras proteínas celulares, como ATF/CREB, Sp1/3, IRF7 o C/EBP, deben estar involucradas en la inducción de LMP1 y LMP2 por un mecanismo aún no del todo dilucidado (Sjoblom y col. 1998; Tsai y col. 1999; Ning y col. 2003; Noda y col. 2011).

1.1.4.3 LATENCIA TIPO I

Se caracteriza por la expresión restringida únicamente a los transcritos EBERs y la proteína EBNA1 a partir del promotor Qp. En este tipo de latencia no existe blanco para el reconocimiento de las proteínas expresadas por parte del sistema inmune, dado que EBNA1 es muy poco inmunogénico. Se encuentra inicialmente descrito en LB endémico (Young y col. 2004; Klein y col. 2007), pero también se lo ha encontrado en LB esporádico, linfoma primario de cavidades (*primary effusion lymphomas - PELs*), algunos PTLDs (Capello y col. 2003) y en carcinoma gástrico (Iizasa y col. 2012).

En la Tabla I se detallan los perfiles de latencia viral y la condición fisiopatológica asociada.

Tabla I. Perfiles de latencia de EBV

Perfiles de latencia	Antígenos expresados						Condición asociada
	EBERs/ BARTs			EBNA3s/ EBNA-LP			
	EBNA1	LMP1	LMP2A	EBNA2	EBNA-LP		
0	+/-	-	-	-	-	-	portador sano
I	+	+	-	-	-	-	LB CG
II	+	+	+	+	-	-	LH CNF LDGCB
III	+	+	+	+	+	+	MNI PTLD LDGCB

Abreviaturas: LB: linfoma de Burkitt; CG: carcinoma gástrico; LH: linfoma de Hodgkin; CNF: carcinoma nasofaríngeo
MNI: mononucleosis infecciosa; LDGCB: linfoma difuso a grandes células B; PTLD: síndrome linfoproliferativo post trasplante

1.2 LINFOMAS NO HODGKIN

1.2.1 CONCEPTO Y CLASIFICACIÓN

Los linfomas son neoplasias malignas del sistema linfoide derivadas de los linfocitos en cualquiera de sus estadios de diferenciación. Sus características morfológicas, inmunofenotípicas, genéticas y moleculares son heterogéneas, por lo que su comportamiento biológico y clínico puede variar. Los linfomas se dividen en dos grandes grupos: LH y LNH, y éstos, a su vez, en neoplasias de células B (LNH-B) y en neoplasias de células T y de célula NK (LNH-T/NK) según su ontogenia y maduración. La actual clasificación de los síndromes linfoproliferativos corresponde a la de la Organización Mundial de la Salud (OMS) (Swerdlow y col. 2008), la cual establece formas anatomoclínicas definidas a través de criterios morfológicos, inmunofenotípicos, genéticos y clínicos, e indica el tipo de célula de origen de cada uno de estos procesos. Los LNH fueron reclasificados y actualmente se han definido aproximadamente 70 nuevas entidades (Jaffe y col. 2008; Swerdlow y col. 2008). La nueva clasificación de las neoplasias de células B de la OMS se adjunta en la Tabla A1, en el Apéndice A, sección 9.1.

1.2.2 EPIDEMIOLOGÍA DE LOS LNH-B

Las neoplasias de ontogenia B constituyen el 90% de los LNH y representan cada año el 4% de los nuevos cánceres (Siegel y col. 2013). En la actualidad constituyen un problema de salud pública, dado que se encuentran en franco incremento en su incidencia a nivel mundial, no solo como consecuencia de la epidemia del HIV, sino también debido al aumento de la prevalencia de linfomas en mayores de 65 años (GLOBOCAN 2012 *database*: <http://www-dep.airc.fr/>). Los tipos de linfomas más comunes en adultos son el linfoma folicular (LF) y el linfoma difuso a grandes células B (LDGCB), ya que juntos representan más del 60% del total de los linfomas (Swerdlow y col. 2008). El LB es una forma agresiva de LNH-B, de mayor prevalencia en niños y adultos jóvenes, en los cuales representa el 50% de los LNH-B, seguido por el Linfoma Linfoblástico (LL) y el LDGCB. La distribución de los LNH-B de poblaciones adulta y pediátrica se detalla en la Figura 4 (Sandlund y col. 1996).

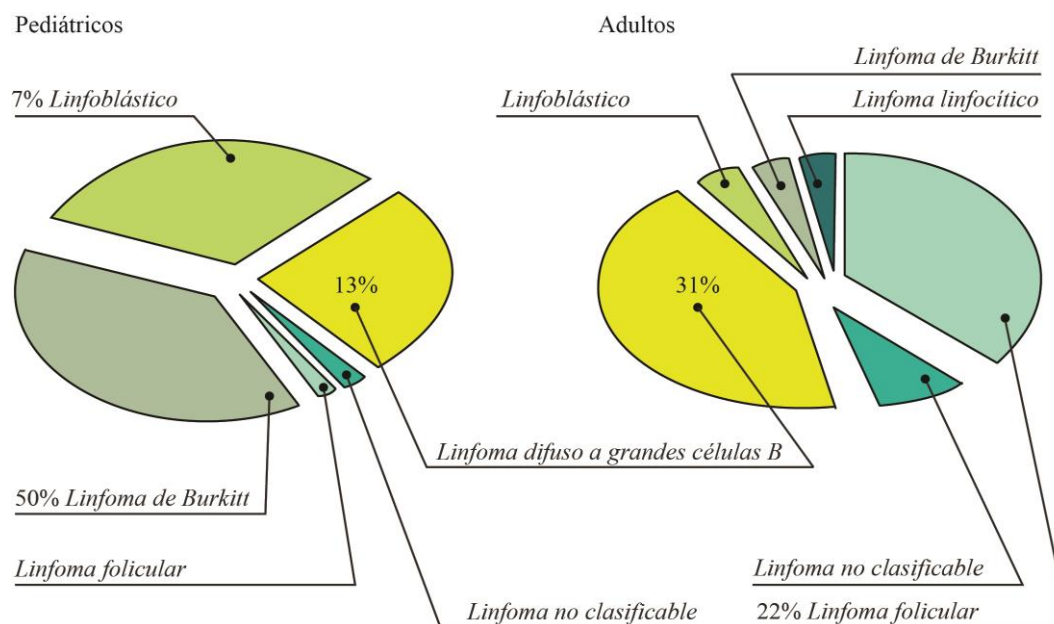


Figura 4. Distribución de subtipos histológicos de Linfoma No-Hodgkin en niños y adultos (Adaptación de (Sandlund y col. 1996))

Existe una variación geográfica en la incidencia de linfomas, las mayores tasas se hallan en países desarrollados, lo cual podría indicar una posible asociación con mayor estatus socioeconómico (GLOBOCAN 2012 *database*: <http://www-dep.airc.fr/>). En nuestro país, durante el año 2012, se diagnosticaron 115.162 casos de cáncer en la población adulta, de los cuales el 2,6% representaban todos los LNH. Por otra parte, los datos de incidencia de linfomas en pediatría surgen del Registro Oncopediátrico Hospitalario Argentino (Moreno y col. 2012), según el cual el 12,7% de las 12.740 neoplasias pediátricas registradas en el período 2000 - 2009 fueron linfomas, de los cuales el 55% correspondieron a todos los LNH. Esta distribución es similar a la descrita en los países desarrollados de Europa y América del Norte. La incidencia del LNH-B aumenta con la edad y los menores de 16 años solo representan el 3% del total de pacientes en países desarrollados. Por otro lado, la incidencia en dichas poblaciones es mayor en varones que en mujeres, con una relación varón: mujer de 2:1. Existen; sin embargo, grupos específicos con mayor riesgo de desarrollar dicha neoplasia, como aquellos pacientes con inmunodeficiencia primaria o adquirida, en los cuales se estima que la función deficiente de linfocitos T es, al menos en parte, responsable de una incidencia aumentada (Sandlund y col. 1996).

1.3 LINFOMA DIFUSO A GRANDES CÉLULAS B

1.3.1 CARACTERÍSTICAS Y EPIDEMIOLOGÍA

El LDGCB es una neoplasia de linfocitos B grandes con el núcleo de tamaño igual o mayor que el de un macrófago, o dos veces más grande que el de un linfocito normal, con un patrón de crecimiento difuso. Es además una entidad clínico-patológica muy heterogénea. La revisión de los tumores hematológicos de la OMS del 2008 reconoció la existencia de múltiples variantes morfológicas del LDCGB. Los LDGCB se han dividido en subgrupos en relación con variantes anatómicas, morfológicas, moleculares e inmunofenotípicas (Tabla A.1; Apéndice A, sección 9.1).

En el mundo, aproximadamente un tercio de todos los nuevos casos de LNH son diagnosticados como LDGCB y conforman el 25-30% de los LNH-B, por lo que representan el subtipo de linfoma más común en los países occidentales. En analogía con lo que ocurre en los LNH en general, se observa un aumento en la incidencia de LDGCB en las últimas décadas. Es más frecuente en hombres que en mujeres (relación varón: mujer 1,3:1), si bien pueden afectar a niños y jóvenes, la mediana de edad de 70 años (Howlader y col. 2012; Novelli y col. 2013; Siegel y col. 2013). Clínicamente se presenta como una masa tumoral de rápido crecimiento que afecta el sitio de origen. El 60% presenta síntomas B: fiebre mayor a 38°C, sudoración nocturna y pérdida de peso. Es de curso agresivo, aproximadamente un 70% de los pacientes debuta con estadios avanzados de la enfermedad (estadio III-IV); sin embargo, con los tratamientos actuales más del 60% de los pacientes alcanza una respuesta completa (Cabanillas 2010). Se puede manifestar como una enfermedad ganglionar o extra ganglionar al diagnóstico, en adultos prevalece la presentación ganglionar mientras que en niños la presentación extra ganglionar es la más frecuente. Las localizaciones extra ganglionares más habituales incluyen el tracto gastrointestinal, la médula ósea, el hígado, la piel, la tiroides y las gónadas (Gutierrez-García y col. 2010). En adultos, el pronóstico del LDGCB es diferente según la célula a partir de la cual se origina. Para distinguir los subtipos con perfil de origen centro germinal (CG), de mejor pronóstico, de las de perfil activado o post-centro germinal (post-CG) Hans y col. han propuesto utilizar el algoritmo de una combinación de tres marcadores: CD10, bcl-6 y MUM-1. La expresión de CD10 sugiere un perfil CG, junto con la expresión de bcl-6 en ausencia de MUM-1. Por el contrario, la expresión de MUM-1 en ausencia de CD10 indicaría un perfil post-CG, independientemente de la expresión de bcl-6 (Hans y col. 2004) (Figura 5).

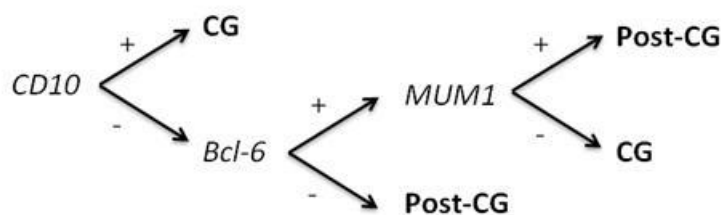


Figura 5. Algoritmo de Hans para la subclasificación de los LDGCB según su estadio madurativo. Está basado en el análisis por IHQ de 3 marcadores celulares (CD10, bcl-6 y MUM-1).

A pesar que se realizaron considerables avances en el entendimiento de la patogénesis del LDGCB del adulto, los datos de la población pediátrica son aún muy limitados. El LDGCB pediátrico presenta un pronóstico más favorable que su contraparte en adultos, y la razón de dicha diferencia podría radicar en particularidades tanto biológicas como inmunofenóticas (Yamauchi y col. 2007; Reiter y col. 2008). En LDGCB pediátrico predominan los casos derivados de CG; sin embargo, ninguno de los 2 subtipos se asocia a una mayor supervivencia (Oschlies y col. 2006; Miles y col. 2008). En adultos la distribución por subtipos es similar, no obstante, los pacientes con inmunofenotipo derivado de CG tienen una mayor supervivencia que el LDGCB post-CG (Berglund y col. 2005).

1.3.2 LDGCB EBV POSITIVO DEL ADULTO MAYOR

El LDGCB EBV positivo (LDGCB EBV+) del adulto mayor (*elderly*), también conocido como desorden linfoproliferativo de células B grandes asociado al virus Epstein Barr y relacionado a la edad, es una nueva entidad provisoria definida por la OMS en su clasificación del 2008 (Nakamura y col. 2008).

Fue inicialmente descrito en 2003 por un grupo japonés (Oyama y col. 2003) y se define como una proliferación clonal de células B infectadas con EBV, que se encuentra en pacientes mayores de 50 años sin historia de inmunodeficiencia o linfoma previos. Sin embargo, se describen en la literatura algunos casos con estas características en pacientes jóvenes, sin inmunodeficiencia subyacente y con diagnóstico de LDGCB EBV+ (Oyama y col. 2007; Park y col. 2007; Hoeller y col. 2010; Beltran y col. 2011), pero que se excluyen de los estudios de incidencia de la enfermedad por no cumplir con el criterio de edad que propone la OMS. De la

identificación de estos casos en pacientes jóvenes surge el interrogante acerca de si el LDGCB EBV+ no podría ser una entidad que no estaría restringida exclusivamente a pacientes mayores de 50 años. El pronóstico de esta entidad es menos favorable en comparación con los casos de LDGCB EBV negativos, con una supervivencia global aproximada de 24 meses (Oyama y col. 2007; Park y col. 2007; Hoeller y col. 2010).

Hasta ahora no hay un tratamiento específico aceptado para el LDGCB EBV+ del adulto mayor, además del estándar que se administra a la totalidad de los LDGCB, que consiste en quimioterapia (CHOP: ciclofosfamida, vincristina, doxorubicina y prednisona) a la cual generalmente se le adiciona inmunoterapia (Rituximab: anticuerpo monoclonal anti-CD20 expresado en la superficie de los linfocitos B). Aunque este tratamiento (R-CHOP) ha reflejado una mejoría en la evolución clínica para los pacientes con LDGCB EBV+ del adulto mayor, la disponibilidad de datos publicados aún no es suficiente, y es probable que sea necesario el uso de nuevos agentes terapéuticos para el tratamiento de esta entidad (Gibson y col. 2009; Cabanillas 2010; Beltran y col. 2011; Castillo 2012).

La prevalencia de esta patología en poblaciones del este de Asia (Japón y Corea) o Latinoamérica (México y Perú) es de 8-15% (Oyama y col. 2007; Park y col. 2007; Morales y col. 2010), mientras que en países occidentales desarrollados es menor al 5% (Gibson y col. 2009; Hoeller y col. 2010). Este es un dato interesante ya que existen otras neoplasias asociadas a EBV con mayor incidencia en América Latina, África y Asia, e indican la posibilidad de una predisposición étnica y/o variación geográfica para el desarrollo de enfermedades linfoproliferativas EBV+ (Hjalgrim y col. 2007).

Cabe mencionar que no existe actualmente un criterio uniforme que establezca cual es el porcentaje de células tumorales infectadas con EBV que deben estar presentes para considerar a un caso como LDGCB EBV+ del adulto mayor, lo cual implica una desventaja a la hora de establecer la prevalencia de esta entidad en un grupo poblacional determinado. De hecho, el número de células tumorales EBV+ observadas puede ir desde un 10% a casi la totalidad de las células neoplásicas presentes en el corte histológico. Esta diferencia en los valores de corte utilizados para clasificar un caso, claramente impacta en la prevalencia de LDGCB EBV+ del adulto mayor, como es discutido por varios autores (Park y col. 2007; Chuang y col. 2010; Wada y col. 2011).

Si bien se describieron varias características patológicas, no hay aún aspectos histopatológicos, inmunofenotípicos o moleculares específicamente asociados a esta entidad. Lo que se observa con mayor frecuencia es necrosis extensiva o geográfica, el

marcador de proliferación Ki-67 en más del 70% de las células y un fenotipo madurativo prevalente post-CG (Castillo 2012).

En pocos trabajos se caracterizó el perfil de latencia de EBV en esta entidad, sin embargo, los estudios realizados se asocian con la expresión de los perfiles de latencia II y/o III, donde la latencia II se encuentra en el 94% de los casos mientras que la latencia III en el 28%, exclusivamente en base a los resultados de inmunomarcaciones de LMP1 y EBNA2 respectivamente (Shimoyama y col. 2006; Oyama y col. 2007; Shimoyama y col. 2008; Castillo y col. 2011; Hofscheier y col. 2011; Al-Humood y col. 2014).

El mecanismo que sustenta a la patogenia de los LDGCB EBV+ del adulto mayor se plantea como multifactorial. Se han propuesto dos mecanismos principales que actuarían de forma sinérgica. Por un lado, el linfotropismo y la cronicidad de la infección por EBV, con la expresión concomitante de sus antígenos de latencia con capacidad oncogénica, y por otro, la disfunción inmunológica asociada al envejecimiento o inmunosenescencia, basado en ciertas similitudes que presenta con los PTLDs. Estas incluyen, además de la infección por EBV y el perfil de latencia III asociado, una morfología comparable y la presencia de una población de células T oligoclonales. En consecuencia, la inmunosenescencia inherente al proceso de envejecimiento sería la causa principal de una disminución en la respuesta de células T, con la consecuente disminución en la inmunovigilancia hacia el EBV (Dojcinov y col. 2011; Nguyen-Van y col. 2011; Montes-Moreno y col. 2012). Esto resultaría en una proliferación descontrolada de células B infectadas con el virus y el consecuente desarrollo del linfoma asociado a EBV (Adam y col. 2011). Sin embargo, es probable que haya otros factores aún desconocidos que participen en la patogénesis de dicha enfermedad (Castillo 2012).

La inmunosenescencia es un proceso continuo de remodelación, donde la edad avanzada altera la distribución de las poblaciones de células T CD4+ y CD8+. A su vez, el balance homeostático entre el recambio de las poblaciones efectoras y los nuevos LT vírgenes se pierde, por ende perduran poblaciones oligoclonales, especialmente de LTc CD8+. Las infecciones crónicas por citomegalovirus (CMV) o EBV también pueden ser responsables de este fenómeno. Estas células efectoras, a pesar de reconocer péptidos virales, poseen un fenotipo particular que las lleva a perder su funcionalidad y en consecuencia responden con menores niveles de IFN γ cuando son estimuladas por dichos antígenos. Por lo tanto, estas poblaciones son disfuncionales, no solo en su

respuesta ante los estímulos, sino también debido a que su falta de recambio puede impedir el correcto desempeño tanto de la población efectora como de otras células T (Hakim y col. 2007; Koch y col. 2008).

La hipótesis de la inmunosenescencia aún no está comprobada. Es por ello que en individuos inmunocompetentes todavía se está estudiando el verdadero rol del virus en la patogénesis del linfoma. En los últimos años, se ha focalizado el análisis no solo en los factores virales, sino también en el microambiente tumoral, que interactúa y podría ser modulado a su vez por la presencia de las proteínas virales.

1.4 MICROAMBIENTE TUMORAL

En el 2011 Hanahan y Weinberg postularon que los tumores son tejidos complejos, no solo masas de células tumorales, que contienen una heterogeneidad de células integradas. Las “células normales” reclutadas conforman el estroma asociado al tumor y participan activamente del proceso de tumorigénesis. El tumor consiste en una red de células tumorales, células pro y anti-inflamatorias, fibroblastos, microvasculatura, que poseen la capacidad de modificar el metabolismo celular y la habilidad de evadir la respuesta inmune (Hanahan y col. 2011)

El sistema inmune puede tener dos efectos completamente opuestos en el desarrollo del tumor, por un lado, tiene el potencial de destruir a las células tumorales o inhibir su crecimiento, y por el contrario, también tiene la capacidad de facilitar su crecimiento. La activación de las células inmunes adaptativas (que expresan diversos receptores antígeno-específicos) puede resultar en la erradicación de las células tumorales, mientras que, a la inversa, la activación crónica de células del sistema inmune innato (que forman la primera línea de defensa contra patógenos) puede incrementar el desarrollo tumoral (de Visser y col. 2006; Burger y col. 2009). Actualmente hay un interés creciente en el análisis de la contribución del microambiente tumoral en el desarrollo de neoplasias. La inflamación tiene el potencial de contribuir a un microambiente más favorable al desarrollo del tumor, dado que aporta factores de crecimiento que sostienen la proliferación, factores de supervivencia que inhiben la muerte celular y factores proangiogénicos y enzimas que facilitan la formación de vasos, la invasión y la metástasis (de Jong y col. 2008).

Se han descrito dos caminos que vinculan a la inflamación con el cáncer. El camino intrínseco, donde los eventos genéticos que causan el desarrollo tumoral inician

la expresión de un perfil proinflamatorio en el microambiente, y el camino extrínseco, donde la inflamación crónica disparada por la presencia de infecciones persistentes, como EBV u otros agentes, induce un fenómeno de agotamiento inmunológico, lo que contribuye a la pérdida de inmunovigilancia, y resulta eventualmente en un crecimiento descontrolado de linfocitos B infectados (Zinkernagel y col. 1993; Hakim y col. 2007).

Los LTc han sido desde siempre el foco principal de los estudios de respuesta inmune tanto antitumoral como antiviral. Esta subpoblación utiliza múltiples mecanismos para eliminar tanto a las células tumorales como a aquéllas infectadas, mediante la expresión de perforinas, ligandos de la superfamilia del factor de necrosis tumoral (TNF), como el Fas ligando y las granzimas, siendo la más abundante la granzima B (GrB). Estas últimas se forman en los LTc o en las células NK, pero solo luego de la activación antígeno-específica. Los mediadores solubles que acompañan esta acción generalmente son el IFN γ y el TNF α (Cullen y col. 2010).

El IFN γ es una citoquina secretada por LTc y NK bajo ciertas condiciones específicas de activación, y aunque originalmente fue definida como un agente de actividad antiviral directa, se le atribuye la capacidad de regular varios aspectos de la respuesta inmune, como la estimulación de la presentación de antígenos por la vía de CMH I y II, así como también efectos sobre la proliferación y la apoptosis, entre otros (Zaidi y col. 2011).

Se describió recientemente que la expresión de moléculas inmunes utilizadas como puntos de control sobre las células T representan un mecanismo muy importante que utiliza el sistema inmune para auto-regularse. Algunas de estas moléculas incluyen: CTLA-4 (*cytotoxic T lymphocyte antigen-4*), LAG-3 (*lymphocyteactivation gene-3*) y PD-1 (*programmed death-1*), entre otras (Nirschl y col. 2013). Los datos recientes muestran que la coexpresión de estas moléculas ocurre frecuentemente en los LT anti-tumorales, los cuales suprimen la respuesta de LT citotóxicos CD8⁺ (LTc) y aumentan la actividad de LT supresores CD4⁺ Foxp3⁺ (Treg) (Rozali y col. 2012). Los avances recientes en el entendimiento de la biología e inmunología de los linfomas muestran que las células que infiltran el tumor, en conjunto con las citoquinas liberadas por dichas células, pueden tener diferentes funciones y estar íntimamente relacionadas con la evolución clínica (Alvaro y col. 2008; Zhang y col. 2010; Hadrup y col. 2013).

Especialmente en el LDGCB, el microambiente tumoral tiene un rol muy importante en el crecimiento de las células tumorales y la resistencia al tratamiento (de

Jong y col. 2008). Lenz y col. (Lenz y col. 2008) y Linderoth y col. (Linderoth y col. 2008) demostraron que la composición característica del microambiente en LDGCB puede asociarse a una respuesta al tratamiento diferencial, por lo cual su caracterización, particularmente respecto de LT, tiene una gran relevancia clínica.

Se sugirió que una de las formas en que el EBV promueve el desarrollo de linfomas en pacientes inmunocompetentes, es mediante la inducción de tolerancia inmunológica como consecuencia de la modificación de la composición del microambiente celular (Cohen y col. 2009). Particularmente en LH, los casos EBV+ tienen más LTc conformando el microambiente tumoral que los EBV-. Sin embargo, esta respuesta parecería ser insuficiente debido a mecanismos inmunosupresores que actúan en dicho microambiente (Marshall y col. 2007). Algunos autores demostraron que, en LH EBV+, una mayor cantidad de LTc se asocia a una mejor supervivencia (Barros y col. 2011); sin embargo, otros mostraron resultados contrarios, sugiriendo que la supervivencia no solo depende de la cantidad de LTc, sino también de su funcionalidad (Steidl y col. 2011). Sumado a esto, en el microambiente tumoral en LH se encuentran las poblaciones de LT regulatorios Foxp3+ (LTreg), que a su vez modulan la actividad de los LTc CD8+ y LT CD4+ (Kim y col. 2006). Estos han sido implicados en un peor pronóstico del LH, como consecuencia del ambiente inmunosupresor alrededor de las células de Reed-Sternberg (HRS) lo cual suprime la respuesta inmunológica antitumoral así como la específica contra EBV (Baumforth y col. 2008; Chetaille y col. 2009). Conjuntamente, las células HRS pueden producir factores inmunosupresores que incluyen galectina-1, PDL-1, IL-10 y TGF β , los cuales pueden potencialmente inhibir la respuesta citotóxica específica contra las células infectadas con EBV (Marshall y col. 2004; Chemnitz y col. 2007; Gandhi y col. 2007; Yamamoto y col. 2008; Chen y col. 2013).

La presencia de EBV podría estar involucrada en este fenómeno de remodelación del microambiente, mediada particularmente por algunas proteínas de latencia viral específicas. De hecho, se observó *in vitro* que la proteína viral LMP1 induce la expresión de IL-10 (Kis y col. 2006). Otro mecanismo involucrado en la modificación del microambiente ante la presencia de EBV podría ser el reclutamiento de LTreg. Se demostró *in vitro* que dicho reclutamiento sería en respuesta a la quimiotaxis inducida por quimioquinas como CCL20 (Hirahara y col. 2006), la cual mediante su unión al receptor CCR6, que se encuentra en LT en reposo o células

dendríticas, produce su activación y migración al sitio de interés. La expresión de esta quimioquina puede ser inducida por citoquinas pro-inflamatorias como $IFN\gamma$ por un lado, y regulada negativamente por citoquinas anti-inflamatorias como IL-10 por el otro (Schutyser y col. 2003). A su vez, se comprobó *in vitro* que las proteínas virales EBNA1 y LMP1 regulan positivamente la expresión de CCL20 en líneas celulares de LH, que en consecuencia, incrementarían el reclutamiento de LTreg (Baumforth y col. 2008). Por otro lado, se observó el aumento de la cantidad de LTreg circulantes en sangre periférica y su presencia en el microambiente tumoral en pacientes con LH y CNF EBV+, lo cual sugeriría una influencia del virus en esta población en particular, que permitiría que las células tumorales escapen a la respuesta específica mediada por LTc que intentan controlar de la infección (Marshall y col. 2007; Li y col. 2009).



HIPÓTESIS

2 HIPÓTESIS

Construcción de la hipótesis

Dado que:

- a) en nuestro país el EBV tiene una epidemiología particular, ya que la infección primaria a edad muy temprana es característica de países subdesarrollados, mientras que su asociación con LH y LB esporádico se asemeja a la distribución descrita para países desarrollados
- b) aún no se conoce cuál es la frecuencia del LDGCB EBV+ del adulto mayor en nuestro país y que no existe un estudio a nivel mundial del LDGCB EBV+ exclusivamente en pacientes pediátricos
- c) está comprobado que el EBV tiene capacidad para modular el microambiente tumoral en otros linfomas asociados al virus, pero no se ha caracterizado aún cuál sería su efecto en el microambiente en el LDGCB

Se formuló la siguiente hipótesis:

Hipótesis

En diferentes grupos etarios, el EBV presenta una asociación característica con el LDGCB, y dicha asociación podría estar vinculada a la modulación de la composición del microambiente tumoral inducida por el virus.



OBJETIVOS

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVOS GENERALES

Determinar la participación del EBV en la patogénesis del LDGCB en diferentes grupos etarios y caracterizar la conformación del microambiente tumoral a fin de determinar si la presencia del virus afecta su composición.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar la frecuencia del EBV en forma comparativa en pacientes con LDGCB de 3 grupos etarios (pediátricos, adultos jóvenes y adultos mayores de 50 años) a fin de establecer: a) si la incidencia en pacientes ≥ 50 años en nuestra población cumple con los criterios de la OMS del año 2008, b) las semejanzas y/o diferencias entre los 3 grupos para determinar el rol del EBV en cada uno de ellos.

- Caracterizar el perfil de latencia viral mediante la expresión de genes y proteínas virales de latencia y de ciclo lítico en los 3 grupos.

- Analizar cuantitativamente marcadores linfocitarios del microambiente tumoral para determinar si existen diferencias asociadas a la edad y/o a la presencia de EBV.

- Examinar la presencia de citoquinas en el microambiente tumoral en los casos EBV+ y EBV- en los 3 grupos etarios, a fin de comprobar si las características inmunológicas inherentes a la edad y/o a la presencia específica de proteínas virales de latencia o líticas modifican su presencia, y por ende la composición del microambiente.

- Analizar las características clínicas, histológicas e inmunofenotípicas del linfoma y la sobrevida libre de eventos (SLE) de los 3 grupos en forma comparativa según su asociación con EBV, para determinar si la presencia del virus tiene algún impacto en la evolución clínica de esta enfermedad.



METODOLOGÍA

4 METODOLOGÍA

4.1 POBLACIÓN EN ESTUDIO

Se incluyeron en el estudio 102 pacientes con diagnóstico de LDGCB según criterios de la OMS (2008): 26 pediátricos (13 varones, 13 mujeres; rango de edad: 2-16 años, mediana: 9 años), 24 adultos menores de 50 años (12 varones, 12 mujeres; rango de edad: 18-49 años, mediana: 36 años) y 52 pacientes adultos mayores de 50 años (25 varones, 27 mujeres; rango de edad: 50-84 años, mediana: 70 años).

Las muestras fueron recolectadas de forma retrospectiva y prospectiva, según la disponibilidad de suficiente tejido fijado en formol e incluido en parafina, de los archivos de la División Anatomía Patológica del Hospital de Niños Ricardo Gutiérrez (HNRG) en los casos pediátricos (período comprendido entre 1987-2013) y del Servicio de Patología de la Academia Nacional de Medicina (ANM), en los casos adultos (período comprendido entre 2009-2013). Los datos clínicos se obtuvieron de la historia clínica de cada paciente. En todos los casos las muestras analizadas fueron tomadas para la realización del diagnóstico, antes de la implementación del tratamiento.

Dentro de los 26 pacientes pediátricos, se incluyeron 7 casos con inmunodeficiencia de base, los cuales comprendían 1 paciente HIV positivo, 4 con inmunodeficiencia primaria (1 con Síndrome de Burkley, 1 con ataxia-telangiectasia y 2 con inmunodeficiencia común variable), y 2 pacientes con inmunodeficiencia secundaria asociada a tratamiento inmunosupresor post-trasplante. Todos los pacientes adultos, tanto menores como mayores de 50 años, eran inmunocompetentes sin presentar historia previa de inmunosupresión.

Este estudio contó con la aprobación del Comité de Docencia e Investigación y del Comité de Ética de ambas instituciones. En todos los casos se obtuvo un consentimiento informado de los pacientes adultos, y de los padres o tutores de los pacientes pediátricos, y un asentimiento informado, en el caso de los pacientes pediátricos, para la participación en este trabajo. Se garantizó la confidencialidad de los datos el Comité se registró por la Ley de Protección de los Datos Personales N° 25.326 / 2000. Las aprobaciones de los comités respectivos y los modelos de los consentimientos y asentimiento informado se adjuntan en el Apéndice B, sección 9.2.

4.2 MUESTRAS

El material de la biopsia fue seccionado y fijado en una solución de formol 4%, deshidratados mediante pasajes sucesivos en concentraciones crecientes de etanol (70%, 95% y 100%), xilol y finalmente incluidos en parafina. Se realizaron cortes histológicos de 5µm sobre portaobjetos cargados positivamente para facilitar su adherencia y 2-4 secciones de 10µm fueron colocadas dentro de tubos de microcentrífuga de 1,5ml hasta su posterior procesamiento.

4.3 DIAGNÓSTICO Y CARACTERIZACIÓN HISTOLÓGICA

El diagnóstico y la evaluación histopatológica de las biopsias se realizó mediante la técnica de inmunohistoquímica (IHQ), como parte del procedimiento de diagnóstico habitual, en la División Patología de cada institución. Las secciones de tejido se tiñeron con hematoxilina y eosina (H&E) para evaluar la morfología celular general, la presencia de necrosis geográfica, figuras mitóticas y de cuerpos apoptóticos. Todas las biopsias fueron diagnosticadas y clasificadas por al menos 2 patólogos, la Dra. De Matteo (jefa de la División Patología HNRG) y la Dra. Narbaitz (jefa de la División Patología ANM), de acuerdo al esquema de clasificación de LNH de origen B de la OMS (Swerdlow y col. 2008). Para minimizar el error interobservador, antes de comenzar el estudio ambos patólogos acordaron criterios para la evaluación histológica. En aquellos casos en que surgió una discrepancia, se observó la biopsia en forma simultánea en un microscopio binocular con fototubo doble (Axiostar Plus, Carl Zeiss). Para ello, se utilizó un panel de anticuerpos: CD45 (Cell Marque), CD3 (Cell Marque), CD20 (Dako), CD10 (Cell Marque), bcl-2 (Dako), bcl-6 (Dako), and MUM-1 (Dako), Ki67 (Dako), CD30 (Cell Marque), ALK (Cell Marque). En base al algoritmo de Hans que se describió anteriormente (Hans y col. 2004) (Figura 5) se las clasificó, según la disponibilidad de material, según subtipo histológico de CG o post-CG, lo que indica su subtipo histológico o célula de origen.

4.4 HIBRIDACIÓN *IN SITU* (HIS) PARA EBERS

La presencia de EBV en las células tumorales de los LDGCB se determinó sobre los cortes histológicos de todos los casos mediante la técnica patrón para establecer la asociación de EBV con linfomas: hibridación *in situ* (HIS) para pequeños ARN virales [EBERs (*Epstein Barr encoded RNAs*)]. Los EBERs se transcriben en el orden de 10⁶ copias por episoma viral, por lo tanto permiten la detección de la presencia del EBV

con gran sensibilidad. Esta técnica se realizó utilizando el equipo comercial *PNA ISH Detection Kit* (Dako cytometry) según las instrucciones del fabricante. Se procedió a desparafinizar los cortes histológicos mediante pasajes sucesivos por xilol y etanol, comenzando por xilol 100% y finalizando con etanol al 70%. Posteriormente se trataron con una solución de proteinasa K 5µg/ml en *buffer* Tris Salino (TBS) (50mM Tris pH 7,6 y 150mM de NaCl) en cámara húmeda por 20 min, con el fin de desenmascarar el tejido para aumentar la accesibilidad de la sonda al mismo. Luego se procedió a un lavado y deshidratación en etanol 96° (Merck), y secado, previo a la incubación con la sonda. La hibridación se realizó con 2 sondas de oligonucleótidos de 30 bases complementarias específicas para los fragmentos EBER-1 y EBER-2 (Dako cytometry), conjugadas con isotiocianato de fluoresceína (FITC). La reacción de hibridación se realizó a 55°C durante 90 min. Luego de un lavado de 25 min a 55°C con una solución astringente provista por el fabricante, se incubó cada muestra con un anticuerpo anti-FITC conjugado con la enzima fosfatasa alcalina y posteriormente se lavó dos veces con *buffer* TBS durante 5 min. Finalmente, las muestras se incubaron en oscuridad durante 60 min con el sustrato de fosfatasa alcalina NBT/BCIP (cloruro de nitro-blue/5-bromo-4-cloro-3'-indolfosfato) y la reacción se interrumpió sumergiendo los cortes en agua destilada. Cada corte histológico se contracoloró con hematoxilina, y se montó con una solución de montaje acuoso comercial (Dako cytometry) para luego observarlo bajo el microscopio óptico. En cada reacción de hibridación se utilizó como control positivo un LH de celularidad mixta que presenta marcación específica en las células de Reed-Sternberg y como control negativo se realizó el mismo procedimiento en un corte caracterizado como EBV-. Se consideró un resultado positivo para EBERs cuando los núcleos de las células neoplásicas presentaron marca azul-violeta oscuro.

4.5 INMUNOHISTOQUÍMICA (IHQ)

4.5.1 DETECCIÓN DE PROTEÍNAS VIRALES DE LATENCIA Y CICLO LÍTICO

En todos los casos donde se observó marcación específica de EBERs se evaluaron mediante IHQ la presencia de diversos antígenos virales: proteínas de latencia (EBNA2, EBNA3A, LMP1, LMP2A) y una proteína lítica temprana (BMRF1).

Sobre los cortes de biopsias fijadas en formol e incluidas en parafina se procedió a la desparafinización con xilol y posterior hidratación por pasajes sucesivos en etanol

100°, 96° y 70°, para concluir con lavados con agua destilada y *buffer* TBS. Luego se inactivó la peroxidasa endógena por tratamiento con H₂O₂ 3% en agua destilada durante 30 min a 25°C, y el exceso se eliminó por lavados con *buffer* TBS-Tween 20 0,1% (TBS-T). Posteriormente, se realizó el desenmascaramiento antigénico en *buffer* citrato 0,01M pH 6 en autoclave. Brevemente, se precalentó el autoclave durante 20 min, y se colocaron las muestras en un *coplin* con *buffer* citrato 0,01M pH 6 (para LMP1 y -2A) o Tris 10mM-EDTA 1mM pH 9 (para EBNA2, -3A y BMRF1) dentro del autoclave. Una vez que el autoclave alcanzó los 20psi se mantuvo la presión durante 5 min (para LMP1 y -2A) o 20 min (para EBNA2, -3A y BMRF1). Se apagó el autoclave, se esperó el descenso de la presión y se retiraron las muestras del mismo. Terminado el proceso se incubó durante 20 min a 25°C para que descienda gradualmente la temperatura y se realizó un lavado de 10 min en *buffer* TBS-T. Posteriormente se procedió al bloqueo de unión inespecífica por tratamiento con bloqueante comercial *SuperBlock* (ScyTek), por incubación durante 10 min en cámara húmeda a 25°C. Se realizó la incubación *overnight* (O.N.) en cámara húmeda con 100µl de los anticuerpos primarios adecuadamente diluidos.

- Anticuerpo monoclonal de ratón anti-EBNA2 (clones 1E6+ R3) (donados por la Dr. Kremmer, Forschungszentrum fur Umwelt und Gesundheit GmbH, Institut fur Immunologie, Alemania), dilución 1/5 en *buffer* TBS-1% seroalbúmina bovina (BSA).
- Anticuerpo policlonal de oveja anti- EBNA3A (Abcam) dilución 1/100 en *buffer* TBS-2% BSA.
- Anticuerpo monoclonal de rata anti-LMP2A (clon 15F9) (Abcam), dilución 1/200 en *buffer* TBS-1% BSA.
- Pool de anticuerpos monoclonales de ratón anti LMP-1 (Clones CS1-4) (Dako), dilución 1/50 en *buffer* TBS- 1% BSA.
- Anticuerpo monoclonal de ratón anti-BMRF1 (clones G3-E31) (Abcam), dilución 1/200 en *buffer* TBS- 1% BSA.

Luego se procedió a la detección y revelado de la señal con el equipo comercial *UltraTek HRP Anti-Polyvalent Lab Pack Imaging system* (ScyTek Laboratorios), excepto para el caso de EBNA3A donde se utilizó un anticuerpo secundario anti-oveja conjugado con peroxidasa diluido 1/500 en TBS-1% BSA. El sistema comercial que se

utilizó en la detección y amplificación de la señal se basa en que un anticuerpo secundario biotinilado se une a avidina/streptavidina conjugada con peroxidasa, Para ello se lavó el exceso de anticuerpo primario con *buffer* TBS durante 5 min, se incubó con el anticuerpo secundario anti Fc γ polivalente (ratón-rata-cobayo-conejo) marcado con biotina en cámara húmeda durante 30 min, mientras que el anti-oveja conjugado a peroxidasa fue incubado 1hs a 25°C. Se lavó con *buffer* TBS 10 min y se incubó otros 30 min con streptavidina-peroxidasa, excepto para la marcación de EBNA3A. Finalmente se reveló con el sustrato de peroxidasa Diaminobencidina (*DAB Substrate Kit for Peroxidase*, Dako) observando en el microscopio óptico en campo de 40X la progresión de la reacción hasta frenarla con agua destilada. Acto seguido se contracoloró con hematoxilina, se deshidrató por pasajes sucesivos en etanol 96°, 100° y xilol, y se montó en Bálamo de Canadá para su posterior observación al microscopio óptico.

Como control negativo se sustituyó el anticuerpo primario por *buffer* diluyente de cada ensayo y como controles positivos, y para evaluar la especificidad del anticuerpo, se incluyeron 2 líneas celulares linfoblastoideas humanas EBV positivas fijadas en formol e incluidas en parafina, según corresponda:

- Raji: EBV tipo 1 con delección en EBNA3C
- P3HR1: EBV tipo 2 con delección en EBNA2

Estas líneas celulares fueron utilizadas como control de expresión de proteínas de latencia (o su ausencia en el caso de EBNA2 para P3HR1), dado que en cultivo ambas líneas celulares expresan todas las proteínas del ciclo de latencia viral (latencia III). Brevemente, se cultivaron ambas líneas celulares en medio de cultivo completo RPMI 1640 suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB) en botellas de 75cm². Las células fueron incubadas en estufa humidificada a 37°C y 5% CO₂. Se realizó el recuento en cámara de Neubauer y evaluó su viabilidad mediante la incorporación de Azul Tripán. Se utilizó una suspensión conteniendo 10⁸-10⁹ células viables/ml, lo necesario para obtener un pellet celular de 0,5ml. Este pellet fue lavado con *buffer* salino de fosfatos (PBS) estéril, y se lo fijó mediante incubación O.N. a 4°C en formol 10%. Luego se prosiguió con la de acuerdo a la técnica de preparación histológica para la obtención de un bloque de parafina.

Para el control de la expresión de antígenos líticos virales, se realizó la inducción del ciclo lítico viral de la línea celular P3HR1. Esto se logró manteniendo la línea celular en las mismas condiciones de cultivo que se mencionaron anteriormente.

Se realizó el tratamiento de una suspensión celular de 10^6 células/ml durante 72hs con 12-O-tetradecanoilforbol-13-acetato (TPA o PMA) en concentración final 50ng/ml (Sigma) (zur Hausen y col. 1978; Luka y col. 1979). Luego se procedió con la preparación del bloque de parafina como se mencionó en el párrafo anterior.

Caracterización del microambiente tumoral

Se realizó mediante IHQ utilizando los siguientes anticuerpos primarios específicos:

- *Para diferenciación de linfocitos T:* anticuerpo monoclonal de ratón anti-CD4 humano (RTU-CD4-1F6, Leica) y anticuerpo monoclonal de ratón anti-CD8 humano (clon C8/144B, Dako Cytomation), ambos listos para usar.
- *Para detección de linfocitos T reguladores:* anticuerpo monoclonal de ratón anti-FoxP3 (clon 236A/E7, Abcam) dilución 1/100 en *Buffer* TBS-1%BSA.
- *Para detección de células (linfocitos T o NK) citotóxicas activadas:* anticuerpo monoclonal de ratón anti-granzima B (clon GB7, AbDSerotec), dilución 1/100 en *Buffer* TBS-1%BSA.
- *Para la detección de moléculas reguladoras en linfocitos T (CD4 o CD8) activados:* anticuerpo policlonal de conejo anti- PD-1/ CD279 (AbDSerotec), dilución 1/600 en *Buffer* TBS-1%BSA.

Sobre los cortes biopsias fijadas en formol e incluidas en parafina se procedió a la desparafinización e hidratación, bloqueo de peroxidasa endógena y de unión inespecífica como se describió previamente en la sección 4.5.1. En todos los casos luego de la desparafinización e hidratación se realizó el desenmascaramiento antigénico en *buffer* citrato 0,01M pH 6 en autoclave. Luego de los bloqueos específicos, las muestras se incubaron 1 hora a 25°C con cada uno de los anticuerpos primarios específicos antes mencionados. Se utilizó para la detección el sistema comercial *UltraTek HRP Anti-Polyvalent Lab Pack Imaging system* (ScyTek Laboratorios), como se describió en la sección 4.5.1 y finalmente se contracoloró, deshidrato y montó.

Como control positivo para los anticuerpos primarios se utilizaron cortes de ganglio linfático normal y amígdalas palatinas. Como control negativo se reemplazaron los anticuerpos primarios por *buffer* TBS.

4.5.2 CUANTIFICACIÓN DE LAS POBLACIONES CELULARES

Para cada muestra ensayada se contaron las células inmunomarcadas y las células totales. Esto se realizó en un total de 10 campos a un aumento de $\times 1000$ en las marcaciones de CD4, CD8, FoxP3, GrB y PD-1. Utilizando un microscopio con cámara integrada (Axioscope, Carl Zeiss), se procedió a tomar fotografías de los campos en base a la presencia de marcación específica en zonas bien preservadas. El recuento se realizó mediante la herramienta *cell counter* del programa *Image J*. No se tuvieron en cuenta células parcialmente incluidas en el campo. La inmunoreactividad se expresó como la relación entre el número de células positivas sobre el número de células totales contadas en 10 campos.

4.6 AISLAMIENTO Y PURIFICACIÓN DE ARN

Dependiendo de la cantidad de material, se utilizaron 2 - 4 secciones de $10\mu\text{m}$ de las muestras fijadas en formol e incluidas en parafina para la obtención de ácidos nucleicos. Se purificó el ARN total mediante el uso del equipo comercial *RecoverAll Total Nucleic Acid Isolation Kit* (Ambion) siguiendo las especificaciones del fabricante, pero modificando el tiempo del tratamiento proteolítico. Brevemente, se realizó la desparafinización con 1ml de xilol seguido del lavado del tejido por etanol 100%. Se centrifugó a 10000rpm y se obtuvo un *pellet*, el cual se resuspendió en *buffer* lisis y proteinasa K, esto se incubó a 55°C O.N. y 80°C 15 min para inactivar la proteinasa. Luego, se adicionó etanol 100% (Merck) y el lisado se transfirió a la columna comercial para retener el ARN. Se centrifugó, se tomó la columna y descartó el eluato. Este protocolo incluye un paso de tratamiento con ADNasa para asegurar la ausencia de ADN contaminante en el producto final. Luego, se realizaron lavados con dos *buffers* diferentes y por último, el ARN fue eluido por centrifugación de la columna con *buffer* de elución. Se conservó el ARN extraído a -70°C hasta su uso.

Para la extracción de ARN a partir de las líneas celulares utilizadas para control de expresión de genes virales (Raji y P3HR1 con y sin inducción, protocolo en sección 4.5.1) o células mononucleares de sangre periférica (CMSP) estimuladas utilizadas para control de expresión de genes de citoquinas (protocolo en sección 4.9.2) se utilizó el equipo *QIAamp RNeasy Mini Kit* (Qiagen) según las instrucciones del fabricante. Brevemente, para los bloques de parafina de las líneas celulares se realizó la desparafinización con xileno seguida de la hidratación del tejido pasando por mezclas

sucesivas de etanol-agua. Se centrifugó y se obtuvo un *pellet*, el cual se resuspendió en *buffer* lisis y proteinasa K, esto se incubó a 55°C 15 min y 80°C 15 min, se adicionó *buffer* RBC y el lisado fue transferido a una columna para retener el ADN, se centrifugó, se tomó el eluato y se descartó la columna. Se agregó etanol 100%, se colocó la mezcla en una segunda columna de elución provista, se centrifugó y descartó el eluato. Luego, se realizaron lavados con dos *buffers* diferentes y por último, el ARN fue eluído por centrifugación de la columna con agua destilada. El mismo procedimiento, exceptuando el primer paso de desparafinización, fue realizado para las CMSP estimuladas. Se conservó el ARN extraído en freezer a -70°C hasta su utilización.

4.7 CUANTIFICACIÓN DE ARN TOTAL

Previo a la retrotranscripción (RT), el ARN se cuantificó en dilución 1/100 en un espectrofotómetro UV/Visible (Beckmann), y se registró la absorbancia de la muestra a 260 y 280nm (A_{260} y A_{280} , respectivamente), y la relación A_{260}/A_{280} que se consideró adecuada fue entre 1,7 y 2 por ser la que indica una correcta integridad del ARN obtenido. La concentración ($\mu\text{g/ml}$) se calculó según la ecuación: $A_{260} \times 40$ (ng/unidad de DO)*factor de dilución.

4.8 OBTENCIÓN DE ADN COPIA (ADNC)

A partir de 2 μg de ARN total extraído se realizó una reacción de RT en un volumen final de 20 μl . Se utilizaron como iniciadores 100ng de *random* hexámeros y 200UI de la enzima transcriptasa reversa *Superscript II RT* (Invitrogen) según instrucciones del fabricante. El ARN extraído se desnaturalizó durante 5 min a 65°C en presencia de los hexámeros y los desoxiribonucleótidos trifosfato (dNTPs). Se enfrió en hielo y se colocó la mezcla de retrotranscripción conteniendo *buffer* de reacción, ditiotreitól (DTT) e inhibidores de ARNasa y se incubó 2 min a 25°C. Finalmente, se agregó la enzima y la mezcla fue incubada 10 min a 25°C, 50 min a 42°C y 15 min a 70°C para inactivar la reacción. El producto fue diluido 1/5 y guardado a -20°C hasta su utilización. La integridad del ARN extraído y las posibles contaminaciones con ADN genómico se verificaron amplificando el gen reportero PGK, que da un producto de 200pb en el caso de extracción de ARN de buena calidad, junto con uno de 600pb solo en caso de tener ADN contaminante (Fritsch y col. 2003).

4.9 PCR EN TIEMPO REAL

4.9.1 DETERMINACIÓN DE LA EXPRESIÓN RELATIVA DE TRANSCRIPTOS VIRALES

Se determinó la presencia de los diferentes ARNm de latencia y de ciclo lítico del EBV con *primers* específicos (Tabla II). Estos se diseñaron especialmente para este trabajo de tesis, usando el programa *Primer Express* (Applied Biosystems) y están dirigidos contra regiones altamente conservadas. Los genes amplificados fueron: EBNA1, EBNA2, EBNA3C, LMP1 y LMP2A para complementar el análisis por IHQ y definir el tipo de latencia; y BZLF1, BHRF1 y BLLF1 para analizar la expresión de genes virales en las etapas inmediatamente temprana, temprana y tardía del ciclo lítico, respectivamente. Cada par de *primers* se ensayó en las líneas celulares EBV positivas Raji (EBV tipo 1) y P3HR1 (EBV tipo 2), sin inducir para el caso de los genes de latencia e inducidas con TPA para los genes líticos, para asegurar la especificidad y la sensibilidad de los mismos frente a los diferentes tipos de EBV. Los niveles de expresión de los ARNm virales fueron normalizados contra el gen endógeno establemente expresado hipoxantina-guanina fosforribosiltransferasa (HPRT), el cual se utilizó como control endógeno y gen de referencia (Gref). Esta elección se realizó siguiendo las recomendaciones que aconsejan que el nivel de expresión del Gref debe ser constante en todas las condiciones experimentales y no debe diferir demasiado de los niveles de los genes de interés (Gi) ensayados, permitiendo una normalización más adecuada y precisa. Durante la puesta a punto se probó también la expresión del gen endógeno β -actina, pero éste se desestimó debido a la gran diferencia en los niveles expresión que mostró respecto de los Gi (Sanders y col. 2014).

Tabla II. Listado de *primers* específicos utilizados en la detección de transcritos virales y del gen endógeno

Gen		Nombre primers	Secuencia	Tamaño amplicon (pb)
EBNA1	latente	qEBNA1f	5'-TAGATTTGCCTCCCTGGTTT-3'	94
		qEBNA1r	5'-ACCTCATCTCCATCACCTC-3'	
EBNA2	latente	qEBNA2f	5'-TGTGGTTGGGCAGGTACA-3'	102
		qEBNA2r	5'-CCCCATGTAACGCAAGATAG-3'	
EBNA3C	latente	qEBNA3Cf	5'-CGACCCAAAGGGACTCAATG-3'	60
		qEBNA3Cr	5'-GGCCAACGCCGATATTC-3'	
LMP1	latente	qLMP1f	5'-AATCTGGATGTATTACCATGGACAAC-3'	65
		qLMP1r	5'-GCGGGAGGGAGTCATCGT-3'	
LMP2A	latente	qLMP2f	5'-CGGGATGACTCATCTCAACACATA-3'	148
		qLMP2Ar	5'-GGCGGTCACAACGGTACTAACT-3'	
BZLF1	lítico	qBZLF1f	5'-CTGCGCCTCTGTTGAAG-3'	90
		qBZLF1r	5'-TTAAGAGATCCTCGTGTAACATCT-3'	
BHRF1	lítico	qBHRF1f	5'-GACCTGTGAGTTCGTGGGATGT-3'	62
		qBHRF1r	5'-TGTTGATGAATCCAACATCCA-3'	
BLLF1	lítico	qBLLF1f	5'-CTCGGGTGCCTTGGAGAATA-3'	62
		qBLLF1r	5'-CACGAACGGCTACCAATGC-3'	
HPRT	endógeno	qHPRTf	5'-ATGGGAGGCCATCACATTGT-3'	77
		qHPRTTr	5'-ATGTAATCCAGCAGGTCAGCAA-3'	

Abreviaturas: EBNA: *Epstein Barr Nuclear Antigen*; LMP: *Latent membrane protein*; BZLF1: *EBV immediate-early protein*; BHRF1: *EBV early protein* homólogo de *bcl2*; BLLF1: *EBV late protein* o *gp350/220*; HPRT: hipoxantina-guanina fosforribosiltransferasa; pb: pares de bases

La reacción se realizó en un volumen final de 25µl utilizando *SYBR Green PCR Master Mix Kit* (Applied Biosystems), 5ul de ADNc diluido (equivalente a 100ng de ARN) y 500nM de cada par de *primers*. Se realizó la reacción de PCR en tiempo real en un termociclador *StepOne real-time detection system* (Applied Biosystems) bajo condiciones universales de termociclado: 2 min a 50°C, 10 min a 95°C y 40 ciclos de 15 seg a 95°C con 1 minuto de extensión a 60°C.

Para la calibración y la generación de las curvas estándar, se incluyeron en cada corrida una serie de diluciones 1/10 a partir de ADNc de las líneas celulares Raji o P3HR1 (basales o inducidas) según correspondiera, comenzando por 100ng hasta 10 pg. Una curva de disociación (*melting curve*) se incluyó en cada corrida para verificar la especificidad del producto obtenido y la ausencia de productos inespecíficos o dímeros de *primers*. Se obtuvieron valores de Ct (*cycle threshold*) para cada gen en todos los puntos de las curvas estándar. Todas las muestras se ensayaron por duplicado y se expresaron como un promedio. Se incluyeron controles de no-templado (*NTC*) y los valores de expresión obtenidos de una cantidad equivalente de ADNc de las líneas

celulares se utilizaron como calibradores para el cálculo de la expresión relativa en cada una de las muestras ensayadas.

4.9.2 DETERMINACIÓN DE LA EXPRESIÓN RELATIVA DE TRANSCRIPTOS DE CITOQUINAS Y QUIMIOQUINAS

Para cuantificar la expresión de los genes de determinadas citoquinas y poder correlacionarla con la expresión de los genes virales, a fin de establecer si la expresión de algún gen viral en particular está asociado a la variación en la expresión génica de alguna citoquina, se determinó la presencia de ARNm de citoquinas del tipo pro- y anti-inflamatorias (IFN γ , IL-10 y TGF β 1) así como de una quimioquina responsable de la atracción de linfocitos (CCL20). Para ello se usaron *primers* específicos obtenidos de la base de datos *online* <http://primerdepot.nci.nih.gov/> (Tabla III).

Tabla III. Listado de *primers* específicos utilizados en la detección de transcritos de citoquinas y quimioquinas humanas

Gen	Referencia	Nombre primers	Secuencia	Tamaño amplicon (pb)
IFN γ	NM_000619	qIFN γ f qIFN γ r	5'-GTATTGCTTTGCGTTGGACA-3' 5'-GAGTGTGGAGACCATCAAGGA-3'	128
IL-10	NM_000572	qIL10f qIL10r	5'-TCAAACACTCACTCATGGCTTTGT-3' 5'-GCTGTCATCGATTTCTTCCC-3'	112
TGF β 1	NM_000660	qTGF β f qTGF β r	5'-CTTCCAGCCGAGGTCCTT-3' 5'-CCCTGGACACCAACTATTGC-3'	92
CCL20	NM_004591	qCCL20f qCCL20r	5'-CGTGTGAAGCCCACAATAAAA-3' 5'-GTGCTGCTACTCCACCTCTG-3'	110

Abreviaturas: CCL20: *Chemokine (C-C motif) ligand 20*; IFN γ : interferón γ ; IL-10: interleuquina 10; pb: pares de bases; TGF β : *transforming growth factor beta 1*

Se procedió de igual manera que en la sección 4.9.1 pero se utilizó ADNc obtenido a partir del ARN de las CMSP estimuladas como calibrador. Brevemente, con el objetivo de aislar las CMSP, la muestra de sangre de un donante sano se homogeneizó y diluyó al medio con *buffer* PBS estéril y se trabajó en condiciones de esterilidad. La muestra diluida se sembró sobre un colchón de *Ficoll-Paque plus* (GE Healthcare) y centrifugó a 1.400 rpm durante 30 min. Se recuperó el halo correspondiente a las CMSP y estas se lavaron dos veces con *buffer* PBS estéril. Luego del último lavado, las células finalmente se resuspendieron en medio completo RPMI 1640 suplementado con 10% SFB. Se estimularon durante 4h en estufa humidificada a 37°C y 5% CO₂, 1x10⁶ células/ml con la combinación de los

mitógenos ionomicina (ionóforo, 1µg/ml) y PMA (éster de forbol, 0,1µg/ml) usados en proporción 1:1 respecto de la concentración de células. Luego del estímulo se procedió a la extracción de ARN total como se menciona en la sección 4.6.

4.9.3 CÁLCULO DE LA DE EXPRESIÓN GÉNICA

La cuantificación relativa de la expresión de genes, tanto virales como humanos, se realizó según las recomendaciones del fabricante (*Guide to Performing Relative Quantitation of Gene Expression Using Real-Time Quantitative PCR*, Applied Biosystems). Brevemente, la amplificación del gen de interés (Gi) y el gen de referencia (Gref) se monitoreó continuamente mediante el cambio en la intensidad de fluorescencia, utilizando el software *StepOne*. Los gráficos de amplificación fueron usados para determinar el valor de Ct, que se define como el número de ciclos que es necesario para que la señal fluorescente supere el umbral establecido. El método tradicionalmente usado, el $2^{-\Delta\Delta Ct}$, asume que las eficiencias (E) de Gi y Gref son iguales y son del 100%. Sin embargo, en la mayoría de los casos, las eficiencias de amplificación del Gi y del Gref endógeno son diferentes, por lo cual es conveniente utilizar un algoritmo de cálculo que contemple esta diferencia. Es por esto se decidió utilizar el método de Pfaffl (Pfaffl 2001), cuya ecuación se muestra a continuación:

Eficiencia de amplificación (E): $10^{-1/\text{pendiente}}$

Expresión relativa (*fold change*): $[(EGi)^{Ct(Gi, \text{calibrador}) - Ct(Gi, \text{muestra})}] / [(EGref)^{Ct(Gref, \text{calibrador}) - Ct(Gref, \text{muestra})}]$

Referencias utilizadas en este trabajo: Gi: genes virales o de citoquinas humanas; Gref: HPRT; Calibrador: líneas celulares utilizadas (Raji o P3HR1, basal o inducida) o CMSP estimuladas; Muestra: ADNc de LDGCB.

Para poder utilizar este algoritmo es necesario conocer la pendiente de la curva de calibración de cada Gi y del Gref, por ello las mismas se incluyeron en cada ensayo. A partir de estas curvas estándar se calcularon las eficiencias de amplificación, que variaron entre 88% y 108% en todos los genes, tanto virales como celulares. El valor medio de Ct de una cantidad equivalente (100ng) de ADNc de Raji, P3HR1 o CMSP estimuladas, según corresponda, se utilizó como calibrador en el cálculo.

4.10 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

El análisis estadístico se realizó con el programa GraphPad Prism v5.01 (Graphpad). Para evaluar la asociación de variables categóricas se utilizaron el test exacto de Fisher o el test de Chi cuadrado (χ^2) según correspondiera. Para comparar las medias entre grupos se utilizó test de Student o ANOVA. Para determinar las diferencias entre grupos que no se distribuyen normalmente, las medias se compararon mediante el test de Mann-Whitney o Kruskal-Wallis según correspondiera. Se utilizó el coeficiente de correlación de Pearson para calcular el grado de asociación entre variables continuas normalmente distribuidas y el de Spearman para variables no paramétricas. Los resultados se representan en diagramas de cajas. La línea horizontal dentro de cada caja indica la mediana. Las líneas horizontales por fuera de las cajas representan los percentiles 5 y 95. La media se indica como +.

Para evaluar la eficiencia de un valor de corte utilizado (por ej. el porcentaje de células EBERs+ para designar un caso como LDGCB EBV+) se calculó la sensibilidad y la especificidad y se construyó la curva de ROC (del inglés *Receiver Operating Characteristic*), que representa la sensibilidad en función de la inversa de la especificidad en cada valor. Se evaluó la potencia de este valor mediante el área bajo la curva ROC (AUROC). Se considera que un AUROC de 1,0 corresponde a una prueba ideal, mientras que 0,5 indica que una prueba no tiene valor diagnóstico. Se considera aceptable cuando el AUROC es mayor a 0,7. Se determinó que el valor de corte es adecuado cuando la suma de la sensibilidad y la especificidad es máxima. Los mismos se determinaron utilizando el programa GraphPad Prism v5.01 (Graphpad).

Se analizó la supervivencia libre de eventos (SLE) de los pacientes usando el análisis de supervivencia de Kaplan Meier, y la comparación de curvas con el test de log-rank. La SLE se definió desde el momento de inicio del tratamiento hasta la ocurrencia de un evento o última fecha de seguimiento. Un evento fue definido como el fracaso de alcanzar remisión completa, recaída luego de la remisión completa o muerte por alguna causa.

Todas las pruebas fueron de dos colas y se consideraron significativos valores de $p < 0,05$.



RESULTADOS

5 RESULTADOS

5.1 CARACTERIZACIÓN DE LA POBLACIÓN ESTUDIADA

Durante el período de desarrollo de este proyecto de tesis doctoral, se enrolaron retrospectiva y prospectivamente 102 pacientes con diagnóstico confirmado de LDGCB que correspondieron a 3 grupos etarios:

- 26 pediátricos. El rango de edades fue de 2 a 16 años con una mediana de 9 y la distribución por sexos fue de 13 varones y 13 mujeres;
- 24 adultos menores de 50 años. El rango de edades fue de 18 a 49 años con una mediana de 36 años y la distribución por sexos fue de 12 varones y 12 mujeres;
- 52 pacientes adultos mayores de 50 años. El rango de edades fue de 50 a 84 años con una mediana de 70 años y la distribución por sexos fue de 25 varones y 27 mujeres.

La diferencia en la cantidad de pacientes recolectados para cada grupo está basada en las características epidemiológicas que posee esta enfermedad, cuya mediana de edad de presentación a nivel mundial es de 65 años. La presencia de la patología se observó en una relación varón: mujer aproximada de 1:1 en los tres grupos estudiados.

Del total de los casos pediátricos analizados, 7 (27%) casos fueron pacientes inmunosuprimidos, tanto con inmunodeficiencias primarias como secundarias. Por el contrario, todos los pacientes adultos menores y mayores de 50 años fueron inmunocompetentes, sin historia previa de inmunosupresión.

5.1.1 ESTADÍO CLÍNICO Y LOCALIZACIÓN ANATÓMICA

Debido a que el LDGCB es un linfoma de rápida progresión, su agresividad clínica es mucho mayor que otras patologías, lo que resulta con frecuencia en un estadio clínico avanzado al momento del diagnóstico. Es por ello que, sobre la base de disponibilidad de datos, se determinó que el 53% de los pacientes pediátricos y el 54% de los adultos presentaban un estadio clínico avanzado (III-IV).

En referencia a las localizaciones anatómicas de los linfomas estudiados (Figura 6), la población exhibió una amplia variedad de sitios primarios de presentación. Si bien el mayor porcentaje de los casos adultos mostró localización ganglionar (70%) como ganglio cervical, mesentérico, retroperitoneal o submaxilar, el resto (30%) presentó

otros sitios menos frecuentes al momento del diagnóstico. De hecho, se vieron involucrados sitios extraganglionares de presentación que incluyeron regiones anatómicas como amígdala, abdomen, mediastino, sistema nervioso central, hígado, cavum, intestino, tiroides, mama, testículo, colon, bazo, médula ósea, tejido adiposo, estómago y bazo. Por el contrario, en los pacientes pediátricos la presentación extraganglionar fue la forma más frecuente (77%).

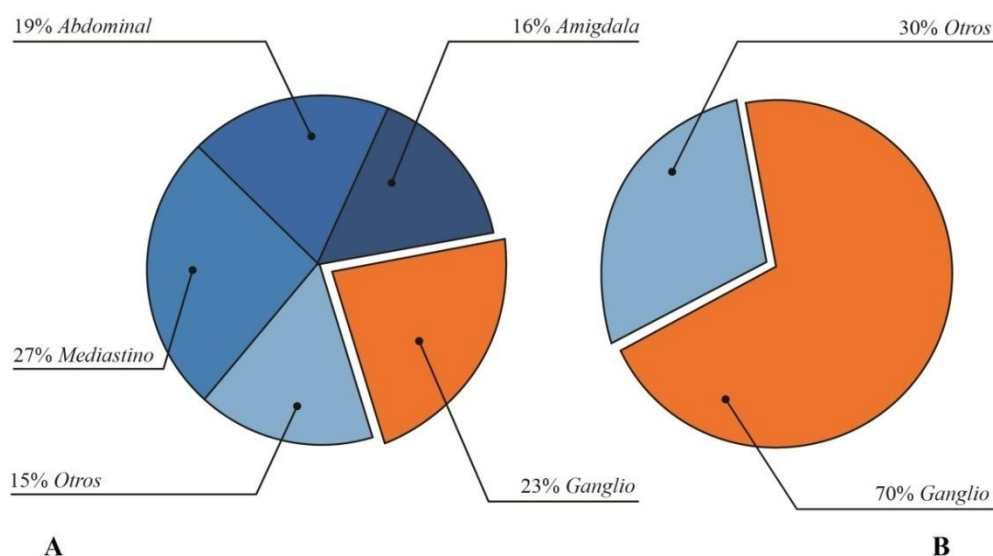


Figura 6. Distribución de las localizaciones anatómicas de los LDGCB. A) pacientes pediátricos. B) pacientes adultos.

5.1.2 ANÁLISIS HISTOLÓGICO E INMUNOFENOTÍPICO

La necrosis geográfica fue una característica destacada presente en varios de los casos adultos (30%), sin observarse el mismo fenómeno en los casos pediátricos. Más del 60% de las muestras de ambos grupos etarios presentó un índice de proliferación alto, dado que se observó la presencia de células Ki-67 positivas en más del 70% del tejido tumoral, reflejando por ende el carácter agresivo de este linfoma. Otras características histológicas observadas fueron la presencia frecuente de figuras mitóticas en las células tumorales y cuerpos apoptóticos.

Los LDGCB se clasificaron por su origen celular, según la clasificación de Hans y col. (Hans y col. 2004), en dos subtipos histológicos: derivados del CG, que presentan el marcador CD10 positivo en las células neoplásicas junto con el marcador bcl-6; y los clasificados como post-CG, es decir, CD10 negativo y MUM-1 positivo. En aquellos

casos con material disponible se realizó la subclasificación, y de esta forma un 63% de los casos pediátricos se subclasificaron como post-CG mientras que el 53% de los adultos como de origen CG.

5.2 DETERMINACIÓN DE LA PRESENCIA DE EBV

La HIS es la técnica patrón para determinar la asociación con EBV en linfomas. Se observó tinción específica para los transcritos EBERs en el núcleo de las células tumorales en un porcentaje variable (5% a 90%) de las mismas (Figura 7). De los 102 casos ensayados, se encontró expresión positiva para EBERs en las células tumorales en 11 de 26 casos (42%) pediátricos, 5 de 24 (21%) adultos menores de 50 años y 11 de 52 (21%) adultos mayores de 50 años.

Cabe destacar que no existe actualmente un consenso que establezca el porcentaje requerido de células tumorales EBERs+ para definir un caso como LDGCB EBV+, lo cual es una limitante a la hora de determinar la prevalencia de esta entidad en un estudio (Park y col. 2007; Chuang y col. 2010; Wada y col. 2011). En el presente trabajo de tesis, para establecer el número de células positivas usado como valor de corte, nos basamos en una amplia revisión bibliográfica realizada por varios autores (Wada y col. 2011; Castillo 2012; Ok y col. 2013; Ozsan y col. 2013) como también en la observación de características particulares de la infección por EBV, que se mencionan en la sección 5.3.1 y 5.3.2. Sumado a esto, con el objetivo de reforzar nuestras consideraciones se construyó la curva de ROC y se evaluó el AUROC para definir el valor a partir del cual es posible discriminar que un caso debe ser clasificado dentro del grupo de LDGCB EBV+ o EBV-.

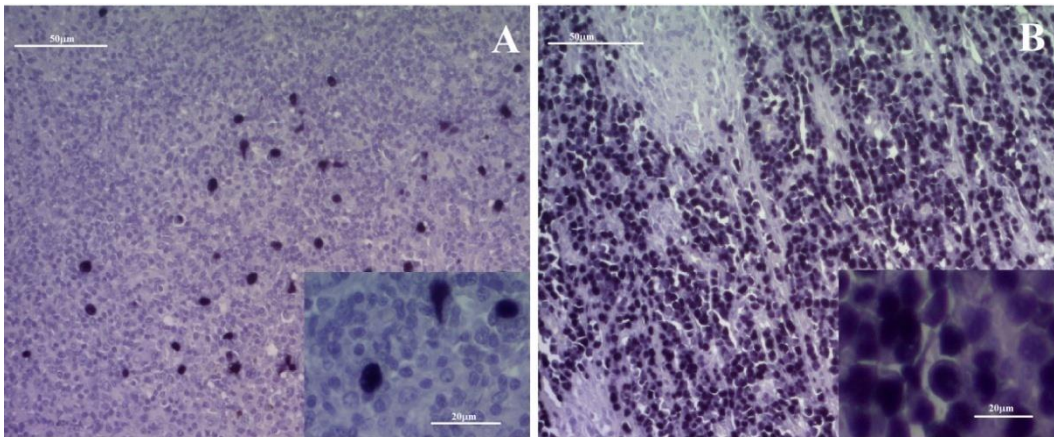


Figura 7. Hibridación *in situ* para pequeños ARN virales - EBERs. A) LDGCB con baja expresión de EBERs. B) LDGCB con alta expresión de EBERs. Se observa en ambos casos la marcación específica restringida al núcleo de las células tumorales y ausencia de la misma en los linfocitos adyacentes. En los recuadros se puede observar la marcación específica a mayor aumento.

En este trabajo de tesis, se estableció como valor de corte la observación de al menos el 20% de las células tumorales EBERs+ para definir un caso como LDGCB EBV+. Este valor presentó la mayor sensibilidad y especificidad (91,67% y 76,92%; respectivamente) y el AUROC fue de 0.862 (IC 95%: 0,7031-1,021), considerado de esta forma adecuado para su utilización.

A partir del mismo, se determinó que un total de 9/26 (35%) pacientes pediátricos, 4/24 (17%) adultos menores de 50 años y 4/52 (8%) adultos mayores de 50 años fueran definidos como LDGCB EBV+. El resto de los casos estudiados conformaron un subgrupo particular que presenta expresión de los transcritos EBERs en el 5-10% de las células malignas, y que a su vez muestra un perfil de expresión de antígenos virales diferente a aquellos que superaron el valor de corte establecido.

Tal como fue mencionado anteriormente, dentro de la población pediátrica estudiada los pacientes inmunosuprimidos conforman un grupo particular. Entre los 19 pacientes inmunocompetentes, 4 (16%) se definieron como LDGCB EBV+, mientras que en el caso de los pacientes pediátricos con inmunodeficiencia se observó $\geq 20\%$ de células malignas EBERs+ en 5/7(71%) casos estudiados. Como ya fue descrito en varios tipos de linfomas (Carbone y col. 2008), la presencia de EBV se asoció significativamente con el estado de inmunosupresión en el grupo pediátrico ($p=0,03$; test exacto de Fisher). Esta distinción no fue necesaria en los casos adultos, dado que todos ellos eran inmunocompetentes.

Comparativamente entre los 3 grupos etarios analizados, la frecuencia del LDGCB EBV+ no fue estadísticamente diferente (pediátricos inmunocompetentes: 4/19, jóvenes: 4/24, adultos: 4/52; $p > 0,05$; test de Chi cuadrado). Tampoco se encontró que el porcentaje de células tumorales EBERs+ mayor o menor al 20% presentara una asociación significativa con la edad de los casos ($p > 0,05$; test de Chi cuadrado). Esta comparación no incluyó pacientes pediátricos inmunosuprimidos que, como fue destacado previamente, por su condición inmunitaria presentan asociación significativa del EBV con linfomas con respecto a los inmunocompetentes. Si se incluyeran estos casos la frecuencia en pediátricos ascendería a 9/26, siendo estadísticamente diferente de los adultos mayores de 50 años ($p = 0,007$; test de Chi cuadrado).

La Tabla IV muestra la distribución de los casos EBERs+ en los 3 grupos etarios según el valor de corte establecido.

Tabla IV. Distribución de casos de LDGCB según el porcentaje de células tumorales EBERs+ y el grupo etario

Grupo etario	Total casos EBERs+ (n)	5-10% células EBERs+ n (%)	≥ 20% células EBERs+ n (%)	<i>p</i>
Pediátricos†	5	1 (20)	4 (80)	
Adultos <50 años	5	1 (20)	4 (80)	0,13
Adultos ≥50 años	11	7 (64)	4 (36)	

† Solo se tienen en cuenta los casos inmunocompetentes

Dada la epidemiología característica de la infección primaria por EBV en nuestro país, donde la misma se presenta en edades muy tempranas (Chabay y col. 2013), se analizó comparativamente las medias de edad dentro de cada grupo etario en los LDGCB EBV+ versus los LDGCB EBV-. Se determinó que la media de edad en el grupo pediátrico de los casos EBV+ era menor en forma estadísticamente significativa en comparación con los casos EBV- (6 años *versus* 11 años respectivamente, $p = 0,005$; test de Mann-Whitney), mientras que para ambos subgrupos de pacientes adultos, no se observaron diferencias en la media de edades en los LDGCB EBV+ *versus* los LDCGB EBV-, siendo 34 y 73 años *versus* 34 y 68 años, respectivamente ($p > 0,05$; test de Mann-Whitney).

En relación a otras características de la población analizadas en todos los grupos etarios, la presencia de EBV se observó mayormente en sexo masculino, estadio clínico avanzado, localización ganglionar y estadio madurativo post-CG. Sin embargo, no se determinaron diferencias significativas respecto de los casos EBV- ($p > 0,05$; test exacto de Fisher). En las Tablas V y VI se detallan las características clínicas y demográficas en relación con la presencia de EBV para pacientes pediátricos y adultos, respectivamente.

Tabla V. Características demográficas e histológicas en relación con la presencia del EBV en pacientes pediátricos (inmunocompetentes e inmunosuprimidos) con LDGCB

Características	EBV+ n (%)	EBV- n (%)	p
Edad			
≤10 años	8 (57)	6 (43)	0,02*
>10 años	1 (8)	11 (92)	
Sexo			
varón	5 (38)	8 (62)	1,00
mujer	4 (31)	9 (69)	
Subtipo histológico			
CG	2 (29)	5 (71)	0,35
post-CG	7 (58)	5 (42)	
ND	—	7	
Estadio clínico			
I-II (leve)	1 (13)	7 (87)	0,58
III-IV (avanzado)	3 (33)	6 (67)	
ND	5	4	
Localización			
ganglionar	4 (67)	2 (33)	0,15
extraganglionar	5 (25)	15 (75)	
Estado inmunológico			
inmunosuprimidos	5 (71)	2 (29)	0,03*
inmunocompetentes	4 (21)	15 (79)	

*Asociación estadísticamente significativa; test exacto de Fisher

Tabla VI. Características demográficas e histológicas en relación con la presencia del EBV en pacientes adultos (mayores y menores de 50 años) con LDGCB

Características	EBV+ n (%)	EBV- n (%)	p
Edad			
< 50 años	4 (17)	20 (83)	0,25
≥50 años	4 (8)	48 (92)	
Sexo			
varón	5 (14)	32 (86)	0,47
mujer	3(8)	36 (92)	
Subtipo histológico			
CG	5 (19)	22 (81)	0,42
post-CG	2 (7)	25 (93)	
ND	1	21	
Estadio clínico			
I-II (leve)	—	14 (100)	0,49
III-IV (avanzado)	2 (12)	14 (88)	
ND	6	40	
Localización			
ganglionar	7(15)	40 (85)	0,15
extraganglionar	1 (3)	28 (97)	

5.3 DEFINICIÓN DE LOS PERFILES DE EXPRESION VIRAL

5.3.1 DETECCIÓN DE TRANSCRIPTOS VIRALES

A fin de comenzar la caracterización de los perfiles de latencia y de ciclo lítico, se utilizó la técnica de PCR en tiempo real para el análisis de la expresión de genes virales mediante la detección de sus ARNm. Se determinaron los niveles de expresión relativa de los genes de latencia: EBNA1, -2, -3C, LMP1 y -2A, y del ciclo lítico: BZLF1 (inmediatamente temprano), BHRF1 (temprano), BLLF1 (tardío). El análisis fue realizado en 23 de los 27 casos que presentaron células tumorales EBERs+, tanto en aquellos que fueron considerados LDGCB EBV+ ($\geq 20\%$ EBERs) como en los que no superaban el valor de corte establecido, a fin de observar si había características diferenciales en la expresión de genes virales en ambos grupos que justificaran la asignación del valor de corte determinado. Los 4 casos restantes no pudieron ser estudiados debido a la escasez de material, y todos pertenecieron al grupo pediátrico (3 casos inmunosuprimidos y 1 inmunocompetente). Los casos analizados fueron identificados como P.1-11 (pediátricos), J.1-5 (adultos jóvenes <50 años) y A.1-11 (adultos >50 años).

La Figura 8 representa los niveles de los ARNm virales determinados, donde puede observarse una gran variabilidad en los niveles de expresión de los transcritos analizados en cada caso, y la cual estuvo a su vez presente en todos los grupos etarios. La expresión de EBNA1, -2, -3C, BHRF1 y BLLF1 se observó en 17/23 (74%) de los casos, mientras que LMP1 y BZLF1 se detectaron en 16/23 casos (70%). LMP2A fue el gen que presentó menores niveles de expresión y además se detectó en un menor número de pacientes, en 11/23 (48%) casos, que correspondieron a pacientes adultos, mientras que fue nula su expresión en el grupo pediátrico. En los casos donde los niveles de expresión detectados fueron por debajo del percentil 25% de cada gen (EBNA1: 0,13; EBNA2: 0,01; EBNA3C: 0,06; LMP1: 0,03; LMP2A: 0,001, BZLF1: 0,01; BHRF1:0,006; BLLF1: 0,3), los mismos fueron considerados negativos.

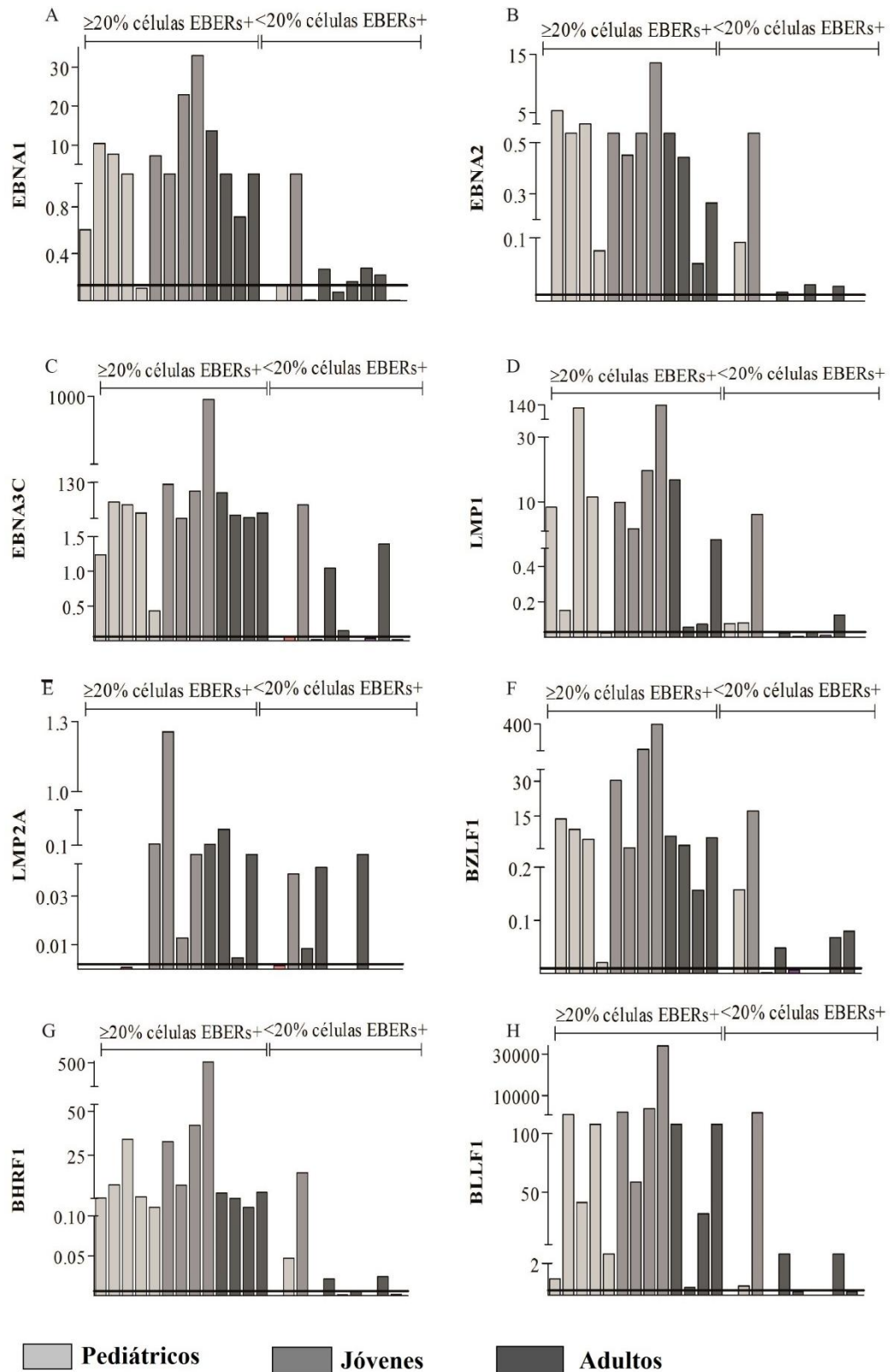


Figura 8. Expresión de ARNm viral por PCR en tiempo real. Las barras representan los niveles de transcritos determinados en las muestras de LDGCB EBERS+ de los 3 grupos etarios (pediátricos inmunocompetentes e inmunosuprimidos, jóvenes y adultos mayores de 50 años), agrupadas según el valor de corte del 20% de células EBERS+. A-E, genes de latencia. F-H, genes líticos. La expresión fue normalizada frente a HPRT y calibrada frente a la expresión en líneas celulares EBV+. La línea ubicada en el eje Y indica el valor correspondiente al percentil 25% utilizado como valor de corte.

Como se puede observar en la Figura 8, en el grupo de casos considerados como LDGCB EBV+ (más del 20% de células tumorales EBERs+) se observaron niveles de expresión significativamente mayores de todos los transcritos virales estudiados, tanto latentes (excepto para LMP2A en el grupo pediátrico) como líticos, en comparación con los casos que no superaban este valor de corte (EBNA1: $p=0,0006$; EBNA2: $p=0,005$; EBNA3C: $p=0,0007$; LMP1: $p=0,003$; LMP2A: $p=0,29$; BZLF1: $p=0,012$; BHRF1: $p=0,0006$; BLLF1: $p=0,0021$; test de Mann-Whitney). En su mayoría, los casos con células EBERs+ por debajo del 20% presentaron niveles de expresión cercanos al percentil 25% en algunos genes, y hasta nulos en otros, principalmente en los genes líticos. El subgrupo de pacientes pediátricos inmunosuprimidos también fue ensayado, y los resultados se incorporaron en el análisis debido a que no presentaron diferencias significativas en la expresión viral comparados con el grupo de pacientes inmunocompetentes ($p>0,05$; test de Mann-Whitney).

Se observó correlación significativa entre la cuantificación de transcritos virales (excepto LMP2A: $r=0,17$, $p=0,44$) y el porcentaje de células EBERs+ (EBNA1: $r=0,75$, $p<0,0001$; EBNA2: $r=0,63$, $p=0,002$; EBNA3C: $r=0,70$, $p=0,0003$; LMP1: $r=0,66$, $p=0,0009$; BZLF1: $r=0,55$, $p=0,007$; BHRF1: $r=0,76$, $p<0,0001$; BLLF1: $r=0,65$, $p=0,001$; coeficiente de correlación de Spearman), lo cual demostró que ambos parámetros están íntimamente relacionados (Figura A1, Apéndice C, sección 9.3).

Al analizar exclusivamente los casos definidos como LDGCB EBV+ de los 3 grupos etarios, la media de los niveles de expresión de los ARNm de todos los genes virales no resultó estadísticamente diferentes entre los grupos ($p>0,05$; test de Kruskal-Wallis), a excepción de LMP2A que casi no se expresó en pacientes pediátricos ($p=0,02$; test de Kruskal-Wallis). Debido a esto el análisis de la correlación entre la expresión de los diferentes genes virales se realizó sin la separación por grupo etario. Se observó una correlación directa entre todos los EBNAs ($r>0,8$; $p<0,001$; coeficiente de correlación de Spearman), así como también entre todos los genes líticos ($r>0,8$; $p<0,001$; coeficiente de correlación de Spearman). En menor medida, LMP1 también mostró correlación con los demás genes, tanto de latencia como líticos ($r=0,57 - 0,77$; $p<0,05$; coeficiente de correlación de Spearman). Por el contrario LMP2A no mostró correlación alguna con ninguno de los genes de latencia y líticos analizados ($p>0,05$; coeficiente de correlación de Spearman). Esto también puso de manifiesto la relación significativa que tiene entre sí la expresión de los diversos genes virales analizados.

5.3.2 DETECCIÓN DE ANTÍGENOS VIRALES

La determinación de las proteínas de latencia EBNA2, EBNA3A, LMP1, LMP2A y la proteína lítica temprana BMRF1 (antígenos para los cuales se poseía anticuerpos específicos para su uso en muestras fijadas e incluidas en parafina), se realizó en todos los casos que presentaron células tumorales EBERs+, de los cuales se disponía material. Esto tuvo como objetivo validar por un lado, los hallazgos observados por PCR en tiempo real y por el otro definir más acabadamente los perfiles de latencia de los grupos etarios estudiados.

La Tabla VII resume los resultados de la expresión de los antígenos virales en los casos de LDGCB EBV+. La expresión citoplasmática y de membrana de LMP1 y LMP2A (Figura 9 A y B, respectivamente) se detectó en 7/9 (78%) y 0/7 (0%) casos pediátricos, 4/4 (100%) y 1/4 (25%) casos menores de 50 años, 4/4 (100%) y 2/4 (50%) adultos mayores de 50 años, respectivamente. Todos los casos que expresaron LMP2A también presentaron marcación positiva para LMP1. Para el caso de EBNA2 (Figura 9 C), su detección en el núcleo de las células tumorales se observó en 1/5 (20%) casos pediátricos, 1/3 (33%) jóvenes y 1/4 (25%) adulto mayor. Ningún caso de los 3 grupos etarios analizados presentó inmunomarcación positiva para la proteína de latencia EBNA3A. Con respecto a la detección de la proteína lítica BMRF1 (Figura 9 D), se la encontró presente en los núcleos de células tumorales en 3/5 (60%) casos pediátricos, 3/3 (100%) adultos jóvenes y 3/4 (75%) mayores de 50 años. Dentro del grupo de pacientes pediátricos al igual que lo observado para la detección de transcritos virales, la determinación de antígenos no presentó características diferenciales vinculadas al estado inmune ($p > 0,05$; test exacto de Fisher), por lo que se los consideró como un único grupo que incluyó a los casos inmunosuprimidos e inmunocompetentes. Por último, no se observó marcación positiva para las proteínas virales LMP1, LMP2A, EBNA1, EBNA3A ni BMRF1 en los casos que presentaron menos del 20% de células EBERs+ en los 3 grupos etarios.

Tabla VII. Expresión de antígenos virales en los casos de LDGCB EBV+ según el grupo etario

Grupo etario	LMP1	LMP2A	EBNA2	EBNA3A	BMRF1
Pediátricos	7/9 (78)	0/7† (0)	1/5† (20)	0/5† (0)	3/5† (60)
Adultos <50 años	4/4 (100)	1/4 (25)	1/3† (33)	0/3† (0)	3/3† (100)
Adultos ≥50 años	4/4 (100)	2/4 (50)	1/4 (25)	0/4 (0)	3/4 (75)

Los resultados se expresan como n positivos/n totales (%).†: Cantidad de casos analizada según disponibilidad de material

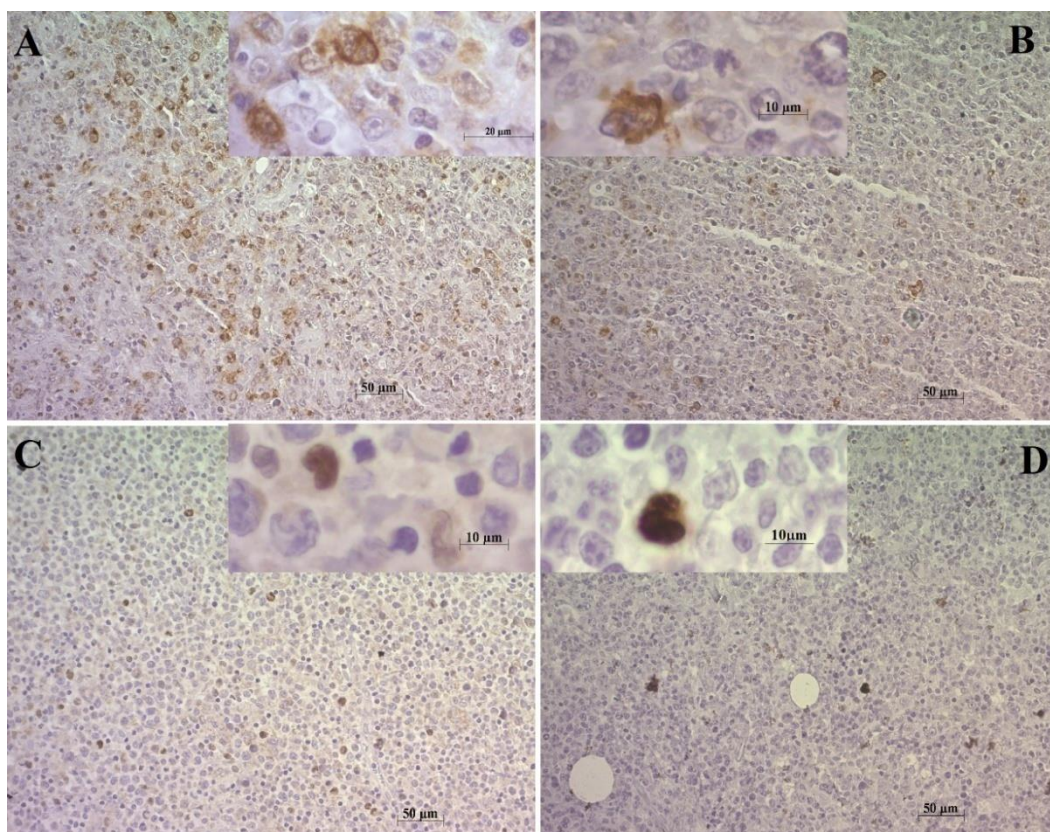


Figura 9. IHQ para la detección de antígenos virales. A) LDGCB con expresión de LMP1. B) LDGCB con expresión de LMP2A. Se observa en ambos casos la marcación citoplasmática y de membrana específica en las células tumorales. C) LDGCB con expresión de EBNA2. D) LDGCB con expresión de BMRF1. En estos dos últimos casos se observó la marcación específica restringida al núcleo de las células tumorales. En los recuadros se puede observar la marcación específica a mayor aumento.

5.3.3 DEFINICIÓN DE PERFILES DE LATENCIA VIRAL EN LOS LDGCB EBV+

En la Tabla VIII se indican los resultados de la expresión de transcritos y antígenos virales en todos los LDGCB que presentaron células EBERs+, así como también el perfil de latencia viral resultante según la metodología empleada.

Tabla VIII. Resultados de la expresión de transcritos y antígenos virales en los casos de LDGCB EBERs+. Definición de perfiles virales resultantes acorde a la metodología utilizada.

Caso	Edad (años)	Estado inmune	EBERs (%)	qPCR						Latencia/lítico			IHQ					Latencia/lítico
				EBNA1	EBNA2	EBNA3C	LMP1	LMP2A	BZLF1	BHRF1	BLLF1	(qPCR)	EBNA2	EBNA3A	LMP1	LMP2A	BMRF1	(IHQ)
P.1	2	IC	40	+	-	+	+	-	-	+	+	III/sí	-	-	-	-	-	I/no
P.2	9	IS	70	+	+	+	+	-	+	+	+	III/sí	-	-	+	-	+	II/sí
P.3	3	IC	30	+	+	+	+	-	+	+	+	III/sí	-	-	+	-	+	II/sí
P.4	7	IS	30	+	+	+	+	-	+	+	+	III/sí	+	-	+	-	+	III/sí
P.5	2	IC	50	-	+	+	-	-	+	+	+	III/sí	-	-	-	-	-	I/no
P.6	4	IS	60	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	—	ND	ND	+	ND	ND	II-III/—
P.7	3	IS	80	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	—	ND	ND	+	ND	ND	II-III/—
P.8	14	IS	70	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	—	ND	ND	+	ND	ND	II-III/—
P.9	8	IC	90	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	—	ND	ND	+	ND	ND	II-III/—
P.10	10	IC	10	-	-	-	+	-	-	-	-	II/no	-	-	-	-	-	I/no
P.11	11	IS	5	-	+	-	+	-	+	+	+	III/sí	-	-	-	-	-	I/no
J.1	35	IC	80	+	+	+	+	+	+	+	+	III/sí	ND	ND	+	-	ND	II-III/—
J.2	18	IC	90	+	+	+	+	+	+	+	+	III/sí	+	-	+	+	+	III/sí
J.3	38	IC	90	+	+	+	+	+	+	+	+	III/sí	-	-	+	-	+	II/sí
J.4	44	IC	50	+	+	+	+	+	+	+	+	III/sí	-	-	+	-	+	II/sí
J.5	41	IC	10	+	+	+	+	+	+	+	+	III/sí	ND	ND	-	-	ND	I/—
A.1	68	IC	80	+	+	+	+	+	+	+	+	III/sí	-	-	+	+	+	II/sí
A.2	76	IC	30	+	+	+	+	+	+	+	+	III/sí	-	-	+	+	-	II/no
A.3	73	IC	20	+	+	+	+	+	+	+	+	III/sí	+	-	+	+	+	II/sí
A.4	76	IC	25	+	+	+	+	+	+	+	+	III/sí	-	-	+	-	+	II/sí
A.5	69	IC	5	-	-	-	-	+	-	-	-	II/no	-	-	-	-	-	I/no
A.6	70	IC	5	+	+	+	-	+	+	+	+	III/sí	-	-	-	-	-	I/no
A.7	76	IC	10	-	-	+	-	-	-	-	-	III/no	-	-	-	-	-	I/no
A.8	65	IC	10	+	+	-	-	-	-	-	-	III/no	-	-	-	-	-	I/no
A.9	84	IC	5	+	-	-	-	+	-	-	-	II/no	-	-	-	-	-	I/no
A.10	59	IC	5	+	+	+	+	-	+	+	+	III/sí	-	-	-	-	-	I/no
A.11	75	IC	5	-	-	-	-	-	-	-	-	I/no	-	-	-	-	-	I/no

Abreviaturas: P: pediátrico; J: adulto joven <50 años; A: adulto ≥50 años. IS: inmunosuprimido; IC: inmunocompetente. ND: no determinado por escasas de material.

En este trabajo de tesis se decidió definir los perfiles de latencia y de ciclo lítico en los LDGCB EBV+ de los 3 grupos etarios en base a los resultados obtenidos por IHQ, mediante la cual se evidencia la expresión de los antígenos mencionados en la sección 5.3.2. Debido a la escasez de material incluido en parafina, no fue posible ensayar EBNA2, EBNA3A y BMRF1 en todos los casos, por ende en 4 pacientes pediátricos y en 2 adultos menores de 50 años no se pudo terminar de discriminar entre latencias II y III o la presencia de antígeno lítico por IHQ. Como se mencionó en la sección anterior, no se observó presencia de antígenos virales de latencia ni líticos en los casos que presentaron menos del 20% de células EBERs+.

La Tabla IX resume los resultados de los perfiles virales definidos en los LDGCB EBV+ agrupados de acuerdo a los 3 grupos etarios. El perfil de latencia tipo II fue el más prevalente (22-75%) de los casos, seguido del perfil de latencia III (11-25%) y de aquellos que fueron definidos como II-III (25-33%) al no poder realizarles la inmunomarcación para EBNA2 y -3A y lograr definirlos más acabadamente. Se observó que del 60% al 100% de los casos, según el grupo etario, además de expresar antígenos de latencia, presentaron expresión de un antígeno lítico. Solo el grupo pediátrico exhibió un porcentaje (33%) de casos de LDGCB EBV+ con latencia I. No hubo un perfil de latencia viral que se distribuyera significativamente con algún grupo etario en particular ($p > 0,05$; test exacto de Fisher).

Tabla IX. Perfiles de expresión de latencia y lítico viral definidos en los LDGCB EBV+ según el grupo etario

Grupo etario	Latencia I	Latencia II	Latencia III	Latencia II-III	Lítico
Pediátricos	3/9 (33)	2/9 (22)	1/9 (11)	3/9 (33)	3/5† (60)
Adultos <50 años	0/4 (0)	2/4 (50)	1/4 (25)	1/4 (25)	3/3† (100)
Adultos ≥50 años	0/4 (0)	3/4 (75)	1/4 (25)	—	3/4 (75)

Los resultados se expresan como n positivos/n totales (%).†: Cantidad de casos analizada según disponibilidad de material

5.4 CARACTERIZACIÓN DEL MICROAMBIENTE TUMORAL

5.4.1 CARACTERIZACIÓN DE POBLACIONES CELULARES

Nota: Según la disponibilidad de material, en esta parte del estudio se evaluaron 94 biopsias fijadas en formol e incluidas en parafina de pacientes con LDGCB; 21 muestras de pacientes pediátricos, 22 muestras de pacientes menores de 50 años y 51 muestras de pacientes adultos mayores de 50 años.

Dado que la inmunosenescencia se ha postulado como uno de los mecanismos implicados detrás de esta patología (Castillo 2012; Ok y col. 2013), se realizó la caracterización del microambiente tumoral en todos los LDGCB para evaluar la frecuencia y distribución de los linfocitos que lo componen, analizar si existen diferencias según el grupo etario y determinar si el EBV modula de alguna forma su composición.

En la Figura 10 se muestran las imágenes obtenidas de las inmunomarcaciones para: CD4 (A); CD8 (B); Foxp3 (C); GrB (D) y PD-1 (E), donde se observó la inmunomarcación con localización en la membrana de los linfocitos para los marcadores CD4, CD8 y PD-1, en gránulos citoplasmáticos para GrB, y nuclear para Foxp3. Dentro del microambiente tumoral, la distribución de las poblaciones linfocitarias estudiadas fue homogénea dado que no se observó un patrón de localización específico.

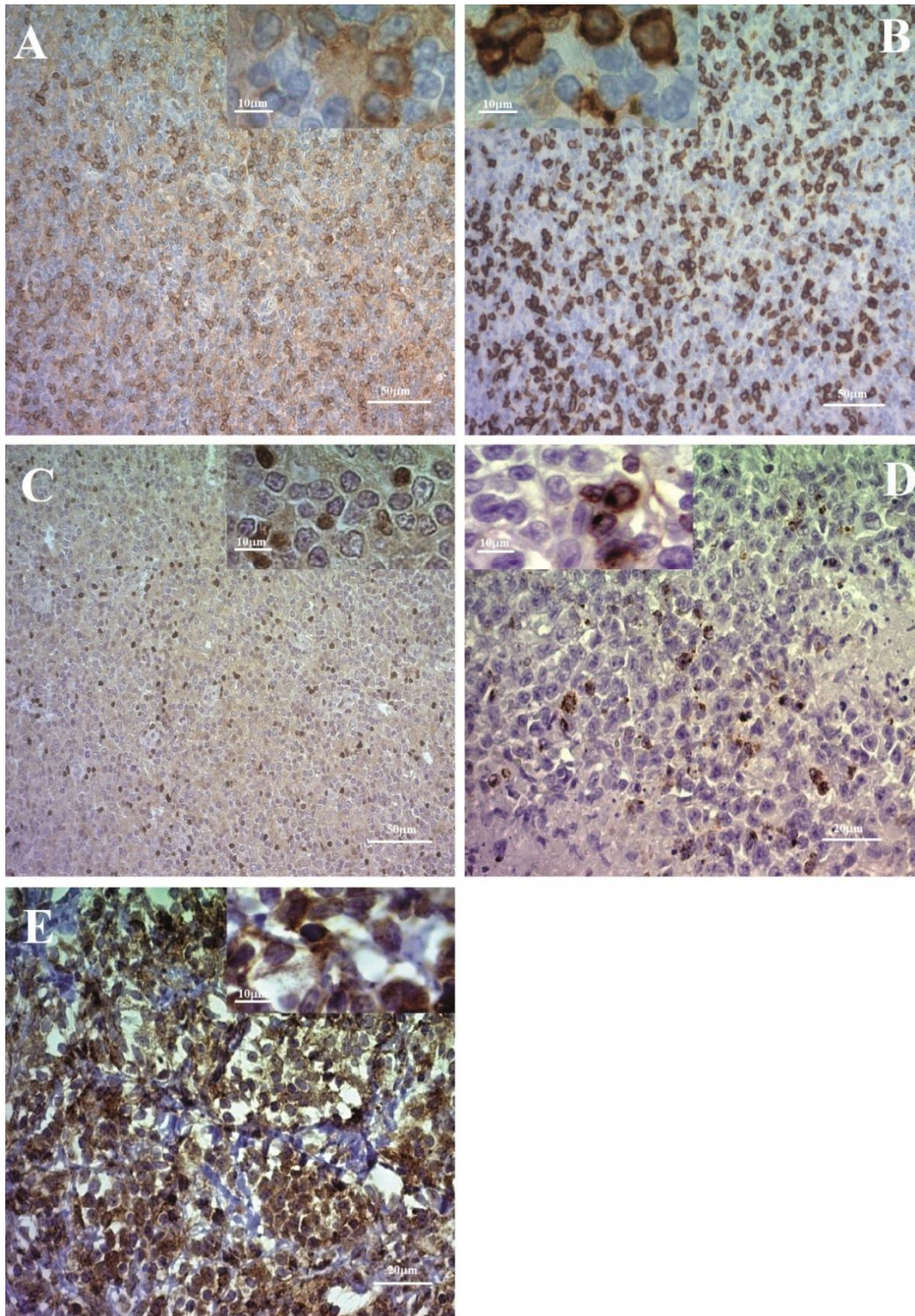


Figura 10. IHQ para la detección de poblaciones celulares del microambiente tumoral en LDGCB. A). Expresión de CD4. B) Expresión de CD8. C) Expresión de Foxp3. D) Expresión de GrB. E) Expresión de PD-1. Se observó en los casos ensayados para CD4, CD8 y PD-1 la marcación específica de membrana. En el caso de GrB se observó la marcación de los gránulos citoplasmáticos. Respecto de la marcación de Foxp3 esta se observó específicamente restringida al núcleo de las células. En los recuadros se puede observar la marcación específica a mayor aumento.

5.4.1.1 ANÁLISIS DE LAS POBLACIONES CELULARES EN RELACIÓN CON EL GRUPO ETARIO

La Tabla X muestra la cuantificación de las poblaciones celulares, analizadas para este trabajo de tesis, que conforman el microambiente tumoral en pacientes pediátricos y adultos con LDGCB. En todos los grupos etarios y para cada uno de los marcadores estudiados se observa una gran variabilidad en los recuentos celulares entre individuos dentro de un mismo grupo.

Tabla X. Recuento de las poblaciones celulares del microambiente en relación a la edad en los LDGCB

Grupo etario	CD4	CD8#	Foxp3*	GrB	PD-1**
Pediátricos	0,066 (0,022-0,14)	0,11 (0,002- 0,23)	0,01 (0,0- 0,29)	0,022 (0,0- 0,26)	0,074 (0,036-0,29)
Adultos <50 años	0,053 (0,0- 0,18)	0,043 (0,0- 0,51)	0,023 (0,0-0,17)	0,057 (0,013-0,23)	0,12 (0,0-0,37)
Adultos ≥50 años	0,071 (0,0- 0,29)	0,048 (0,0- 0,25)	0,030 (0,0- 0,23)	0,059 (0,017- 0,28)	0,15 (0,021-0,53)

Los resultados se expresan como mediana (mín-máx). *p<0,05, ** p<0,01, #tendencia p=0,053; test de Kruskal-Wallis.

En la Figura 11 se encuentran representados los recuentos de las poblaciones celulares en función del grupo etario. Se observaron diferencias significativas en las medias de la cuantificación de LT Foxp3+ y LT PD-1+ entre los grupos de pacientes pediátricos y adultos mayores de 50 años, siendo siempre mayor el recuento en estos últimos (p=0,016 y p=0,013, respectivamente; test de Kruskal-Wallis). Por el contrario, la población de LT CD8+ mostró una tendencia (p=0,053; test de Kruskal-Wallis) a estar más aumentada en la población pediátrica. Las correlaciones encontradas entre los recuentos de estas poblaciones y la edad fueron débiles aunque significativas (CD8: r= -0,28, p=0,009; Foxp3: r=0,29, p=0,005 y PD-1: r=0,26, p=0,02; coeficiente de correlación de Spearman). Por el contrario, no se encontraron diferencias en las medias correspondientes a la cuantificación de las poblaciones CD4+ ni GrB+ analizadas en relación al grupo etario (p>0,05; test de Kruskal-Wallis) ni se halló correlación entre estas poblaciones del microambiente y la edad de los casos (p>0,05; coeficiente de correlación de Spearman). Las correlaciones mencionadas se encuentran graficadas en la Figura A2, Apéndice D, sección 9.4.

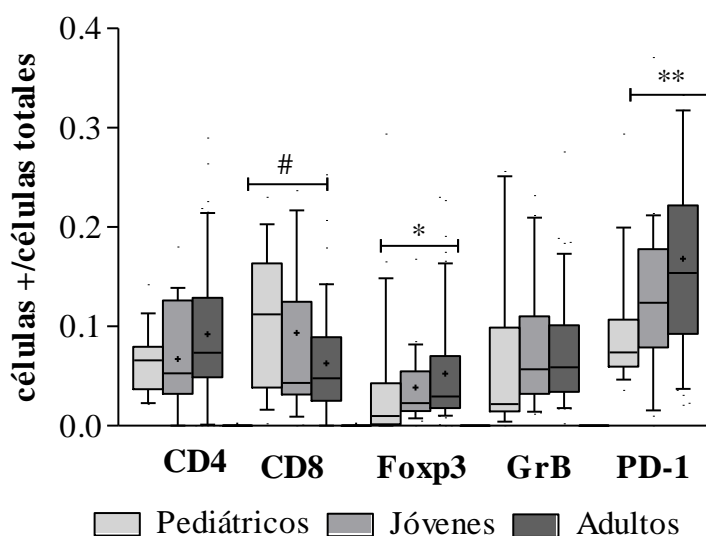


Figura 11. Cuantificación de células CD4, CD8, Foxp3, GrB y PD-1 positivas en pacientes pediátricos, adultos menores y mayores de 50 años con LDGCB. Los resultados se representan en diagramas de cajas. La línea horizontal dentro de cada caja indica la mediana. Las líneas horizontales por fuera de las cajas representan los percentiles 5 y 95. La media se indica como +. Cuantificación: linfocitos positivos para cada marcador/células totales (1000x). * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, # tendencia $p = 0,053$; test de Kruskal-Wallis.

Para descartar que las diferencias observadas entre los grupos etarios fueran el reflejo de un recuento total de células propio de cada rango de edad, se realizó la comparación del número de células totales del microambiente en cada corte estudiado. En este análisis no se encontraron diferencias significativas entre los grupos etarios ($p > 0,05$; test de Kruskal-Wallis), lo cual confirma que los resultados observados no son consecuencia de un error en el recuento celular (Figura A3, Apéndice E, sección 9.5).

Recientemente se ha comenzado a proponer la hipótesis de que las relaciones entre distintas subpoblaciones celulares son mejores indicadores de las interacciones inmunobiológicas del microambiente que el número de células infiltradas (Gooden y col. 2011; Shah y col. 2011). Es por ello que determinamos para cada paciente las relaciones entre CD8/CD4 (citotóxico/*helper*), CD8/Foxp3 (citotóxico/regulatorio), CD4/Foxp3 (*helper*/regulatorio), CD8/GrB (citotóxico/efector) y GrB/PD-1 (efector/inhibitorio). Cuando la relación es cercana a 1, es indicativo que ambas poblaciones se encuentran en equilibrio, mientras que a medida que el valor se hace menor o mayor de 1 esto indicaría cual es la población que predomina sobre la otra.

Tabla XI. Relaciones entre las subpoblaciones celulares del microambiente y comparación según el grupo etario en los casos de LDGCB

Grupo etario	CD8/CD4*	CD8/Foxp3	CD4/Foxp3	CD8/GrB	GrB/PD-1
Pediátricos	1,8 (0,02-7,6)	4,3 (0,61-91)	3,7 (0,35-86)	2,3 (0,11-13)	0,35 (0,09-3)
Adultos <50 años	0,87 (0,31-4,5)	2,5 (0,04-8,1)	2,4 (0,71-9,3)	0,94 (0,02-20)	0,38 (0,15-1,8)
Adultos ≥50 años	0,69 (0,01-11)	2 (0,01-26)	2,4 (0,43-58)	1 (0,01-27)	0,44 (0,03-4,6)

Los resultados se expresan como mediana (mín-máx). * $p < 0,05$; test de Kruskal-Wallis

Tal como se observa en la Tabla XI en base a las medianas de las relaciones antes mencionadas se podría inferir que, en pacientes pediátricos hay mayor presencia de LTc (CD8+) respecto de LTh (CD4+), mientras que en adultos mayores de 50 años se da la situación inversa ($p=0,02$; test de Kruskal-Wallis). En todos los grupos etarios la población de LTreg (Foxp3+) conformaría una pequeña proporción de las poblaciones tanto CD4+ como CD8+, sin diferencias significativas entre los mismos ($p > 0,05$; test de Kruskal-Wallis). En los pacientes adultos, mayores y menores de 50 años, la población de LTc estaría activada (GrB+), en base a la relación cercana a 1 de CD8/GrB, mientras que en los pediátricos la población GrB+ podría no estar conformada exclusivamente por CD8+, no obstante esta comparación no alcanzó significancia estadística ($p > 0,05$; test de Kruskal-Wallis). Finalmente, se observaría un predominio de la población inhibitoria (PD-1+) frente a la efectora (GrB+) en los 3 grupos etarios, dada por las relaciones menores a 1 en todos los casos, sin diferencias entre ellos ($p > 0,05$; test de Kruskal-Wallis).

5.4.1.2 ANÁLISIS DE LAS POBLACIONES CELULARES EN RELACIÓN CON LA PRESENCIA DE EBV

Con el fin de evaluar la influencia que tiene la presencia del EBV y su potencial efecto sobre las diferentes poblaciones celulares que conforman el microambiente tumoral, se decidió proseguir con el análisis reuniendo los resultados en un solo grupo y sin distinción por edad para lograr así tener mayor potencia estadística. Estos resultados se encuentran graficados en la Figura 12 y resumidos en la Tabla XII.

Tabla XII. Recuento de las poblaciones celulares del microambiente de los LDGCB en relación a la presencia de EBV

	CD4	CD8	Foxp3	GrB***	PD-1
LDGCB EBV+	0,062 (0,013-0,165)	0,12 (0,0-0,24)	0,018 (0,0-0,29)	0,15 (0,022-0,28)	0,13 (0,065-0,29)
LDGCB EBV-	0,068 (0,0-0,29)	0,049 (0,0-0,51)	0,024 (0,0-0,23)	0,041 (0,0-0,26)	0,12 (0,0-0,53)

Los resultados se expresan como mediana (mín-máx). ***: $p < 0,001$; test de Mann-Whitney.

Se observó que el recuento de células GrB+ (LT/NK) fue estadísticamente mayor en los casos de LDGCB EBV+ que en los EBV- ($p=0,0007$; test de Mann-Whitney), mientras que el resto de las poblaciones linfocitarias analizadas: LT CD4+, LT CD8+, LT Foxp3+ y LT PD-1+, no evidenciaron diferencias significativas en su cuantificación en relación a la presencia del virus. No obstante, en el caso particular de los LT CD8+ se observó una tendencia a un mayor recuento en los casos EBV+ ($p=0,09$; test de Mann-Whitney).

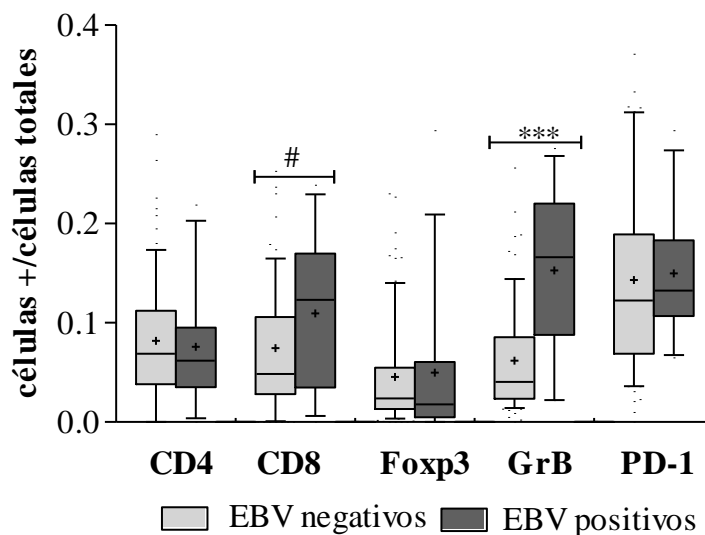


Figura 12. Cuantificación de células CD4, CD8, Foxp3, GrB y PD-1 positivas en pacientes con LDGCB EBV+ y EBV-. Los resultados se representan en diagramas de cajas. La línea horizontal dentro de cada caja indica la mediana. Las líneas horizontales por fuera de las cajas representan los percentiles 5 y 95. La media se indica como +. Cuantificación: linfocitos positivos para cada marcador/células totales (1000x). ***: $p < 0,001$. #: tendencia $p=0,09$; test de Mann-Whitney

Cuando se analizó el recuento de las poblaciones celulares en relación con el virus diferenciando en cada grupo etario en particular, se confirmaron los resultados, reforzando las conclusiones obtenidas en el total de casos (Figura A4, Apéndice F, sección 9.6).

A continuación, se determinó nuevamente para cada paciente en todos los grupos las relaciones entre CD8/CD4, CD8/Foxp3, CD4/Foxp3, CD8/GrB y GrB/PD-1, y se analizaron comparativamente los resultados según la presencia de EBV (Tabla XIII).

Tabla XIII. Relaciones entre las subpoblaciones celulares del microambiente de los LDGCB en relación con la presencia de EBV

	CD8/CD4*	CD8/Foxp3	CD4/Foxp3	CD8/GrB#	GrB/PD-1*
LDGCB EBV+	1,5 (0,42-11)	3 (0,63-10)	2,7 (0,71-7,8)	0,82 (0,15-3,7)	1,1 (0,17-2,3)
LDGCB EBV-	0,81 (0,01-7,6)	2,1 (0,01-91)	2,4 (0,35-86)	1,1 (0,01-27)	0,37 (0,03-4,6)

Los resultados se expresan como mediana (mín-máx).*: $p < 0,05$, #: tendencia $p = 0,07$; test de Mann-Whitney.

En este caso podemos observar que la presencia del virus estaría relacionada con una mayor cantidad de LTc respecto a los LTh debido a que el grupo de LDGCB EBV+ presentó una relación $CD8/CD4 > 1$, en contraposición al grupo EBV- ($p = 0,04$; test de Mann-Whitney). Por otra parte, se manifiesta una tendencia en los casos EBV+ hacia un fenotipo efector ($GrB/PD-1 > 1$), posiblemente por el aporte de otra población que exprese este marcador ($CD8/GrB < 1$). Por el contrario, en los casos EBV- no toda la población CD8+ estaría activada ($CD8/GrB > 1$). A pesar de esto, las diferencias no alcanzaron significancia estadística ($p = 0,07$; test de Mann-Whitney). Tal como se comprobó en el análisis de los grupos etarios, con respecto a la presencia del virus la población de LTreg también sería una pequeña proporción de las células CD4+ y CD8+, sin diferencias significativas entre los casos EBV+ y EBV- ($p > 0,05$; test de Mann-Whitney). De acuerdo a estas observaciones, fue razonable entonces encontrar que los casos de LDGCB EBV- presenten un fenotipo predominantemente inhibitorio frente al efector ($GrB/PD-1 < 1$), mientras que bajo la acción del EBV la relación se encuentra ligeramente invertida ($GrB/PD-1 > 1$), siendo estadísticamente diferente la situación en ambos grupos ($p = 0,02$; test de Mann-Whitney).

Con respecto a cuáles serían los genes virales que podrían estar involucrados en la modulación del microambiente tumoral, se observó una correlación inversa y significativa entre todos los transcritos (excepto LMP2A), tanto de latencia como líticos, y los recuentos de LT CD4+ ($r = -0,40$ a $-0,60$, $p < 0,05$; coeficiente de correlación de Spearman). Por otro lado, tanto el gen de latencia EBNA2 como los genes líticos BZLF1 y BLLF1 evidenciaron una correlación directa con el recuento de células GrB+ ($r = 0,44$ a $0,54$, $p < 0,05$; coeficiente de correlación de Spearman). Por su parte, LMP1 mostró una correlación inversa con el recuento de LT Foxp3+ ($r = -0,49$, $p = 0,02$; coeficiente de correlación de Spearman). Estos resultados avalarían los hallazgos descritos, fundamentalmente para la población de células GrB+, donde el EBV estaría favoreciendo el predominio de un microambiente de células citotóxicas activadas. En la Tabla A2.1 (Apéndice G, sección 9.7) se presentan los valores de este análisis de correlación agrupando todos los casos, mientras que en la Tabla A2.2 (Apéndice G, sección 9.7) se encuentra el análisis comparativo de los casos EBV+ y EBV- separados por edades, donde se advierte que se pierden la mayoría de las correlaciones observadas, excepto en los mayores de 50 años donde se continua viendo correlación directa entre la expresión de genes líticos y los recuentos de células GrB+ ($r = 0,64$ a $0,76$, $p < 0,05$; coeficiente de correlación de Spearman).

5.4.2 DETERMINACIÓN DE TRANSCRIPTOS DE CITOQUINAS Y QUIMIOQUINAS

Nota: Acorde a la disponibilidad de material, en esta parte del estudio se evaluaron 50 biopsias fijadas en formol e incluidas en parafina de pacientes con LDGCB; 14 muestras de pacientes pediátricos, 13 muestras de pacientes menores de 50 años y 23 muestras de pacientes adultos mayores de 50 años.

Como se comentó previamente, la modulación del microambiente podría diferir no solo en el reclutamiento de células sino también en su funcionalidad, lo cual podría conducir a las diferencias de presentación clínica y evolución observadas en patologías tumorales (Alvaro y col. 2008; Zhang y col. 2010; Hadrup y col. 2013). Dicha modulación podría ser consecuencia tanto de una infección crónica como de la edad del paciente. A su vez, la presencia de antígenos de EBV específicos puede inducir la expresión de citoquinas y quimioquinas determinadas (Hirahara y col. 2006; Kis y col. 2006; Baumforth y col. 2008). Es por ello que, en los LDGCB tanto EBV+ como EBV-, se realizó la cuantificación de los transcritos de algunas citoquinas pro- ($\text{IFN}\gamma$) y anti-

inflamatorias (IL-10 y TGF β), así como de una quimioquina (CCL20) responsable de la atracción de diversas poblaciones de LT.

5.4.2.1 ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE TRANSCRIPTOS DE CITOQUINAS Y QUIMIOQUINAS EN RELACIÓN CON EL GRUPO ETARIO

Respecto al análisis de la expresión de transcritos de IL-10, TGF β , IFN γ y CCL20, en la Tabla XIV figura la mediana de su cuantificación por PCR en tiempo real en pacientes pediátricos y adultos con LDGCB. Al igual que con las poblaciones celulares, en todos los grupos etarios se advierte una gran variabilidad en la expresión relativa de transcritos para cada muestra, aunque las medianas de expresión observadas fueron 0 o cercanas a dicho valor en todos los grupos.

Tabla XIV. Expresión de transcritos de citoquinas y quimioquinas en los LDGCB en relación al grupo etario

Grupo etario	IL-10	TGF β	IFN γ	CCL20
Pediátricos	0,004 (0,0-11)	0,02 (0,0- 0,37)	0 (0,0- 0,2)	0 (0,0- 0,03)
Adultos <50 años	0 (0,0- 129)	0,01 (0,0- 1,2)	3,8E ⁻⁶ (0,0-2,3)	0 (0,0-0,26)
Adultos \geq50 años	0 (0,0- 5,6)	0,004 (0,0- 0,72)	0 (0,0- 0,02)	0 (0,0- 0,52)

Los resultados se expresan como mediana (mín-máx).

Como se representa en la Figura 13, los 3 grupos etarios presentaron una expresión comparable de ambas citoquinas anti-inflamatorias IL-10 y TGF β , mientras que la expresión de la citoquina pro-inflamatoria IFN γ y la quimioquina CCL20 resultaron ser comparativamente menores.

Contrariamente a lo hallado en la cuantificación de las poblaciones celulares, no se encontró expresión significativamente diferente de ninguna citoquina o quimioquina en ningún grupo etario particular ($p > 0,05$; test de Kruskal-Wallis). Más aún, no se obtuvo correlación de ninguna de las citoquinas con la edad de los casos ($p > 0,05$; coeficiente de correlación de Spearman), lo cual refuerza este hallazgo (Figura A5, Apéndice H, sección 9.8).

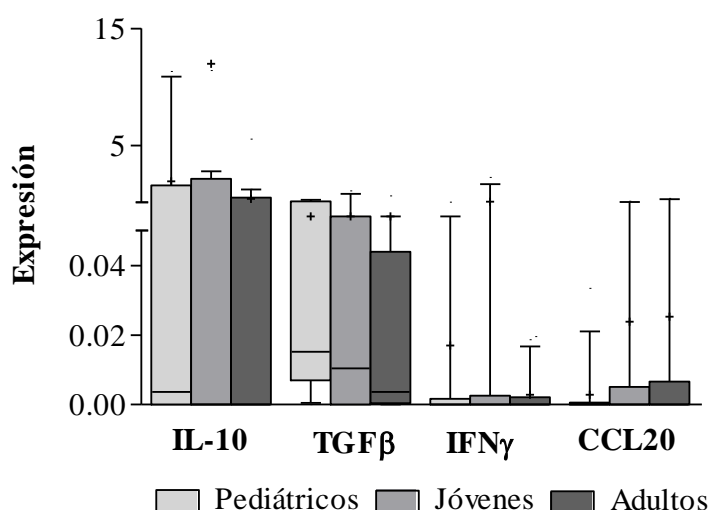


Figura 13. Cuantificación relativa de transcritos de IL-10, TGFβ, IFNγ y CCL20 en pacientes pediátricos, adultos menores y mayores de 50 años con LDGCB. Los resultados se representan en diagramas de cajas. La línea horizontal dentro de cada caja indica la mediana. Las líneas horizontales por fuera de las cajas representan los percentiles 5 y 95. La media se indica como +. La expresión fue normalizada frente a HPRT y calibrada frente a la expresión determinada de cada una de las citoquinas y quimioquinas en CMSP estimuladas 4hs con ionomicina-PMA.

5.4.2.2 ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE TRANSCRIPTOS DE CITOQUINAS Y QUIMIOQUINAS EN RELACIÓN CON LA PRESENCIA DE EBV

Con respecto a la influencia que pueda tener la presencia de EBV sobre la expresión de estos mediadores inmunes dentro del microambiente, se realizó el análisis en la totalidad de los casos, sin distinción por edad, tal como se procedió para las poblaciones celulares. A continuación, la Tabla XV resume los resultados obtenidos.

Tabla XV. Expresión de transcritos de citoquinas y quimioquinas en los LDGCB en relación a la presencia de EBV

	IL-10	TGFβ	IFNγ	CCL20
LDGCB EBV+	0,004 (0,0-129)	0,01 (0,0-1,2)	0 (0,0-2,3)	0 (0,0-0,26)
LDGCB EBV-	0 (0,0-11)	0,01 (0,0-0,72)	0 (0,0-0,32)	0 (0,0-0,52)

Los resultados se expresan como mediana (mín-máx).

En cuanto a los niveles de expresión relacionados con el virus (Figura 14), las medianas establecidas resultaron muy bajas; sin embargo, en los casos de LDGCB

EBV+, los niveles de transcritos para IL-10 y TGF β se encontraban más elevados que los de IFN γ y CCL20, mientras que en los casos EBV- solo TGF β mantuvo esa particularidad. Sin embargo, no se observaron diferencias significativas entre los casos EBV+ y EBV- para la expresión relativa de ninguno de los genes estudiados ($p > 0,05$; test de Mann-Whitney). Este hecho también se corroboró en el análisis dentro de cada grupo etario por separado (Figura A6, Apéndice I, sección 9.9).

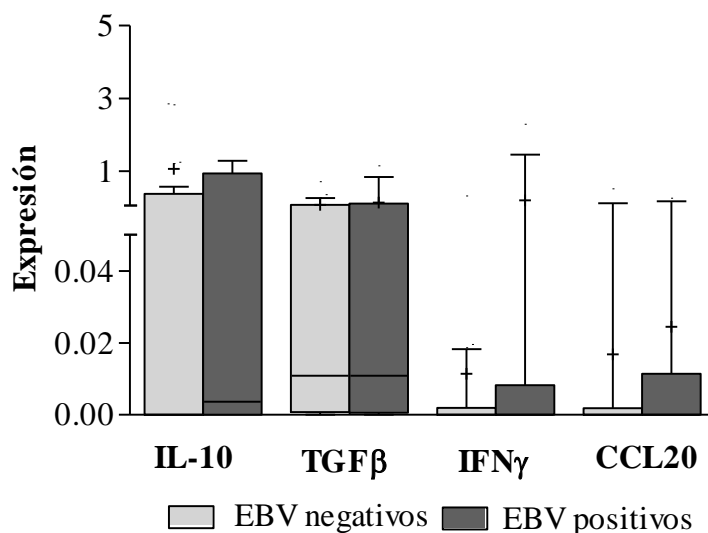


Figura 14. Cuantificación relativa de transcritos de IL-10, TGF β , IFN γ y CCL20 en pacientes con LDGCBEBV+ y EBV-. Los resultados se representan en diagramas de cajas. La línea horizontal dentro de cada caja indica la mediana. Las líneas horizontales por fuera de las cajas representan los percentiles 5 y 95. La media se indica como +. La expresión fue normalizada frente a HPRT y calibrada frente a la expresión determinada de cada una de las citoquinas y quimioquinas en CMSP estimuladas 4hs con ionomicina-PMA.

La Tabla A3.1 (Apéndice J, sección 9.10) comprende el análisis de correlación entre la expresión de genes virales, tanto líticos como latentes, y la expresión de los genes de citoquinas y quimioquinas celulares. La ausencia de correlación entre estos parámetros confirmó que el virus no ejerce efecto alguno en la expresión de los genes inmunes estudiados, analizados en conjunto sin distinguir por grupo etario ($p > 0,05$; coeficiente de correlación de Spearman). No obstante, al efectuar el mismo análisis de correlación pero dentro de cada grupo etario individual (Tabla A3.2, Apéndice J, sección 9.10), se encontró exclusivamente en los adultos menores de 50 años que todos los genes líticos y así como también el transcrito de latencia LMP1 presentaron una intensa correlación inversa con IFN γ y CCL20 ($r = -0,98$, $p = 0,02$; coeficiente de

correlación de Spearman), lo que implicaría que en este grupo en particular la expresión del virus (mayormente de sus genes líticos) estaría en oposición a la actividad pro-inflamatoria de IFN γ y la quimiotaxis que podría ocurrir por acción de CCL20. Por otro lado, en el grupo de pacientes pediátricos, se halló correlación inversa de los genes de latencia EBNA1 con IL-10 ($r = -0,77$, $p = 0,04$; coeficiente de correlación de Spearman) y LMP1 con IL-10 y CCL20 ($r = -0,77$, $p = 0,04$ y $-0,80$, $p = 0,03$; respectivamente; coeficiente de correlación de Spearman), por lo que se podría estar desfavoreciendo, al contrario de lo que sucede en los adultos jóvenes, la actividad anti-inflamatoria de IL-10 y la acción de CCL20. Finalmente, en el grupo de casos mayores de 50 años no se encontró correlación alguna entre la expresión viral y las citoquinas estudiadas ($p > 0,05$, test de correlación de Spearman), por lo que en esta población en particular el EBV no estaría ejerciendo un efecto sobre la actividad del microambiente.

5.5 ANÁLISIS DE SOBREVIDA

En base a los datos clínicos disponibles en cada centro de salud, de los 102 casos estudiados se logró recopilar la información de 59 pacientes: 22 pediátricos, 7 jóvenes y 30 adultos mayores de 50 años. El periodo de seguimiento del conjunto de casos presentó una mediana de 19 meses (rango: 1 a 157 meses).

En el caso de los pacientes pediátricos, los mismos fueron tratados con los protocolos 9-LNHP-94- GATLA y 1-LNHP-2000 GATLA, acorde al consenso del GATLA (Grupo Argentino de Tratamiento de Leucemia Aguda). Este tratamiento, que también se utiliza para el LB, consiste en un complejo esquema de bloques e incluye los mismos componentes del CHOP sumado a otros fármacos. El período de seguimiento fue de 1 a 157 meses (mediana: 36 meses). Por otro lado, los pacientes adultos (mayores y menores de 50 años) fueron tratados de acuerdo a NCCN y SWOG (Grupo Oncológico del Sudoeste Americano), en su mayoría mediante la quimioterapia o inmunquimioterapia, siendo el R-CHOP 21 (Rituximab + CHOP en ciclos cada 21 días) el patrón de oro en primera línea. El periodo de seguimiento de estos casos fue de 1 a 60 meses (mediana: 18 meses).

Se determinó, mediante el análisis de Kaplan-Meier, que la mediana de supervivencia de la totalidad de casos fue del 26 meses, en tanto que la supervivencia libre de eventos (SLE) a 2 años resultó del 50%, y para cada grupo etario fue 54% en pediátricos, 34% en los menores de 50 años y 51% en adultos mayores de 50 años

(Figura 15). Sin embargo, al comparar los 3 grupos etarios entre sí, no se hallaron diferencias significativas entre las curvas de sobrevida en relación con la edad ($p > 0,05$; test log-rank).

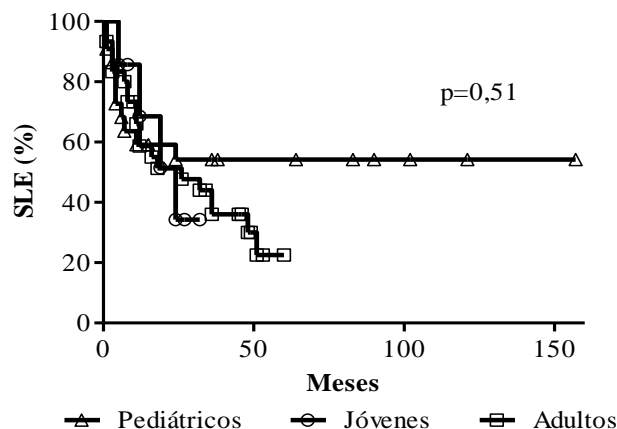


Figura 15. Curvas de Kaplan-Meier de la sobrevida esperada para todos los LDGCB clasificados de acuerdo con la edad.

Dada la falta de diferencias en las curvas de sobrevida con respecto a la edad así como también respecto a las características tanto virales como a nivel de microambiente que se observaron en el LDGCB EBV+, se continuó el análisis de sobrevida en el grupo total de casos. El análisis realizado en el grupo conformado por pacientes pediátricos, jóvenes y adultos mayores de 50 años (Figura 16) mostró una menor SLE a los 2 años en los pacientes EBV+ (17%), frente a lo observado en casos EBV- (60%) ($p=0,004$; test log rank). La mediana en la sobrevida de los casos EBV+ fue de 6 meses *versus* 36 meses en los EBV-.

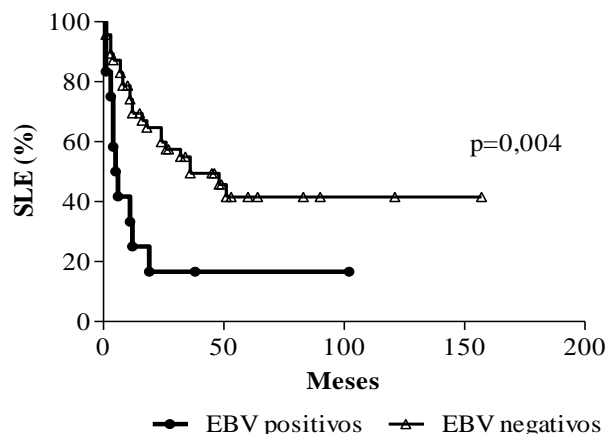


Figura 16. Curvas de Kaplan-Meier de la sobrevida esperada para todos los LDGCB clasificados de acuerdo con la presencia de EBV.

Dada la condición particular de los pacientes pediátricos inmunosuprimidos, y con el objetivo de discriminar la influencia de este estado inmune en la SLE de los pacientes, excluimos del análisis a esta subpoblación (Figura 17). Al separar este grupo particular, se observó que el análisis pierde la significancia estadística ($p=0,11$; test log rank). La mediana de sobrevida de los casos EBV+ fue de 12 meses versus 36 meses en los EBV-. Sin embargo cabe mencionar que la SLE a 2 años del grupo de LDGCB EBV+ fue de 25% frente a 60% en los casos que no presentan el virus, mostrando una tendencia a una menor SLE en los casos inmunocompetentes dada por la presencia del EBV.

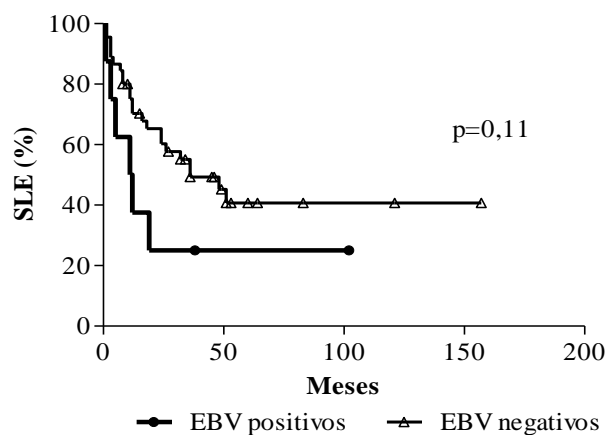


Figura 18. Curvas de Kaplan-Meier de la sobrevida esperada para todos los LDGCB clasificados de acuerdo con la presencia de EBV, donde se excluyen los casos de pacientes pediátricos inmunosuprimidos.



DISCUSIÓN

6 DISCUSIÓN

El rol patogénico de EBV en los LNH está todavía en discusión, a pesar que ha sido ampliamente demostrado que EBV es capaz de estimular la proliferación celular y actuar como un carcinógeno potencial (Thorley-Lawson y col. 2004). En el caso particular del LDGCB, si bien hay varios estudios que intentan determinar si el EBV cumple un rol en su linfomagénesis, el grado de participación del virus en la patogenia aún debe ser confirmada. En la clasificación de neoplasias linfoides de la OMS del 2008, el LDGCB EBV+ del adulto mayor fue definido como una nueva entidad provisoria dentro de los LDGCB. Esta patología maligna de linfocitos B infectados con EBV se presenta en pacientes mayores de 50 años sin ningún tipo de inmunodeficiencia diagnosticada, ni antecedente de otro proceso linfoproliferativo (Swerdlow y col. 2008). La mayor prevalencia de esta patología hasta el momento se observa en algunos países de Asia, México y Perú donde varía entre 8-15%. Sumado a esto, la proporción de casos aumenta con la edad, para aproximarse al 30% en mayores de 90 años (Oyama y col. 2007). Por otro lado, la mayor parte de estos estudios no contemplan la incorporación de pacientes menores de 50 años ni tampoco niños. En varios trabajos se observó que esta entidad presenta una menor sobrevida y menor respuesta al tratamiento comparado con los pacientes que no están infectados (Park y col. 2007; Uner y col. 2011). A esto se suma el aumento de expectativa de vida a nivel mundial. Es por ello que tanto el LDGCB EBV+ del adulto mayor, como su contraparte en pacientes de menor edad, cuya prevalencia no se conoce en profundidad, podrían constituir un problema de salud pública a mediano plazo.

En el presente trabajo de tesis se caracterizó una serie de 102 pacientes con diagnóstico de LDGCB a fin de determinar la presencia de EBV en diferentes grupos etarios, el perfil de latencia y algunas características del microambiente potencialmente asociadas al virus, para contribuir de esta forma al conocimiento de la patogenia del LDGCB EBV+. Los pacientes pertenecían a 3 grupos etarios provenientes de dos centros de salud de Buenos Aires (HNRG y ANM). Dada la baja incidencia que presenta el LDGCB en pediatría, incluimos 26 casos pediátricos de forma retrospectiva y prospectiva abarcando un lapso de 26 años. Por otro lado, reclutamos 24 casos de adultos jóvenes y 52 adultos mayores de 50 años en un lapso de 5 años. En Argentina cada año se diagnostican en adultos cerca de 4.800 casos de linfomas y el 50%

aproximadamente son LNH. De estos últimos, el 90% ocurre luego de los 35 años de edad (GLOBOCAN 2012 *database*: <http://www-dep.airc.fr/>). Sin embargo, no existe en nuestro país un registro detallado de la incidencia del LDGCB en adultos ni en niños. La probabilidad de padecer este tipo de linfoma se incrementa con la edad. A nivel mundial, su incidencia aumenta desde 0,3/100.000/año (entre los 35–39 años) a 26,6/100.000/año (entre los 80–84 años), por consiguiente más de la mitad de los pacientes con LDGCB tiene más de 65 años (GLOBOCAN 2012 *database*: <http://www-dep.airc.fr/>) (Gutierrez y col. 2011). Estos hechos nos ayudarían a entender el motivo por el cual se observa la diferencia en el tamaño de muestra recolectado para cada grupo etario.

Se ensayó en todos los casos la técnica de HIS para EBERs, que es la metodología de referencia para determinar presencia de EBV en linfomas, y se utiliza de rutina en nuestro laboratorio. En base a la marcación positiva en el núcleo de las células tumorales, determinamos que 11 de los pacientes pediátricos, 5 de los adultos menores de 50 años y 11 de los adultos mayores, en total 27 casos, presentaron células tumorales EBERs+, con una gran variabilidad en el porcentaje (5-90%) de estas células con marcación específica.

En los estudios realizados para determinar la presencia de EBV en LDGCB, se observó que el porcentaje de células tumorales EBERs+ puede variar desde el 10% al 100% dependiendo del caso en particular (Castillo 2012), y en cada uno de ellos se eligió un valor de corte determinado para definir posteriormente la prevalencia del LDGCB EBV+. En la Tabla XVI se puede ver la heterogeneidad de los valores utilizados. Sin embargo, actualmente en la literatura aún no se ha establecido un consenso definitivo acerca del porcentaje de células EBERs+ que define un caso como EBV+. Por otra parte, en todos estos estudios un determinado número de casos se definió como LDGCB no asociado a EBV porque no cumplían con el valor de corte establecido para ese estudio en particular. Es más, en los diversos análisis con frecuencia no había un valor de corte claramente establecido. Por ejemplo, Hoeller y col. informaron que 2 de sus casos definidos como LDGCB EBV+ mostraban menos del 20% de positividad en las células (Hoeller y col. 2010). Por su parte, se describió recientemente en un estudio taiwanés un 7% de los casos con un porcentaje de células EBER+ por debajo del valor de corte establecido en su análisis (Chang y col. 2014). Más aún, Hofscheier y col. excluyeron de su serie el 5% de los casos de LDGCB

provenientes de una población de México, porque presentaba una positividad para EBERs en menos del 20% de las células malignas.

Tabla XVI. Recopilación de estudios donde se indica la frecuencia de EBV en LDGCB acorde al valor de corte de EBERs utilizado y el rango etario analizado. Determinación del perfil de expresión viral (en caso de tener el dato disponible)

Autor	País	Valor de corte EBERs (%)	EBV+ n/total (%)	≥50 años n/total (%)	<50 años n/total (%)	Pediátricos n/total (%)	Perfil de expresión viral (antígenos)
Kuze y col.	Japón	100	13/114 (11)	NE	NE	ND	II y III (LMP1 y EBNA2)
Oyama y col.	Japón	50	155/1748 (9)	147/1394 (11)	8/282 (3)	1/44 (3)	II y III (LMP1 y EBNA2)
Park y col.	Corea	20	34/380 (9)	20/139 (14)	14/241 (6)	ND	ND
Gibson y col.	USA	80	5/95 (5)	5/95 (5)	ND	ND	ND
Morales y col.	Perú	NE	11/74 (15)	10/54 (19)	1/20 (5)	ND	ND
Hoeller y col.	Suiza, Italia y Austria	10	10/258 (4)	8/188 (4)	2/48 (4)	ND	II y III (LMP1 y EBNA2)
Beltran y col.	Perú	10	20/137 (15)	17/137‡ (12)	3/137‡ (2)	ND	II/III (LMP1)
Hofscheier y col.	Alemania (A) México (M)	100	A:4/169 (2) M: 9/136 (7)	A:4/169 (2) M: 9/136 (7)	ND	ND	II y III (LMP1 y EBNA2)
Tumwine y col.	Uganda	NE	8/19 (44)	ND	ND	8/19 (44)	ND
Wada y col.	Japón	20	16/484 (3)	14/234 (6)	2/48 (4)	ND	II/III (LMP1)
Uner y col.	Turquía	NE	14/257 (5)	12/178 (7)	1/79 (1)	ND	NE
Montes-Moreno y col.	España	10	46/286 (16)	46/286 (16)	ND	ND	II/III (LMP1)
Beltran y col.	Perú	20	28/188 (15)	28/188 (15)	ND	ND	ND
Bavi y col.	Arabia Saudita	NE	16/217 (7)	NE	NE	ND	ND
Dojcinov y col.	USA	10	40/NE	40/NE	ND	ND	ND
Ozsan y col.	Turquía	20	9/147 (6)	8/146 (5)	1§	ND	ND
Chang y col.	Taiwán	10	15/332 (5)	13/261 (4)	2/71 (3)	ND	I, II y III (LMP1 y EBNA2)
Al-Humood y col.	Kuwait	20	8/44 (18)	3/12 (25)	4/31 (13)	1§	II/III (LMP1)
Cohen y col. (esta serie)	Argentina	20	12/95† (13)	4/52 (8)	4/24 (17)	4/19† (21)	II y III (LMP1, LMP2A, EBNA2, EBNA3A) Lítico (BMRF1)

NE: no especificado en el texto. ND: No determinado. ‡: No fue posible discriminar la cantidad de casos mayores o menores de 50 años, por ello se calculó en base al total de casos mencionado. †: Solo se consideraron los casos inmunocompetentes. §: Casos hallados dentro de la serie EBV+ sin conocer el total de casos para esa edad. En varios de los trabajos el número de casos fue recalculado luego de analizar y excluir, cuando fue posible, los que no cumplimentaran los requisitos de esta entidad (patologías asociadas a inmunosupresión o autoinmunidad, etiología dudosa, diagnóstico impreciso, edades menores a 18 años).

En base a esta exhaustiva revisión bibliográfica realizada de los trabajos publicados sobre el LDGCB EBV+, sumado a las características en la expresión de genes y antígenos virales de nuestra serie, mencionadas en las secciones 5.3.1 y 5.3.2 por un lado, junto con lo obtenido mediante la curva ROC y el AUROC por el otro, en el presente trabajo de tesis se estableció que los casos con 20% o más de células tumorales EBERs+ se definieran como LDGCB EBV+. Más aún, este es el valor de corte que sugieren utilizar las últimas revisiones en el área (Castillo 2012; Ok y col. 2013). Es por ello que establecimos que la frecuencia de esta entidad en nuestra serie fue de 35%, 17% y 8% para los grupos pediátrico, menor y mayor de 50 años respectivamente. Sin embargo, si tenemos en cuenta que dentro de la población pediátrica hay pacientes inmunocomprometidos, y realizamos un cálculo discriminando dichos pacientes, la frecuencia resultante pasa a ser 21% para los pacientes pediátricos inmunocompetentes y 71% en los inmunosuprimidos.

Las condiciones de inmunosupresión incrementan el riesgo de desarrollo de neoplasias EBV+, debido a que se encuentra afectada la inmunovigilancia de los LT específicos, que normalmente controlan a la infección en pacientes inmunocompetentes, y que en inmunosuprimidos permiten la reactivación de la infección por el virus. En estudios realizados en niños inmunocomprometidos se informó un gran porcentaje de pacientes con LNH EBV+, que incluían algunos casos de LDGCB (Nadal y col. 1994; Preciado y col. 2002). Además, el LNH se presenta con frecuencia en jóvenes con inmunodeficiencias congénitas como ataxia-telangiectasia, síndrome de Wiskott-Aldrich, y niños con síndrome linfoproliferativo ligado al X o inmunodeficiencia severa combinada (Parvaneh y col. 2013). Los pacientes con tratamiento inmunosupresor post-transplante de órgano sólido tienen un riesgo de 30 a 50 veces mayor de desarrollar LNH (Tran y col. 2008). Particularmente en los pacientes HIV positivos, el LNH es la segunda patología neoplásica más frecuente, luego del sarcoma de Kaposi (Carbone y col. 2009). En concordancia con esto, en el presente trabajo encontramos que la frecuencia de niños inmunosuprimidos con LDGCB y EBV mostró una asociación significativa.

Por otro lado, los 10 casos restantes que presentaban 5-10% de células EBERs+ se analizaron con un fin comparativo y descriptivo, pero no se incluyeron como parte de esta entidad para calcular su frecuencia en la población analizada. Esta exclusión se fundamentó en diversos aspectos, por un lado, no superaban el valor de corte

establecido y por otra parte, presentaban una expresión tanto de transcritos como de antígenos virales diferente, lo que finalmente nos llevó a hipotetizar que probablemente no correspondieran al mismo subgrupo, dado que presentaban una población de células con características particulares. La existencia de este bajo porcentaje de células podría explicarse por dos teorías. Una de ellas sugiere que son células infectadas posteriormente al establecimiento del clon neoplásico, mientras que la otra propone que son originadas de una proliferación inducida por EBV de un clon maligno de células B no relacionado con el linfoma de origen (Quintanilla-Martinez y col. 1997; Hofscheier y col. 2011). Curiosamente, los casos que presentaron menos del 20% de células infectadas pertenecieron en su mayoría a pacientes mayores de 50 años (7 casos), y solamente se observaron en 1 caso joven y en 2 pediátricos, uno de ellos inmunosuprimido. Suponiendo que la falla en la inmunovigilancia hacia el EBV deriva de la inmunosupresión o de irregularidades en el sistema inmune ocasionadas por la edad, sería esperable una proliferación descontrolada de un gran porcentaje de linfocitos B infectados. El hallazgo de casos con 5-10% de células tumorales EBERs+, en su mayoría pacientes mayores, nos hace cuestionar si la inmunosenescencia sería el mecanismo inmunológico involucrado en la patogenia, para explicar el límite de edad definido para esta entidad.

Considerando particularmente el LDGCB EBV+ del adulto mayor, nuestra serie presenta una frecuencia (8%) comparable a lo que se describe en ciertas poblaciones de Japón (7%), Turquía (7%) y México (6%), y es ligeramente menor que lo que se determinó en Perú (12-19%), Corea (14%), Kuwait (25%) y España (19%), pero mayor a lo que se observó en otras zonas de Europa (2-4%) y Estados Unidos (5%). No obstante, cabe destacar que la falta de consenso en el porcentaje de células tumorales EBERs+ utilizado como valor de corte para determinar un caso como LDGCB EBV+ es una variable importante a considerar a la hora de realizar comparaciones en la prevalencia de esta entidad a nivel mundial. Por otro lado, la media de edad de presentación de nuestros casos (73 años) coincide con la descrita en la entidad definida por la OMS, dentro de la 6ta o 7ma década de vida (Sabattini y col. 2010). Estas observaciones no resultaron inesperadas, dado que una característica notable acerca de las patologías asociadas a EBV es la variación, tanto en la incidencia de la patología, como en la proporción de tumores EBV positivos en diferentes regiones geográficas. En África ecuatorial, por ejemplo, la mayoría de los linfomas que se presentan en niños son

definidos como LB endémico, para diferenciarlo del Burkitt de otras regiones geográficas, el LB esporádico. Mientras que el LB endémico presenta prácticamente un 100% de asociación con EBV, el esporádico se encuentra asociado al virus hasta en el 90% en regiones como el noreste de Brasil, y solo en el 20-30% en países desarrollados (Brady y col. 2008; Mbulaiteye y col. 2009). En Argentina nuestro grupo describió una asociación de LB pediátrico con EBV del 25% en el caso de pacientes inmunocompetentes y del 100% en pacientes inmunosuprimidos (Chabay y col. 2013). Otro claro ejemplo se observa en el LH, cuyo porcentaje de asociación con el virus varía de acuerdo al desarrollo socioeconómico de la población; mientras que en países en vías de desarrollo este porcentaje es cercano al 90% (Kuppers 2003), en países desarrollados es del 40% (Brauninger y col. 2006). Tanto en pacientes pediátricos como adultos de Argentina, nuestro grupo describió un porcentaje de asociación del 54% y 31%, respectivamente (De Matteo y col. 2003; Chabay y col. 2008).

En lo concerniente a los pacientes menores de 50 años, el grupo de Beltran y col. en Perú publicó recientemente un grupo de casos con diagnóstico de LDGCB EBV+, que mostraban las características histopatológicas e inmunofenotípicas propias de esta entidad, solo que no cumplían el requisito de ser pacientes mayores de 50 años de edad (Beltran y col. 2011). Como se puede analizar en la Tabla XVI, varios son los trabajos que mencionaron en su serie algunos casos cuyas edades no cumplían con lo estipulado por la OMS. Por ejemplo, Oyama y col. excluyeron de su estudio 8 pacientes menores de 40 años que representaban el 5% del total de casos con LDGCB EBV+ (Oyama y col. 2007), mientras que un estudio de Corea hecho por Park y col. incluyó 14 pacientes jóvenes con LDGCB EBV+, algunos de hasta 20 años de edad (Park y col. 2007). Más aún, Hoeller y col. en su trabajo excluyeron 2 pacientes europeos que eran menores de 50 años, y representaban el 20% del total de pacientes con LDGCB EBV+ (Hoeller y col. 2010). Por lo tanto el hallazgo de un 17% de casos con LDGCB EBV+ dentro del grupo de menores de 50 años en nuestra serie fue esperable, sin embargo, cabe destacar que en nuestra población este grupo presentó una asociación con EBV mayor en comparación con los demás trabajos analizados.

Respecto a los pacientes pediátricos, los porcentajes de positividad para EBV observados en este trabajo de tesis son menores a los observados en estudios previos restringidos exclusivamente a niños africanos, donde se analizaron series de pacientes con LNH que incluía un subgrupo de LDGCB. Estos análisis describen una frecuencia

de EBV del 43-44% con este tipo de linfoma (Cool y col. 1997; Tumwine y col. 2010), aunque el porcentaje de células EBERs+ usado como criterio y el estado inmunológico de los pacientes no está especificado. Aunque en la bibliografía, más allá del estudio africano, no se encuentran trabajos que analicen particularmente el LDGCB en los niños, sí hay hallazgos en adolescentes inmunocompetentes (Beltran y col. 2011; Ao y col. 2014). Si bien se tiene en cuenta que el subgrupo de pacientes pediátricos inmunocompetentes estudiado es pequeño (19 casos), cuando se los analizó en particular, la frecuencia de positividad para EBV (21%) resulta cercana a la caracterizada previamente para la entidad descrita en mayores de 50 años en Perú (Morales y col. 2010), y, sugestivamente, no difiere en forma significativa del porcentaje observado en los otros dos grupos etarios.

El hallazgo de EBV en casos de LDGCB en pacientes jóvenes y pediátricos cuyas características de presentación no difieren de lo que se observa en los adultos mayores, indica que la entidad “LDGCB EBV+ del adulto mayor” puede ocurrir tanto en pacientes jóvenes inmunocompetentes como en niños, y que no estaría exclusivamente relacionado con la edad. Por ende, la frecuencia determinada y la falta de diferencia significativa entre los grupos etarios sugieren que la edad establecida como límite debería ser revisada.

Teniendo en cuenta otros aspectos demográficos analizados, algunas patologías malignas asociadas a EBV se encuentran preferentemente en pacientes de sexo masculino (Hsu y col. 2000). Sin embargo, en un trabajo previo realizado en LNH pediátrico nuestro grupo demostró que no hay una asociación preferencial con un género en particular (Chabay y col. 2002). En la serie analizada, a pesar de exhibir una mayor tendencia en los hombres, en ninguno de los grupos etarios estudiados se determinó una asociación significativa entre la presencia de EBV y el sexo. Con respecto a la asociación de EBV con la edad, nuestro grupo de trabajo describió previamente una mayor prevalencia de LH (Chabay y col. 2008) y de LNH-B (Chabay y col. 2011) asociados a EBV en niños menores de 10 años, en los cuales la edad de presentación en los casos EBV+ de ambas neoplasias difirió significativamente de los EBV- (8 y 5 años vs. 12 y 10 años, respectivamente). En la serie de casos pediátricos estudiados en este trabajo de tesis se vuelve a confirmar la asociación particular de EBV en pacientes de corta edad, ya que el LDGCB EBV+ se encuentra distribuido en forma significativa en niños menores de 10 años, dado que la media de edad para los casos

EBV+ es de 6 años comparada con los 11 años de los casos EBV-. Esta asociación, además de coincidir con otros linfomas pediátricos asociados al virus en nuestra población, se ajusta a hallazgos previos sobre la infección primaria por EBV en Argentina, dado que se describió que los niños se infectan a edades muy tempranas y casi el 70% de ellos son seropositivos a la edad de 2 años (Chabay y col. 2013). Esta observación, junto con la elevada asociación demostrada tanto en los LH y como en los LNH-B pediátricos, sugiere que el EBV podría cumplir un rol importante en la linfomagénesis en niños pequeños, como una posible complicación tardía de la primoinfección en niños de corta edad.

Contrariamente a las primeras publicaciones del tema surgidas en Asia (Oyama y col. 2003; Shimoyama y col. 2009), las más recientes, de otras regiones geográficas, describieron que el LDGCB EBV+ del adulto mayor tiene una presentación predominantemente ganglionar (Gibson y col. 2009; Quintanilla-Martinez y col. 2009; Hoeller y col. 2010; Hofscheier y col. 2011). Por otro lado, morfológicamente, la distinción entre los subtipos monomórficos y polimórficos dejó de considerarse de relevancia clínica (Oyama y col. 2007). Como ya se mencionó, el subtipo histológico post-CG es el que predomina en el LDGCB EBV+ del adulto mayor, cuyas células tumorales se asemejan a un linfocito B normal que ha alcanzado un cierto nivel de diferenciación plasmocítica y presenta una activación constante de la vía NF-kB. Este subtipo fue relacionado con un peor pronóstico en diversos estudios, y es allí que radica su importancia clínica. No obstante, Montes- Moreno y col describen que la activación de esta vía ocurre en casos de LDGCB EBV+ tanto CG como post-CG, sugiriendo un rol adicional del EBV en la activación de NF-kB, independientemente de la célula de origen (Montes-Moreno y col. 2012). Se demostró *in vitro* que el EBV puede estimular la vía de NF-kB imitando la actividad del CD40 mediante su antígeno LMP1 (Kuppers 2003; Lam y col. 2003; Panagopoulos y col. 2004). Dado que en este trabajo no encontramos una asociación entre el subtipo histológico y la presencia de EBV, el virus podría estar ejerciendo este rol adicional en la activación de dicha vía.

Aunque varias de estas y otras características clínico-patológicas fueron descritas en el LDGCB EBV+ del adulto mayor (necrosis, inmunoblastos, células HRS-like, alto índice de proliferación, localización ganglionar, estadio clínico avanzado, variante polimórfica y subtipo histológico post-CG), todos los estudios, incluido el presente trabajo de tesis, concluyen que no hay un patrón morfológico o

inmunofenotípico único y específico, con excepción de la presencia del virus, asociado a esta entidad, y que a su vez permita el diagnóstico diferencial respecto del LDGCB EBV- (Castillo y col. 2011; Castillo 2012).

Los estudios donde se define el perfil de latencia viral presente en el LDGCB EBV+ del adulto mayor están basados, casi exclusivamente, en la utilización de los marcadores virales EBNA2 y LMP1 (Tabla XVI). En general, se detecta la proteína LMP1 en el 90% de los casos, mientras que EBNA2 se expresa en un porcentaje menor de los mismos (15-30%). A partir de estos resultados se definió un perfil de latencia viral tipo II y/o III en esta entidad (Castillo y col. 2011); a su vez, se observó el mismo perfil II y/o III en un grupo de LNH-B pediátricos que incluía casos de LDGCB en Polonia (Kasprzak y col. 2007). El patrón de latencia III es característico (aunque no el único) de los PTLN EBV+. El LDGCB EBV+ del adulto mayor comparte con este tipo de procesos linfoproliferativos, además de su asociación con el virus, otras características morfológicas e inmunofenotípicas (Shimoyama y col. 2008). De hecho, se propone que la revisión exhaustiva de la historia clínica sea una conducta a seguir en busca de alguna causa de inmunosupresión, como el criterio más útil para diferenciar ambas patologías.

Para definir el perfil de latencia viral en nuestra serie se utilizaron dos estrategias, la IHQ, para analizar la expresión de antígenos virales, y la qPCR, para detectar la expresión de genes. Debido a la falta de diferencias significativas en la expresión de los transcritos estudiados, se decidió incorporar los resultados de los casos de niños inmunocomprometidos al análisis subsecuente. Esto está avalado por un análisis hecho por Nguyen-Van y col. (Nguyen-Van y col. 2011) quienes también observaron resultados semejantes en una serie pequeña de 14 casos de LDGCB EBV+ entre pacientes inmunocompetentes e inmunosuprimidos mayores de 50 años.

Con respecto a los niveles de ARNm para todos los genes analizados, tanto latentes como líticos, los resultados indicaron que el grupo de casos que exhibía más del 20% de células tumorales EBERs+ expresaba niveles significativamente mayores (excepto LMP2A en el grupo pediátrico) que aquellos que se encontraban por debajo de este valor. En el primer grupo, se observó un patrón de expresión de genes virales menos restrictivo, tanto en la variedad como en los niveles presentes por encima del percentil 25% de transcritos latentes y líticos. Por otro lado, en el segundo grupo esta expresión fue más limitada, con varios genes ausentes y otros con niveles generalmente

por debajo de dicho percentil, en especial los líticos. La primera explicación para este hecho indicaría que la expresión menos restrictiva de transcritos virales, que usualmente se asocia con una respuesta inmune poco eficiente en el control de EBV, podría estar vinculada al deterioro del estado inmune por inmunosenescencia. Curiosamente, esta expresión variada de genes virales, esperable ante dicho deterioro, no se observó exclusivamente en el grupo de pacientes mayores de 50 años, sino que también se encontró en adultos jóvenes y pediátricos, tanto inmunocompetentes como inmunocomprometidos. A su vez, la expresión génica más limitada observada en los casos por debajo del valor de corte del 20% de células EBERs+ ocurrió en los 3 rangos de edad, especialmente en adultos mayores. En consecuencia, estas observaciones refuerzan el hallazgo de características de la infección viral comunes a todas las edades analizadas, y, en consecuencia, la teoría de la inmunosenescencia como principal responsable de la participación de EBV en la patogénesis del LDGCB no se cumpliría en nuestra serie.

Aunque todavía no se haya establecido la función exacta que cumple cada uno de los antígenos de latencia viral en la oncogénesis, la correlación directa encontrada entre la expresión de los genes virales entre sí y el porcentaje de expresión de EBERs, podría deberse a que la interacción de estos factores, sumada a la que se demostró *in vitro* con factores de transcripción y co-activadores celulares, sería necesaria para llevar a la inmortalidad de la célula infectada (Klein y col. 2007). Por ejemplo, la correlación directa entre los EBNAs cuantificados fue esperable, ya que en la latencia III estos ARNm se generan a través de *splicing* alternativo desde un transcripto primario único que se inicia a partir del promotor Cp/Wp (Rowe y col. 2009). Por otro lado, el control de la expresión de los genes de LMPs en las diferentes latencias aún no está del todo claro. En células B infectadas que presentan latencia III, la expresión de LMP1 y LMP2 depende de la expresión del gen viral EBNA2 (Lam y col. 2003). Sin embargo, en la latencia II se demostró que la expresión de LMPs puede ocurrir mediante un mecanismo independiente de este gen (Kis y col. 2011). En nuestros casos, la expresión de LMP1 correlacionó significativamente con EBNA2, además de con el resto de los genes analizados, mientras que LMP2A no tuvo correlación, probablemente debido a los bajos niveles detectados de este gen en particular, o en su defecto por una expresión independiente del mismo. Esta situación se describió previamente en CNF, donde se observó la expresión de LMP1 junto con EBERs y EBNA1 pero en ausencia de los

demás antígenos de latencia, LMP2A entre ellos (Niedobitek 1998). En nuestro caso, el análisis de la expresión del antígeno LMP2A coincidió con lo expresado a nivel de transcritos y, por ende, se demostró que posee un comportamiento diferente del resto de los genes virales analizados en este trabajo, por lo que serían necesarios más estudios *in vitro* para dilucidar mejor las causas de este fenómeno.

Con respecto a los genes líticos, la correlación encontrada sugiere que los LDGCB EBV+ estarían expresando tanto genes de latencia como líticos en un mismo caso, lo cual indica el rol activo que tendría el EBV en este linfoma, como también se describió previamente en casos de LB (Niedobitek y col. 1995). Asimismo, por medio de un análisis de genómica funcional a gran escala de EBV en LCLs, se describió que los genes líticos del virus se encontraban coexpresados junto con genes involucrados en la activación de vías intracelulares asociadas al cáncer, indicando que el ciclo lítico podría jugar un rol inesperado en la oncogénesis viral (Arvey y col. 2012). Sin embargo, también existe la posibilidad de que la expresión de algunos de estos transcritos tenga inhibida su traducción a proteínas, como recientemente mostraron Strong y col. en 4 casos de LDGCB EBV+ donde se comprobó la presencia de una alta expresión de transcritos líticos inmediatamente tempranos, pero sin la detección de los demás genes líticos, por lo cual proponen que en estos casos se estaría desarrollando una infección lítica abortiva, probablemente relacionada con la progresión tumoral (Strong y col. 2013).

Posteriormente, a fin de corroborar lo observado a nivel de transcritos y definir más acabadamente los perfiles de latencia en nuestros casos, se realizaron las inmunomarcaciones de varios antígenos virales, tanto latentes como un lítico temprano. En el caso del antígeno LMP2A, como se mencionó, la falta de correlación con la expresión del resto de los transcritos virales, así como la ausencia de transcritos en los casos pediátricos, coincidió con la falta de detección del antígeno por IHQ, lo cual validó así las observaciones previas. Por otra parte, la expresión del antígeno LMP1 en la mayoría de los casos de LDGCB EBV+ (70-100%) coincide con lo mencionado en otros estudios (Shimoyama y col. 2006; Oyama y col. 2007; Shimoyama y col. 2008; Castillo y col. 2011; Hofscheier y col. 2011), e indica una participación importante del EBV en el desarrollo del linfoma, ya que LMP1 es la principal oncoproteína viral. La expresión de EBNA2 en un porcentaje de nuestros casos (20-33%) fue semejante a lo descrito en trabajos de Japón, Taiwán, Europa y México (28%) en adultos mayores, los

cuales proponen que la presencia de dicha proteína indicaría algún grado de insuficiencia del sistema inmune (Oyama y col. 2007; Hoeller y col. 2010; Hofscheier y col. 2011; Chang y col. 2014). Sin embargo, nuestros resultados no avalan esta propuesta, ya que la expresión de este antígeno se vio con igual frecuencia tanto en los adultos mayores como en el grupo de jóvenes y niños. Por ende, en nuestra serie en particular, la presencia de ciertos antígenos virales potencialmente ligados al desarrollo del linfoma no se correlacionaría exclusivamente con una alteración en el sistema inmune ligada a la edad.

Si bien pudo observarse la expresión correspondiente a los transcritos de EBNA3C, el cual se genera por *splicing* de un mismo ARNm igual que toda la familia EBNA3, en nuestra serie de LDGCB EBV+ no se expresó la proteína EBNA3A, contrariamente a lo que describieron Nguyen-van y col. que encontraron este antígeno altamente inmunogénico, conjuntamente con altos niveles de expresión de este gen por PCR en tiempo real, en el 86% de los casos estudiados, tanto inmunocomprometidos como inmunocompetentes (Nguyen-Van y col. 2011).

Con respecto a la expresión de antígenos líticos, describimos en nuestros casos la presencia de una proteína lítica temprana (BMRF1) en un pequeño porcentaje de células tumorales, en concordancia con la observación de genes líticos a nivel de ARNm. La presencia de antígenos líticos en LDGCB EBV+ nunca había sido descrita por ningún grupo de trabajo, lo cual es destacable y podría estar señalando la presentación de este tipo de infección en una parte de las células tumorales dentro de esta patología. La presencia de este antígeno lítico estaría indicando, tal como fue mencionado anteriormente, una replicación viral defectuosa. No obstante, también podría revelar una reactivación de la infección por EBV, que resultaría en la producción de viriones e infección de nuevos linfocitos B o células epiteliales adyacentes, con la potencialidad de finalizar en la transformación maligna de estas nuevas células. La reactivación lítica puede desencadenarse en cultivo mediante varios compuestos que directa o indirectamente activan a los promotores de los genes inmediatamente tempranos. Por ejemplo, mediante un inhibidor de la ADN-metil-transferasa, se observó en dos poblaciones celulares independientes dentro de la misma línea linfoblastoidea Rael, tanto la activación del promotor de latencia Cp como la inducción del ciclo lítico (Masucci y col. 1989; Robertson y col. 1995). Sumado a esto, Niller y col. especularon que el genoma de EBV en LCL derivadas de LB o en linfocitos B de memoria *in vivo*

respondería a señales de reactivación, como la demetilación, entrando tanto en ciclo lítico como activando al promotor Cp, y proponen ciertos mecanismos epigenéticos estarían involucrados en la selección de un camino u otro (Niller y col. 2014).

A su vez, en los casos con 5-10% de células EBERs+ (P.10-11, J.5, A.5-11), las inmunomarcaciones permitieron definir acabadamente los perfiles de latencia viral, ya que en estos la expresión de transcritos para la mayoría de los genes estuvo cercana o por debajo del percentil 25%. La ausencia de todas las proteínas virales, tanto líticas como de latencia ensayadas por IHQ en estos casos indicó que, o bien los antígenos no se expresaron en cantidad suficiente para ser detectados, o las proteínas no se expresaron por alguna razón determinada. Por un lado, la correlación de los transcritos virales con el porcentaje de EBERs estaría avalando la primera hipótesis. Sin embargo, la ausencia absoluta de detección de cualquiera de estos antígenos en las células tumorales de todo el preparado, indicaría que es probable que ni las proteínas de latencia ni las líticas se expresaran, y por ende estos casos, por fuera del valor de corte, presentarían un perfil de latencia tipo I. Este hallazgo confirma las características diferenciales de expresión de antígenos virales presentes en los casos definidos como LDGCB EBV+.

Sumado a esto, en nuestro trabajo, solamente 2 casos del grupo pediátrico con LDGCB EBV+ y alto porcentaje de células EBERs+ fueron definidos con el perfil I de latencia viral, los cuales eran uno inmunosuprimido y otro inmunocompetente. Si bien está demostrado que los linfomas EBV+ en pacientes inmunocomprometidos están asociados con un perfil de latencia tipo III (Thorley-Lawson 2005), como consecuencia de la falta de control inmune hacia la célula infectada, se han evidenciado pacientes inmunocomprometidos con neoplasias EBV+ que presentan un perfil de latencia viral más restringido (II o I) (Capello y col. 2003; Tsao y col. 2007). Por otro lado, a diferencia de los estudios previos que definieron latencia viral, un estudio reciente realizado en más de 400 LDGCB de adultos en Taiwán reveló que el 60% de los LDGCB EBV+ presentaba un perfil de latencia tipo I (Chang y col. 2014). Sin embargo, al contrario de la mayoría de nuestras observaciones, estos casos exhibían altos porcentajes de células EBERs+, indicando una participación importante del EBV en su patogénesis, lo que lleva a suponer que el virus no fue meramente un hallazgo casual en dicho estudio.

Por lo mencionado previamente, se concluyó que nuestra serie completa de LDGCB EBV+, incluyendo todos los grupo etarios, presentaba predominantemente el perfil de latencia tipo II, y en menor proporción el de tipo III, definidos en base a los resultados de IHQ, y en concordancia con lo indicado para la entidad en mayores de 50 años previamente descripta por la OMS (Castillo 2012). Lo novedoso en nuestra serie, y que no había sido referido previamente, fue el hallazgo de transcriptos y de un antígeno de ciclo lítico, acompañando a ambos perfiles de latencia, en una gran proporción de casos de todas las edades. Cabe señalar que los perfiles virales establecidos (tipo II y III, junto con perfil lítico) se presentaron de forma análoga en los 3 grupos etarios, lo cual confirma la falta de diferencias asociadas a un grupo en particular. A su vez, la presencia de estos perfiles, casi exclusivamente restringidos a aquellos casos con más del 20% de las células EBERs+, refuerza definitivamente el valor de corte utilizado para definir un caso como LDGCB EBV+.

Aunque los virus oncogénicos han sido identificados como agentes etiológicos en el desarrollo de diferentes tumores, en algunos de ellos la infección por sí sola no es suficiente para inducir el desarrollo de cáncer. La mayoría de los individuos infectados no necesariamente desarrolla una neoplasia, más aún en el caso de EBV, y normalmente son muchos los años que transcurren entre la infección primaria y la aparición del tumor, sugiriendo que diversos factores, ya sea propios del hospedador o desconocidos, además de los virales y de la biología intrínseca del tumor estarían involucrados en la transformación maligna (Chen y col. 2014).

Como ya se mencionó reiteradamente, uno de los principales factores propuestos en la patogenia del LDGCB EBV+ está en estrecha relación con la edad. La inmunovigilancia ineficiente debido al envejecimiento es llamada “inmunosenescencia”. Entre sus características más desatacadas se encuentran: a) la acumulación de poblaciones T efectoras oligoclonales, b) la disminución de la disponibilidad y diversidad de las poblaciones T vírgenes y c) el entorno inflamatorio de citoquinas y quimioquinas (Ouyang y col. 2003; Lazuardi y col. 2005; Pawelec 2014). La inmunosenescencia, lejos de ser solo una disminución en la funcionalidad, afecta por igual a la inmunidad innata y adaptativa. De forma análoga, se ha visto el mismo efecto en las infecciones crónicas causadas por ciertos virus, principalmente por aquellos que establecen latencia en su hospedador, como el EBV y el CMV (Fulop y col. 2013). Sin embargo, la hipótesis de la inmunosenescencia en LDGCB EBV+ aún es controvertida,

ya que el análisis de factores pronósticos y la biología del tumor no son muy diferentes entre adultos jóvenes y mayores. Más aún, parecería que la tasa de respuesta al tratamiento es similar en ambas poblaciones (Gutierrez y col. 2011; Coso y col. 2014).

El rol que cumple el EBV en las alteraciones inmunológicas intratumorales fue ampliamente demostrado en el LH, donde la presencia del virus está involucrada en la atracción de diferentes tipos de células inmunes hacia el microambiente tumoral (Chetaille y col. 2009). Esta intervención del virus en el modelado del microambiente es sumamente importante, ya que la interacción entre el tumor y las células inmunes que lo rodean determina su desarrollo, progresión e incluso su respuesta al tratamiento (Herreros y col. 2008). Sin embargo, hay pocos análisis que se focalicen en la caracterización del microambiente en el LDGCB EBV+, donde el escenario permanece casi inexplorado.

En el presente trabajo de tesis, el análisis del microambiente tumoral se realizó a través de dos abordajes diferentes: la cuantificación de algunas subpoblaciones celulares, mayormente de LT, y la determinación de los niveles de transcriptos de citoquinas y quimioquinas potencialmente modulados por el EBV.

En relación a las subpoblaciones celulares cuantificadas en los diferentes rangos etarios, observamos que, en las muestras pertenecientes a pacientes adultos mayores, se determinó una mayor proporción de células Foxp3+ y PD-1+ en comparación con lo observado en muestras de niños. Estas observaciones están en relación con algunos análisis previos en pacientes mayores con LDGCB, donde se describió un aumento en la población inmunomoduladora de LTreg, en claro detrimento de la inmunidad celular (Gutierrez y col. 2011). Este hecho también fue observado por Ahearne y col. en su serie de 70 pacientes adultos con LDGCB, donde informaron que la composición del microambiente en este grupo se caracterizaba por la presencia de células PD-1+ y Foxp3+ (Ahearne y col. 2014). Por otro lado, en los casos pediátricos del presente trabajo se observó una tendencia a un mayor recuento de células CD8+. Aunque no hay datos acerca de lo que ocurre en el microambiente tumoral en niños con LDGCB, en el LH clásico se describió el predominio de un perfil citotóxico a partir de la observación de los marcadores CD3+, CD8+, TIA1+ y T-BET+ en LT (Barros y col. 2011), lo cual podría extrapolarse a lo observado en este trabajo de tesis.

Como confirmación de las observaciones previas, se estableció además para estos marcadores una discreta correlación, directa para Foxp3 y PD-1 e inversa para

CD8, y la edad de los pacientes. El mecanismo por el cual se generan estas discrepancias podría radicar en diferencias que existen entre niños y adultos mayores a nivel de subpoblaciones de sangre periférica, por lo que es concebible que éstas puedan impactar en su respuesta antitumoral, al menos respecto al tipo de células reclutadas localmente (Gregg y col. 2005; Lages y col. 2008). Un estudio asiático con 400 voluntarios de varias edades (20 a 90 años) ratificó una disminución en las poblaciones de LT CD8+, un aumento de LT CD4+ y Foxp3+ en sangre periférica de pacientes mayores de 70 años (Utsuyama y col. 2009). Sin embargo, no existe este tipo de análisis en ganglio normales que permitan establecer comparaciones. En la serie analizada no observamos estas diferencias en las poblaciones de células CD4+ y GrB+ respecto a su proporción, específicamente en el microambiente tumoral, entre los 3 grupos etarios.

Sugerentemente, la falta de diferencias en la cuantificación de todos los marcadores analizados entre los casos de adultos jóvenes y mayores revelaría que, en el contexto del LDGCB, el proceso de inmunosenescencia no tendría influencia en la composición del microambiente en la presente serie. Dichas diferencias estarían restringidas exclusivamente a ciertos marcadores específicos entre los niños y los adultos mayores.

Para complementar el análisis, se calcularon las relaciones entre algunos de los marcadores analizados, usados como indicadores de las interacciones inmunobiológicas del microambiente. En el LDGCB en pacientes adultos, la mayor parte de los estudios analizan la relación CD8/CD4, y describen resultados discordantes. Mientras que algunos sugieren una participación importante de los LTCD4+ (Xu y col. 2001), otros indican que la prevalencia de los LTCD8+ son característicos de los LDGCB, dada la relación CD8/CD4 >1 (Daussy y col. 2013). En nuestra serie se presentaron ambas observaciones, dado que en niños se demostró la relación CD8/CD4 >1, mientras que en adultos jóvenes y mayores esta relación fue inversa. Por ende, el proceso de linfomagénesis en el LDGCB se desencadenaría independientemente de las características de dicha relación, revelando así la necesidad de estudiar ciertos marcadores específicos de funcionalidad de dichas poblaciones.

El marcador GrB es indicador de función efectora en poblaciones citotóxicas activadas, no solo en los LT CD8+, sino también en las NK, dado que refleja la presencia de esta proteína en los gránulos citoplasmáticos de ambas poblaciones (Russell y col. 2002; Cullen y col. 2010). Al analizar la relación CD8/GrB, tanto en

adultos mayores como en jóvenes, dicha relación fue cercana a 1, lo cual pone de manifiesto la probabilidad de que la población efectora activada en ambos grupos de adultos este compuesta por LT CD8+. Está demostrado que en niños el rol de la inmunidad innata, particularmente a nivel NK, es muy importante en el control de infecciones y procesos neoplásicos (Ortac y col. 2002; Williams y col. 2005). Esto explicaría porque en los casos pediátricos, a pesar del aumento en el recuento de LT CD8+ en comparación con los adultos, la relación CD8/GrB resultó mayor a 1, indicando que probablemente la población efectora GrB+ esté compuesta tanto por LT CD8+ como por células NK.

Se demostró tanto en infecciones crónicas virales como en cáncer que uno de los mecanismos de control inhibitorio está dado por la presencia de PD-1 en la superficie de linfocitos infiltrantes, los cuales mediante la unión a su ligando PD-L1 en la célula tumoral o infectada, experimentan una disminución de la activación y proliferación. Puntualmente en LH, las células HRS estimulan esta vía, por ende tienen un efecto inhibitorio del microambiente tumoral, causando anergia de las poblaciones inmunes que las rodean (Yamamoto y col. 2008). Si bien este aspecto está menos explorado en LDGCB, el análisis de la relación GrB/PD-1 sería un indicador del equilibrio entre la actividad efectora *versus* la inhibitoria. Llamativamente, en todos los grupos etarios prevaleció la relación GrB/PD-1 <1. Dado que los LT que expresan la molécula PD-1 muestran características de agotamiento, como anergia y secreción limitada de citoquinas (Barber y col. 2006), nuestros resultados, específicamente respecto a los marcadores de LT analizados, sugieren fuertemente que en el LDGCB, habría un desbalance hacia un entorno mayormente anérgico o inhibitorio.

En lo referente a la influencia del EBV en las poblaciones celulares del microambiente, lo más destacado en este trabajo fue el aumento de la población de células GrB+ asociada a la presencia del virus, evaluado en la totalidad de los casos, y que se mantuvo cuando se analizaron los grupos etarios de manera individual. A este hecho se sumó la observación de una tendencia a una mayor proporción de LT CD8+ en los casos EBV+. La GrB es una molécula con función de serino-proteasa liberada por los LTc y las células NK, y es a su vez la responsable de su principal función en la inmunovigilancia: la eliminación de las células infectadas o tumorales mediante apoptosis. Como se mencionó previamente, el LH es el ejemplo más estudiado de interacción entre el EBV y el microambiente tumoral, y varios son los trabajos que

señalan este fenómeno. En uno de los primeros estudios, Oudejans y col. determinaron que el porcentaje de células GrB⁺ era mayor en los casos de LH EBV⁺ que en los que no presentaban el virus, y que pertenecían específicamente a la población de LT CD8⁺ (Oudejans y col. 1996). Más adelante, en un grupo de pacientes pediátricos de Brasil, los casos de LH EBV⁺ también se asociaron con un aumento en la población de LTc, cuantificados a través de los marcadores celulares TIA1 y GrB, (Barros y col. 2011). Sin embargo, la presencia del marcador GrB se asoció con un peor pronóstico y una menor supervivencia (Oudejans y col. 1997; Alvaro y col. 2005; Steidl y col. 2011). Estos estudios sugieren que los LTc activados, que potencialmente podrían eliminar a las células infectadas, fallan en su funcionalidad dentro del microambiente del tumor. Esta falla podría ser consecuencia de cambios en el microambiente, como la disminución en la expresión de CMH de clase I, la inducción de anergia local por la secreción de IL-10, TGFβ, la expresión de antagonistas de GrB o la inducción de apoptosis de LTc vía CD95L (Herreros y col. 2008).

Cuando analizamos las relaciones entre poblaciones, nuestros hallazgos se vieron reforzados, dado que el grupo de casos EBV⁺ se caracterizó por una relación CD8/CD4 >1 y CD8/GrB <1. Esto claramente indica el predominio de una población citotóxica activada en presencia del virus, que probablemente se vea contrarrestada en parte por el microambiente inhibitorio generado por los LT PD-1⁺ que se observó en los LDGCB. No obstante, la naturaleza exacta de la población GrB⁺ posiblemente provenga del aporte de células CD8⁺ como NK. En uno de los pocos trabajos realizados en pacientes adultos con LDGCB EBV⁺, tanto inmunocompetentes como asociados a HIV, el grupo de Liapis y col. también describió un aumento sustancial en las células citotóxicas GrB⁺ en los casos LMP1⁺, en comparación con los LDGCB EBV⁻ y con los casos que no expresaban ningún antígeno viral excepto EBERs (Liapis y col. 2013). Además ellos también describieron en su serie la presencia de LT PD-1⁺. Este hallazgo concuerda con nuestra serie, y avala la idea de que la inmunovigilancia de tumores asociados virus normalmente procura reducir la carga de células infectadas. Pero, a juzgar por la aparente ineficiencia de las células citotóxicas en cumplir este rol, deben existir ciertos procesos en paralelo que impidan esta acción. De forma colateral, estos hallazgos permitirían argumentar que los pacientes con inmunosupresión aún conservarían la capacidad de establecer un mecanismo de defensa inmune hacia tumores asociados a virus, al menos a nivel del microambiente.

Estas observaciones nos llevaron a considerar la importancia de dilucidar cuales serían los genes virales que podrían estar involucrados en el aumento de ciertos marcadores del microambiente. No fue sorprendente encontrar, en el análisis de correlación realizado, que la expresión de ciertos transcritos de EBV de latencia y líticos (EBNA2, BZLF1 y BLLF1) se correlacionaba con la cuantificación de células GrB+, mientras que la cantidad de células CD4+ correlacionaba de forma negativa con la actividad transcripcional de todos los genes virales excepto LMP2A. Por otro lado, las células FoxP3+ correlacionaban solo con LMP1. Los estudios *in vitro* y *ex vivo* utilizando LCL o muestras de pacientes con LH demostraron que la expresión de EBNA1 y LMP1 tenía una relación directa con la presencia de LTreg y con un ambiente supresor (Marshall y col. 2007; Baumforth y col. 2008). Sin embargo, en nuestro caso la actividad transcripcional de genes virales estaría favoreciendo la conformación de un entorno altamente citotóxico, aunque presumiblemente ineficiente, en todos los LDGCB EBV+. Si bien los mecanismos detrás de este comportamiento nos son desconocidos, se podría hipotetizar que la gran cantidad de células PD-1+ presentes estarían actuando como mecanismo compensatorio e inhibiendo su acción específica. De hecho se postula que el eje PD-1 - PD-L1 sería regulado positivamente por mecanismos independientes a la expresión génica del virus (Chen y col. 2013), lo cual concuerda con la ausencia de correlación de esta subpoblación con la expresión de los genes virales estudiados advertida en nuestra serie. Pese a esto, cabe mencionar que el mismo análisis, pero realizado dentro de cada grupo etario, no nos permitió corroborar las observaciones determinadas en el conjunto total de pacientes, con excepción del grupo de mayores de 50 años donde persistió la correlación de los transcritos líticos con las células GrB+.

Otra forma de caracterizar el microambiente tumoral y tratar de explicar algunas de las causas por las cuales sucederían las observaciones mencionadas en las poblaciones celulares es evaluar su funcionalidad.

El sistema de inmunovigilancia antitumoral depende entre otras cosas, de mecanismos reguladores y de un balance adecuado en la red de citoquinas y quimioquinas que son las responsables de la diferenciación, proliferación, y supervivencia de las células linfoides. Un desbalance en esta red y/o en sus receptores involucra cambios en el reclutamiento y la funcionalidad de diversas poblaciones de células inmunes hacia el microambiente del tumor. Un claro ejemplo de estos fenómenos es el LH, donde existe cada vez más evidencia que sugiere que los cambios en el balance

entre poblaciones linfocitarias, inducidos por una alteración en la producción de citoquinas y quimioquinas, estarían involucrados en la patogénesis de esta patología, y que los mismos podrían inducir la reactivación de infecciones virales latentes, como la de EBV (de la Cruz-Merino y col. 2012). Se detectaron diversas citoquinas a nivel transcripcional y/o proteico en las células HRS o las células infiltrantes, entre ellas, citoquinas inmunomoduladoras como IL-10 y TGF β juegan un importante rol en la inmunotolerancia presente en el LH, y, aparentemente, el efecto supresor que tendrían sería independiente de las poblaciones de LTreg presentes, dado que se vio que la célula HRS es capaz de secretar ambas moléculas a fin de inhibir la función de los LT efectores (Steidl y col. 2011).

Por otra parte, la edad del hospedador también tendría un papel en la modulación de la respuesta de citoquinas. Se demostró que los LTc de los ancianos muestran un déficit de la actividad en cultivo en respuesta a un mitógeno. El IFN γ es una de las citoquinas que estimula esta respuesta en los LTc. Esta actividad de los LTc desmejorada en ancianos es atribuible a una alteración desde un perfil citotóxico efectivo característico de individuos más jóvenes a uno anérgico (Fulton y col. 2009).

En nuestra serie, realizamos una aproximación mediante la cuantificación relativa de los transcritos de algunas citoquinas pro- (IFN γ) y anti-inflamatorias (IL-10 y TGF β) así como una quimioquina (CCL20), todas ellas potencialmente moduladas por la acción del EBV.

De acuerdo con lo que se describió en el LH observamos que, en todos los grupos etarios, se detectó la expresión de transcritos de IL-10 y TGF β , junto con IFN γ y CCL-20 aunque en niveles visiblemente menores. Sin embargo, dado que encontramos niveles comparables en las medias de expresión entre los tres grupos etarios, nuestras observaciones no muestran diferencias atribuibles a la edad. Este hecho se confirma con la falta de correlación entre la cuantificación de transcritos de estas citoquinas y la edad de los casos, avalando que el proceso de inmunosenescencia no tendría mayor influencia en la serie analizada. Cabe destacar que la mayoría los estudios realizados para evaluar la funcionalidad de las células inmunes en pacientes de edad avanzada fueron realizados en muestras de sangre periférica, mediante técnicas *ex vivo*, y con el uso de compuestos como la PHA, que estimulan la actividad de estas células de forma inespecífica. Creemos que en un contexto tal como el microambiente tumoral,

varios son los factores que interactúan, y que derivan por ende en un proceso multifactorial que es difícil analizar de forma aislada.

El aporte del EBV a las características del microambiente no puede ser desestimado. Varios estudios *in vitro* mostraron que en el entorno de los linfocitos B infectados, la expresión de la citoquina inmunomoduladora IL-10 puede ser inducida por algunos genes de EBV, que incluyen genes líticos inmediatamente tempranos como BZLF1, y latentes como LMP1 y EBERs (Mahot y col. 2003; Lambert y col. 2007; Samanta y col. 2008). Por consiguiente, estos antígenos virales pueden inducir una inmunomodulación para impulsar al microambiente tumoral hacia un estado inmunosupresor, afectando la funcionalidad de los LT efectores. En relación a esto último, a nivel tisular en el LH, la respuesta inmune parecería estar inhibida localmente en presencia de EBV (Frisan y col. 1995). Además de las células inmunoregulatorias que rodean a las células malignas, las células HRS, bajo la influencia del EBV, producen localmente factores inmunosupresores como IL-10, TGF β y PD-L1 (Marshall y col. 2004; Ishida y col. 2006). Más aún, la presencia de LMP1 fue descrita como inmunosupresora en sí misma (Dukers y col. 2000). Todos estos factores potencialmente inhiben la respuesta de LT específicos contra la célula HRS EBV+.

En el grupo de LDGCB EBV+ también se destacó la expresión de los transcritos de las citoquinas anti-inflamatorias IL-10 y TGF β , donde además se expresaron en menor medida IFN γ y CCL20. Sin embargo, la expresión de estas citoquinas no aparentó estar influenciada por la presencia del virus, a raíz de la falta de diferencias entre ambos grupos. Sumado a esto, no se encontró correlación entre la expresión de ninguno de los genes virales, ni latentes ni líticos, y la expresión de las citoquinas analizadas. Respecto a este punto nuestros resultados son controvertidos, ya que hay estudios *in vitro* y *ex vivo* que mencionan que la expresión de proteínas virales como EBNA1 y LMP1 estimulan la secreción de factores como CCL20 e IL-10 (Lambert y col. 2007; Marshall y col. 2007; Baumforth y col. 2008). Ahora bien, cuando diferenciamos por grupo etario, pudimos observar tres situaciones particulares. Por un lado, en el grupo pediátrico la expresión de transcritos de CCL20 e IL-10 fue inversa a la de EBNA1 y LMP1, lo cual es contrario a lo demostrado para el modelo del LH. Por otro, en el grupo de jóvenes menores de 50 años, la expresión de LMP1 y de los genes líticos presentó correlación inversa con IFN γ y CCL20. Y por último, en los adultos mayores no se observó correlación en absoluto. Mediante el análisis realizado

en este trabajo, no sería posible determinar el motivo por el cual se observan estas diferencias. Sin embargo, cabe destacar que el análisis que se realizó fue a nivel de la expresión de ARNm, por lo cual sería conveniente evaluar la expresión de estas citoquinas a nivel de proteína para poder confirmar nuestros hallazgos, y explicar más acabadamente los alcances de los mismos.

No obstante, se podría hipotetizar que, independientemente del efecto que pueda ejercer el EBV a través de sus genes sobre la expresión de estos factores en el microambiente, habría vías alternativas que los inhiben. Dentro de estas vías, la que involucra a PD-1 podría ser una de las responsables en neutralizar las diferencias que se observaron tanto a nivel de marcadores celulares como a nivel de transcripción de citoquinas. Esta molécula, ampliamente detectada en nuestra serie de LDGCB, estaría generando un entorno inhibitorio mediante el bloqueo de la actividad de LT inducida por estimulación del CD3/CD28, e inhibiendo a su vez toda la cascada de señalización que desencadena esta inducción, lo que perjudicaría la funcionalidad de estas células (Yamamoto y col. 2008; Myklebust y col. 2013).

Finalmente en este estudio, y según disponibilidad de datos clínicos, se evaluó la evolución de los pacientes mediante el análisis de las curvas de supervivencia a partir de su comparación en relación a la edad y a la presencia del virus, a fin de encontrar si estos parámetros influyen en la evolución clínica de los pacientes con LDGCB.

La evolución de los pacientes con linfomas agresivos, como el LDGCB, muestra una supervivencia global disminuida en los mayores con respecto a los jóvenes. Es más, la edad ha sido considerada un factor pronóstico negativo en sí mismo en este tipo de linfoma. La pregunta que surge es porque la edad influye en la supervivencia de los pacientes mayores. El estudio realizado por Coso y col. en adolescentes y jóvenes con LDGCB, no evidenció diferencias en las principales características clínicas e inmunofenotípicas entre este grupo y el de adultos mayores. Es más, la tasa de respuesta al tratamiento fue la misma, siempre que la administración fuera la adecuada (Coso y col. 2014). Sin embargo, no se sabe con certeza si las discrepancias que se observan en el pronóstico radican en la baja tolerancia al tratamiento intensivo que poseen los adultos mayores, o en diferencias en la patogenia que modulan la evolución (Gutierrez y col. 2011). Otros factores a tener en cuenta son las diferencias biológicas o citogenéticas de los LDGCB, dada la heterogeneidad de esta patología. Por ejemplo, se advierte que en los niños predomina el subtipo CG, de mejor pronóstico, que podría en parte explicar

la discrepancia respecto de los adultos, donde predomina el subtipo post-CG, de peor pronóstico (Oschlies y col. 2006). A pesar de estas particularidades, en nuestro análisis no hubo diferencias en la SLE asociadas a la edad, evaluada a los dos años del inicio del tratamiento. Esta varió entre 34% -54% y resultó un poco más baja que lo que describen otros autores, donde observan que la SLE a 3 o 5 años es mayor al 60% (Cairo y col. 2003; Miles y col. 2008; Coiffier y col. 2010), no obstante hay que tener en cuenta que los regímenes de tratamiento que se mencionan en la bibliografía no son homogéneos, lo cual dificulta la precisión de esta comparación. En relación a los trabajos que comparan la SLE en distintos grupos etarios, nuestros resultados, concuerdan con lo visto por Yamauchi y col., quienes tampoco observaron diferencias en la SLE entre un grupo de jóvenes y adultos de Japón (Yamauchi y col. 2007).

Los datos actuales indican que la tasa de sobrevida del LDGCB EBV+ del adulto mayor es inferior que la del LDGCB EBV-. En un estudio Japonés, que comparó 96 casos EBV+ contra 107 EBV-, los pacientes con LDGCB EBV+ mostraron una menor tasa de sobrevida global (24 meses *versus* no alcanzado) que los EBV- (Oyama y col. 2007). Asimismo, un análisis coreano informó que, tras la quimioterapia y quimioinmunoterapia, los casos de LDGCB EBV+ se asociaron con una peor sobrevida global (36 meses *versus* no alcanzado) y libre de progresión (13 meses *versus* 36 meses) en comparación con el LDGCB EBV- (Park y col. 2007). En una serie de pacientes con LDGCB peruanos tratados con quimioterapia sola, los pacientes con LDGCB EBV+ mostraron una menor sobrevida global en comparación con los casos EBV- (7 meses *versus* 47 meses) (Morales y col. 2010). Un estudio sobre ocho pacientes europeos con LDGCB EBV+ mostró que tenían una menor tasa de sobrevida comparados con los pacientes que no tenían el virus (Hoeller y col. 2010). Sobre la base de los datos disponibles, se demuestra entonces que los pacientes con LDGCB EBV+ muestran una peor respuesta a la quimioterapia que su contraparte EBV-.

En la presente serie, el análisis de la sobrevida realizado en los pacientes solo mostró una tendencia a una menor SLE a los 2 años en los pacientes EBV+ frente a lo observado en casos EBV-. A pesar de esto, el reducido número de pacientes nos lleva a considerar estudios futuros con un mayor número de casos para confirmar la tendencia observada, a fin de determinar la potencial utilización del virus como un marcador pronóstico de la enfermedad, así como también para considerar nuevas terapéuticas especialmente dirigidas contra esta entidad en particular.

En la actualidad, no existe un tratamiento específico para el LDGCB EBV+, más allá de la terapia estándar actual para el LDGCB. Existen varios ensayos clínicos en curso, centrados en el tratamiento de los linfomas EBV+ en recaída o refractarios en pacientes inmunocompetentes. Estos estudios utilizan LTc dirigidos contra antígenos específicos EBV (Bollard y col. 2012), la combinación de ganciclovir o valganciclovir y butirato de arginina (Perrine y col. 2007; He y col. 2008; Hierro y col. 2008), y la combinación de bortezomib y ganciclovir (Zou y col. 2007). Es probable que otras terapias novedosas basadas en nuevas estrategias sean necesarias, dado el curso clínico agresivo y la sobrevida disminuida que se le adjudica al LDGCB EBV+.

Finalmente, este es el primer trabajo que evalúa el rol del EBV en la patogénesis del LDGCB en diferentes grupos etarios de nuestro país. La identificación de esta entidad en nuestro país y sus implicancias en la evolución clínica, contribuye en parte a la caracterización de factores pronósticos que permitan diagnosticar adecuadamente a los pacientes, a fin de ofrecer una terapéutica efectiva para cada uno de ellos, lo cual es una de las preocupaciones actuales en la oncología. Es por ello que habría que determinar, mediante estudios clínicos prospectivos con mayor cantidad de pacientes, si es necesaria la implementación de la determinación de EBERs de rutina en el LDGCB, sugerida por varios autores (Dojcinov y col. 2011; Uner y col. 2011; Stuhlmann-Laeisz y col. 2014), a fin de poder diferenciar pacientes en potenciales grupo de riesgo.

El EBV sería necesario, pero no suficiente para causar el desarrollo de ciertos linfomas a los que se asocia, dado que se encuentra presente en un porcentaje determinado de casos. El desarrollo del LDGCB en ausencia de EBV indicaría que el proceso de linfomagénesis sería multifactorial, donde la infección viral proporcionaría solo una parte de los requerimientos necesarios para su desarrollo. De ahí la importancia de poder identificar los factores adicionales del hospedador e incluso factores ambientales que serían necesarios para la transformación maligna. Sin embargo, en aquellos LDGCB a los que el virus sí está asociado, éste cumpliría un rol en todos los grupos etarios, y no solo implicaría pacientes mayores de 50 años. Esto último refuerza la idea de que el criterio de edad debería ser revisado en la próxima versión de la clasificación de la OMS.



CONCLUSIONES

7 CONCLUSIONES

- La expresión diferencial de genes y antígenos virales permitió establecer un valor de corte en el porcentaje de células tumorales EBERs+ para determinar un caso como LDGCB EBV+, y refleja la necesidad de establecer un consenso definitivo sobre este valor para poder precisar la prevalencia de dicha entidad en diferentes poblaciones a nivel internacional.

- La frecuencia del EBV en nuestra serie de LDGCB en pacientes mayores de 50 años fue similar a la descrita en algunas poblaciones de Asia y Latinoamérica, y diferente a lo observado en poblaciones de Europa y Estados Unidos, lo cual coincide con una potencial variación geográfica observada en otras neoplasias EBV+.

- El EBV tendría un rol en la patogénesis del LDGCB EBV+ no sólo en mayores de 50 años, sino también en pacientes pediátricos y adultos jóvenes dado que está presente con una frecuencia semejante en los 3 grupos.

- El perfil de latencia II y/o III presente en los 3 grupos etarios coincide con lo descrito previamente en los estudios basados exclusivamente en adultos mayores de 50 años, y refleja un déficit similar en los 3 grupos en el control del EBV por parte del sistema inmune.

- Se describió por primera vez en LDGCB EBV+ la expresión conjunta de genes y antígenos líticos y de latencia, lo cual sugiere que en estos casos el EBV posee un rol muy activo en el desarrollo tumoral.

- La presencia del EBV y la expresión de sus genes estuvo asociada a un microambiente citotóxico activado, que sin embargo, no sería eficiente en controlar la infección.

- A pesar de ciertas particularidades observadas entre los extremos de la vida para algunos marcadores específicos, la ausencia de diferencias en la composición y funcionalidad del microambiente tumoral en relación con la edad cuestiona la teoría de la inmunosenescencia y su rol en la patogénesis del LDGCB EBV+.

- En todos los casos de LDGCB, EBV+ y EBV- prevaleció el marcador PD-1, que refleja en cierta medida el entorno inhibitorio predominante en el microambiente tumoral.

- Se observó una tendencia a una menor SLE en los casos EBV+, que requeriría ser confirmada en un estudio multicéntrico para corroborar si el virus tiene implicancias en la evolución clínica de los pacientes con LDGCB.

Conclusión final

El LDGCB EBV+ es una entidad que se presenta en pacientes pediátricos, jóvenes y adultos con características virales en común. A su vez, en los 3 grupos etarios no se observan diferencias importantes en la composición y funcionalidad de la población de células T del microambiente. Ambas observaciones cuestionan la hipótesis de la inmunosenescencia como el mecanismo responsable del desarrollo del LDGCB EBV+, y avalan la sugerencia de revisión del criterio de edad definido por la OMS.



REFERENCIAS

8 REFERENCIAS

- 1) Adam, P. y col. (2011). "Epstein-Barr virus-positive diffuse large B-cell lymphomas of the elderly." *Adv Anat Pathol* 18(5): 349-355.
- 2) Ahearne, M. J. y col. (2014). "Expression of PD-1 (CD279) and FoxP3 in diffuse large B-cell lymphoma." *Virchows Arch* 465(3): 351-358.
- 3) Al-Humood, S. y col. (2014). "Genetic and immunohistochemical characterization of Epstein-Barr virus-associated diffuse large B-cell lymphoma." *Acta Haematol* 131(1): 1-10.
- 4) Altmann, M. y col. (2005). "Epstein-Barr virus provides a new paradigm: a requirement for the immediate inhibition of apoptosis." *PLoS Biol* 3(12): e404.
- 5) Altmann, M. y col. (2006). "Transcriptional activation by EBV nuclear antigen 1 is essential for the expression of EBV's transforming genes." *Proc Natl Acad Sci U S A* 103(38): 14188-14193.
- 6) Alvaro, T. y col. (2008). "Tumor-infiltrated immune response correlates with alterations in the apoptotic and cell cycle pathways in Hodgkin and Reed-Sternberg cells." *Clin Cancer Res* 14(3): 685-691.
- 7) Alvaro, T. y col. (2005). "Outcome in Hodgkin's lymphoma can be predicted from the presence of accompanying cytotoxic and regulatory T cells." *Clin Cancer Res* 11(4): 1467-1473.
- 8) Ao, Q. y col. (2014). "A case of EBV positive diffuse large B-cell lymphoma of the adolescent." *Int J Clin Exp Med* 7(1): 307-311.
- 9) Apcher, S. y col. (2010). "Epstein Barr virus-encoded EBNA1 interference with MHC class I antigen presentation reveals a close correlation between mRNA translation initiation and antigen presentation." *PLoS Pathogens* 6: e1001151.
- 10) Arvey, A. y col. (2012). "An atlas of the Epstein-Barr virus transcriptome and epigenome reveals host-virus regulatory interactions." *Cell Host Microbe* 12(2): 233-245.
- 11) Asano, N. y col. (2013). "Epstein-Barr virus-associated natural killer/T-cell lymphomas." *Best Pract Res Clin Haematol* 26(1): 15-21.
- 12) Barber, D. L. y col. (2006). "Restoring function in exhausted CD8 T cells during chronic viral infection." *Nature* 439(7077): 682-687.
- 13) Barros, M. H. y col. (2011). "Tumor microenvironment composition in pediatric classical Hodgkin lymphoma is modulated by age and Epstein-Barr virus infection." *Int J Cancer*.
- 14) Baumforth, K. R. y col. (2008). "Expression of the Epstein-Barr virus-encoded Epstein-Barr virus nuclear antigen 1 in Hodgkin's lymphoma cells mediates Up-regulation of CCL20 and the migration of regulatory T cells." *Am J Pathol* 173(1): 195-204.
- 15) Beltran, B. E. y col. (2011). "Epstein-Barr virus-positive diffuse large B-cell lymphoma of the elderly treated with rituximab, cyclophosphamide, doxorubicin, vincristine, and prednisone: report of two cases from South America." *Leuk Lymphoma* 52(1): 153-156.

- 16) Beltran, B. E. y col. (2011). "EBV-positive diffuse large b-cell lymphoma in young immunocompetent individuals." *Clin Lymphoma Myeloma Leuk* 11(6): 512-516.
- 17) Bentz, G. L. y col. (2011). "Epstein-Barr Virus LMP1 C-terminal Activating Region-3 contributes to LMP1-mediated cellular migration via its interaction with Ubc9." *J Virol*.
- 18) Berglund, M. y col. (2005). "Evaluation of immunophenotype in diffuse large B-cell lymphoma and its impact on prognosis." *Mod Pathol* 18(8): 1113-1120.
- 19) Bollard, C. M. y col. (2012). "T-cell therapy in the treatment of post-transplant lymphoproliferative disease." *Nat Rev Clin Oncol* 9(9): 510-519.
- 20) Bornkamm, G. W. (2009). "Epstein-Barr virus and its role in the pathogenesis of Burkitt's lymphoma: an unresolved issue." *Semin Cancer Biol* 19(6): 351-365.
- 21) Brady, G. y col. (2008). "Epstein-Barr virus and Burkitt lymphoma." *Postgrad Med J* 84(993): 372-377.
- 22) Brauninger, A. y col. (2006). "Molecular biology of Hodgkin's and Reed/Sternberg cells in Hodgkin's lymphoma." *Int J Cancer* 118(8): 1853-1861.
- 23) Burger, J. A. y col. (2009). "The microenvironment in mature B-cell malignancies: a target for new treatment strategies." *Blood* 114(16): 3367-3375.
- 24) Burkitt, D. (1958). "A sarcoma involving the jaws in African children." *Br J Surg* 46(197): 218-223.
- 25) Cabanillas, F. (2010). "Front-line management of diffuse large B cell lymphoma." *Curr Opin Oncol* 22(6): 642-645.
- 26) Cairo, M. S. y col. (2003). "Childhood and adolescent large-cell lymphoma (LCL): a review of the Children's Cancer Group experience." *Am J Hematol* 72(1): 53-63.
- 27) Capello, D. y col. (2003). "Molecular histogenesis of posttransplantation lymphoproliferative disorders." *Blood* 102(10): 3775-3785.
- 28) Carbone, A. y col. (2009). "HIV-associated lymphomas and gamma-herpesviruses." *Blood* 113(6): 1213-1224.
- 29) Carbone, A. y col. (2008). "EBV-associated lymphoproliferative disorders: classification and treatment." *Oncologist* 13(5): 577-585.
- 30) Castillo, J. (2012). *EBV-Positive Diffuse Large B-Cell Lymphoma of the Elderly. Hematologic Cancers: From Molecular Pathobiology to Targeted Therapeutics*. J. Tao y col., Springer Netherlands. 14: 83-98.
- 31) Castillo, J. J. y col. (2011). "Epstein-barr virus-positive diffuse large B-cell lymphoma of the elderly: what we know so far." *Oncologist* 16(1): 87-96.
- 32) Cohen, J. I. (2000). "Epstein-Barr virus infection." *N Engl J Med* 343(7): 481-492.
- 33) Cohen, J. I. y col. (2009). "Epstein-Barr virus-associated lymphoproliferative disease in non-immunocompromised hosts: a status report and summary of an international meeting, 8-9 September 2008." *Ann Oncol* 20(9): 1472-1482.
- 34) Coiffier, B. y col. (2010). "Long-term outcome of patients in the LNH-98.5 trial, the first randomized study comparing rituximab-CHOP to standard CHOP chemotherapy in DLBCL patients: a study by the Groupe d'Etudes des Lymphomes de l'Adulte." *Blood* 116(12): 2040-2045.

- 35) Cool, C. D. y col. (1997). "The malignant lymphomas of Kenya: morphology, immunophenotype, and frequency of Epstein-Barr virus in 73 cases." *Hum Pathol* 28(9): 1026-1033.
- 36) Coso, D. y col. (2014). "Large B-cell lymphomas in adolescents and young adults in comparison to adult patients: a matched-control analysis in 55 patients." *Leuk Lymphoma* 55(8): 1849-1853.
- 37) Crawford, D. H. (2001). "Biology and disease associations of Epstein-Barr virus." *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 356(1408): 461-473.
- 38) Cullen, S. P. y col. (2010). "Granzymes in cancer and immunity." *Cell Death Differ* 17(4): 616-623.
- 39) Chabay, P. y col. (1999). "Prevalencia de la infección por el virus de Epstein-Barr en pacientes pediátricos." *Revista del Hospital de Niños Buenos Aires* 41: 88-91.
- 40) Chabay, P. y col. (2011). "Epstein Barr virus in relation to apoptosis markers and patients' outcome in pediatric B-cell non-Hodgkin lymphoma." *Cancer Lett* 307(2): 221-226.
- 41) Chabay, P. A. y col. (2008). "Pediatric Hodgkin lymphoma in 2 South American series: a distinctive epidemiologic pattern and lack of association of Epstein-Barr virus with clinical outcome." *J Pediatr Hematol Oncol* 30(4): 285-291.
- 42) Chabay, P. A. y col. (2002). "Assessment of Epstein-Barr virus association with pediatric non-hodgkin lymphoma in immunocompetent and in immunocompromised patients in Argentina." *Arch Pathol Lab Med* 126(3): 331-335.
- 43) Chabay, P. A. y col. (2013). "EBV primary infection in childhood and its relation to B-cell lymphoma development: a mini-review from a developing region." *Int J Cancer* 133(6): 1286-1292.
- 44) Chan, K. H. y col. (2001). "Epstein-Barr virus (EBV) infection in infancy." *J Clin Virol* 21(1): 57-62.
- 45) Chang, S. T. y col. (2014). "Epstein-Barr virus is rarely associated with diffuse large B cell lymphoma in Taiwan and carries a trend for a shorter median survival time." *J Clin Pathol* 67(4): 326-332.
- 46) Chemnitz, J. M. y col. (2007). "RNA fingerprints provide direct evidence for the inhibitory role of TGFbeta and PD-1 on CD4+ T cells in Hodgkin lymphoma." *Blood* 110(9): 3226-3233.
- 47) Chen, B. J. y col. (2013). "PD-L1 expression is characteristic of a subset of aggressive B-cell lymphomas and virus-associated malignancies." *Clin Cancer Res* 19(13): 3462-3473.
- 48) Chen, C. J. y col. (2014). "Epidemiology of virus infection and human cancer." *Recent Results Cancer Res* 193: 11-32.
- 49) Chetaille, B. y col. (2009). "Molecular profiling of classical Hodgkin lymphoma tissues uncovers variations in the tumor microenvironment and correlations with EBV infection and outcome." *Blood* 113(12): 2765-3775.
- 50) Chuang, S. S. y col. (2010). "Multicentric primary intestinal EBV-positive diffuse large B cell lymphoma of the elderly presenting with perforation." *Int J Hematol* 91(3): 534-538.

- 51) Daussy, C. y col. (2013). "CD4:CD8 T-Cell Ratio Differs Significantly in Diffuse Large B-Cell Lymphomas from Other Lymphoma Subtypes Independently from Lymph Node Localization." *INTERNATIONAL TRENDS IN IMMUNITY* 1(2): 45-48.
- 52) de Jong, D. y col. (2008). "Inflammatory cells and immune microenvironment in malignant lymphoma." *J Intern Med* 264(6): 528-536.
- 53) de la Cruz-Merino, L. y col. (2012). "Role of immune escape mechanisms in Hodgkin's lymphoma development and progression: a whole new world with therapeutic implications." *Clin Dev Immunol* 2012: 756353.
- 54) De Matteo, E. y col. (2003). "Comparison of Epstein-Barr virus presence in Hodgkin lymphoma in pediatric versus adult Argentine patients." *Arch Pathol Lab Med* 127(10): 1325-1329.
- 55) de Visser, K. E. y col. (2006). "Paradoxical roles of the immune system during cancer development." *Nat Rev Cancer* 6(1): 24-37.
- 56) Delecluse, H. J. y col. (2007). "Epstein Barr virus-associated tumours: an update for the attention of the working pathologist." *J Clin Pathol* 60(12): 1358-1364.
- 57) Dojcinov, S. D. y col. (2011). "Age-related EBV-associated lymphoproliferative disorders in the Western population: a spectrum of reactive lymphoid hyperplasia and lymphoma." *Blood* 117(18): 4726-4735.
- 58) Dukers, D. F. y col. (2000). "Direct immunosuppressive effects of EBV-encoded latent membrane protein 1." *J Immunol* 165(2): 663-670.
- 59) Epstein, M. A. y col. (1964). "Virus Particles in Cultured Lymphoblasts from Burkitt's Lymphoma." *Lancet* 1(7335): 702-703.
- 60) Frisan, T. y col. (1995). "Local suppression of Epstein-Barr virus (EBV)-specific cytotoxicity in biopsies of EBV-positive Hodgkin's disease." *Blood* 86(4): 1493-1501.
- 61) Fritsch, M. K. y col. (2003). "Performance characteristics of a reverse transcriptase-polymerase chain reaction assay for the detection of tumor-specific fusion transcripts from archival tissue." *Pediatr Dev Pathol* 6(1): 43-53.
- 62) Fukuda, M. y col. (2007). "Epstein-Barr virus latent membrane protein 2A mediates transformation through constitutive activation of the Ras/PI3-K/Akt Pathway." *J Virol* 81(17): 9299-9306.
- 63) Fulop, T. y col. (2013). "Human T cell aging and the impact of persistent viral infections." *Front Immunol* 4: 271.
- 64) Fulton, R. B. y col. (2009). "Effects of aging on the adaptive immune response to respiratory virus infections." *Aging Health* 5(6): 775-787.
- 65) Gandhi, M. K. y col. (2007). "Galectin-1 mediated suppression of Epstein-Barr virus specific T-cell immunity in classic Hodgkin lymphoma." *Blood* 110(4): 1326-1329.
- 66) Gibson, S. E. y col. (2009). "Epstein-Barr virus-positive B-cell lymphoma of the elderly at a United States tertiary medical center: an uncommon aggressive lymphoma with a nongerminal center B-cell phenotype." *Hum Pathol* 40(5): 653-661.
- 67) Gooden, M. J. y col. (2011). "The prognostic influence of tumour-infiltrating lymphocytes in cancer: a systematic review with meta-analysis." *Br J Cancer* 105(1): 93-103.

- 68) Gregg, R. y col. (2005). "The number of human peripheral blood CD4+ CD25high regulatory T cells increases with age." *Clin Exp Immunol* 140(3): 540-546.
- 69) Gutierrez-Garcia, G. y col. (2010). "Clinico-biological characterization and outcome of primary nodal and extranodal diffuse large B-cell lymphoma in the rituximab era." *Leuk Lymphoma* 51(7): 1225-1232.
- 70) Gutierrez, A. y col. (2011). "Diffuse large B-cell lymphoma in the older." *Crit Rev Oncol Hematol* 78(1): 59-72.
- 71) Hadrup, S. y col. (2013). "Effector CD4 and CD8 T cells and their role in the tumor microenvironment." *Cancer Microenviron* 6(2): 123-133.
- 72) Hakim, F. T. y col. (2007). "Immunosenescence: deficits in adaptive immunity in the elderly." *Tissue Antigens* 70(3): 179-189.
- 73) Hanahan, D. y col. (2011). "Hallmarks of cancer: the next generation." *Cell* 144(5): 646-674.
- 74) Hans, C. P. y col. (2004). "Confirmation of the molecular classification of diffuse large B-cell lymphoma by immunohistochemistry using a tissue microarray." *Blood* 103(1): 275-282.
- 75) He, Y. y col. (2008). "Interfering with cellular signaling pathways enhances sensitization to combined sodium butyrate and GCV treatment in EBV-positive tumor cells." *Virus Res* 135(1): 175-180.
- 76) Henle, W. y col. (1967). "Herpes-type virus and chromosome marker in normal leukocytes after growth with irradiated Burkitt cells." *Science* 157(3792): 1064-1065.
- 77) Herreros, B. y col. (2008). "Lymphoma microenvironment: culprit or innocent?" *Leukemia* 22(1): 49-58.
- 78) Hierro, L. y col. (2008). "Efficacy and safety of valganciclovir in liver-transplanted children infected with Epstein-Barr virus." *Liver Transpl* 14(8): 1185-1193.
- 79) Higgins, C. D. y col. (2007). "A study of risk factors for acquisition of Epstein-Barr virus and its subtypes." *J Infect Dis* 195(4): 474-482.
- 80) Hippocrate, A. y col. (2011). "Possible role of EBV in breast cancer and other unusually EBV-associated cancers." *Cancer Lett* 305(2): 144-149.
- 81) Hirahara, K. y col. (2006). "The majority of human peripheral blood CD4+CD25highFoxp3+ regulatory T cells bear functional skin-homing receptors." *J Immunol* 177(7): 4488-4494.
- 82) Hjalgrim, H. y col. (2007). "The epidemiology of EBV and its association with malignant disease."
- 83) Hoeller, S. y col. (2010). "Epstein-Barr virus-positive diffuse large B-cell lymphoma in elderly patients is rare in Western populations." *Hum Pathol* 41(3): 352-357.
- 84) Hofscheier, A. y col. (2011). "Geographic variation in the prevalence of Epstein-Barr virus-positive diffuse large B-cell lymphoma of the elderly: a comparative analysis of a Mexican and a German population." *Mod Pathol* 24(8): 1046-1054.
- 85) Howlader, N. y col. (2012). *SEER Cancer Statistics Review, 1975-2009* (Vintage 2009 Populations). Bethesda, MD, National Cancer Institute.

- 86) Hsu, J. L. y col. (2000). "Epstein-barr virus-associated malignancies: epidemiologic patterns and etiologic implications." *Crit Rev Oncol Hematol* 34(1): 27-53.
- 87) Iizasa, H. y col. (2012). "Epstein-Barr Virus (EBV)-associated gastric carcinoma." *Viruses* 4(12): 3420-3439.
- 88) Ishida, T. y col. (2006). "Specific recruitment of CC chemokine receptor 4-positive regulatory T cells in Hodgkin lymphoma fosters immune privilege." *Cancer Res* 66(11): 5716-5722.
- 89) Jaffe, E. S. y col. (2008). "Classification of lymphoid neoplasms: the microscope as a tool for disease discovery." *Blood* 112(12): 4384-4399.
- 90) Jiang, W. y col. (1991). "Co-Localization of the retinoblastoma protein and the Epstein-Barr virus-encoded nuclear antigen EBNA-5." *Experimental Cell Research* 197: 314-318.
- 91) Kasprzak, A. y col. (2007). "Epstein-Barr virus (EBV) infection in B-cell non-Hodgkin's lymphomas in children: virus latency and its correlation with CD21 and CD23 molecules." *Folia Histochem Cytobiol* 45(3): 169-179.
- 92) Kennedy, G. y col. (2003). "Epstein-Barr virus provides a survival factor to Burkitt's lymphomas." *Proc Natl Acad Sci U S A* 100(24): 14269-14274.
- 93) Kim, J. M. y col. (2006). "The role of the transcription factor Foxp3 in the development of regulatory T cells." *Immunol Rev* 212: 86-98.
- 94) Kis, L. L. y col. (2011). "STAT6 signaling pathway activated by the cytokines IL-4 and IL-13 induces expression of the Epstein-Barr virus-encoded protein LMP-1 in absence of EBNA-2: implications for the type II EBV latent gene expression in Hodgkin lymphoma." *Blood* 117(1): 165-174.
- 95) Kis, L. L. y col. (2006). "Cytokine mediated induction of the major Epstein-Barr virus (EBV)-encoded transforming protein, LMP-1." *Immunol Lett* 104(1-2): 83-88.
- 96) Kitagawa, N. y col. (2000). "Epstein-Barr virus-encoded poly(A)(-) RNA supports Burkitt's lymphoma growth through interleukin-10 induction." *EMBO Journal* 19: 6742-6750.
- 97) Klein, E. y col. (2007). "Epstein-Barr virus infection in humans: from harmless to life endangering virus-lymphocyte interactions." *Oncogene* 26(9): 1297-1305.
- 98) Koch, S. y col. (2008). "Multiparameter flow cytometric analysis of CD4 and CD8 T cell subsets in young and old people." *Immun Ageing* 5: 6.
- 99) Komano, J. y col. (1999). "Oncogenic role of Epstein-Barr virus-encoded RNAs in Burkitt's lymphoma cell line Akata." *Journal of Virology* 73: 9827-9831.
- 100) Kulwichit, W. y col. (1998). "Expression of the Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 induces B cell lymphoma in transgenic mice." *Proc Natl Acad Sci U S A* 95: 11963-11968.
- 101) Kupperts, R. (2003). "B cells under influence: transformation of B cells by Epstein-Barr virus." *Nat Rev Immunol* 3(10): 801-812.
- 102) Lages, C. S. y col. (2008). "Functional regulatory T cells accumulate in aged hosts and promote chronic infectious disease reactivation." *J Immunol* 181(3): 1835-1848.
- 103) Lam, N. y col. (2003). "CD40 and its viral mimic, LMP1: similar means to different ends." *Cell Signal* 15(1): 9-16.

- 104) Lambert, S. L. y col. (2007). "Latent membrane protein 1 of EBV activates phosphatidylinositol 3-kinase to induce production of IL-10." *J Immunol* 179(12): 8225-8234.
- 105) Lazuardi, L. y col. (2005). "Age-related loss of naive T cells and dysregulation of T-cell/B-cell interactions in human lymph nodes." *Immunology* 114(1): 37-43.
- 106) Lenz, G. y col. (2008). "Stromal gene signatures in large-B-cell lymphomas." *N Engl J Med* 359(22): 2313-2323.
- 107) Li, J. y col. (2009). "Regulatory T cells and EBV associated malignancies." *Int Immunopharmacol* 9(5): 590-592.
- 108) Li, Q. y col. (1997). "Epstein-Barr virus uses HLA class II as a cofactor for infection of B lymphocytes." *J Virol* 71(6): 4657-4662.
- 109) Liapis, K. y col. (2013). "The microenvironment of AIDS-related diffuse large B-cell lymphoma provides insight into the pathophysiology and indicates possible therapeutic strategies." *Blood* 122(3): 424-433.
- 110) Linderoth, J. y col. (2008). "Genes associated with the tumour microenvironment are differentially expressed in cured versus primary chemotherapy-refractory diffuse large B-cell lymphoma." *Br J Haematol* 141(4): 423-432.
- 111) Longnecker, R. (2000). "Epstein-Barr virus latency: LMP2, a regulator or means for Epstein-Barr virus persistence?" *Adv Cancer Res* 79: 175-200.
- 112) Lorenzetti, M. A. y col. (2010). "Characterization of Epstein Barr virus latency pattern in Argentine breast carcinoma." *PLoS One* 5(10): e13603.
- 113) Luka, J. y col. (1979). "Induction of the Epstein-Barr virus (EBV) cycle in latently infected cells by n-butyrate." *Virology* 94(1): 228-231.
- 114) Luzuriaga, K. y col. (2010). "Infectious mononucleosis." *N Engl J Med* 362(21): 1993-2000.
- 115) Mahot, S. y col. (2003). "A novel function for the Epstein-Barr virus transcription factor EB1/Zta: induction of transcription of the hIL-10 gene." *J Gen Virol* 84(Pt 4): 965-974.
- 116) Marshall, N. A. y col. (2007). "The relationships between Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 and regulatory T cells in Hodgkin's lymphoma." *Exp Hematol* 35(4): 596-604.
- 117) Marshall, N. A. y col. (2004). "Immunosuppressive regulatory T cells are abundant in the reactive lymphocytes of Hodgkin lymphoma." *Blood* 103(5): 1755-1762.
- 118) Masucci, M. G. y col. (1989). "5-Azacytidine up regulates the expression of Epstein-Barr virus nuclear antigen 2 (EBNA-2) through EBNA-6 and latent membrane protein in the Burkitt's lymphoma line rael." *J Virol* 63(7): 3135-3141.
- 119) Mbulaiteye, S. M. y col. (2009). "Sporadic childhood Burkitt lymphoma incidence in the United States during 1992-2005." *Pediatr Blood Cancer* 53(3): 366-370.
- 120) Miles, R. R. y col. (2008). "Pediatric diffuse large B-cell lymphoma demonstrates a high proliferation index, frequent c-Myc protein expression, and a high incidence of germinal center subtype: Report of the French-American-British (FAB) international study group." *Pediatr Blood Cancer* 51(3): 369-374.

- 121) Montes-Moreno, S. y col. (2012). "EBV-positive diffuse large B-cell lymphoma of the elderly is an aggressive post-germinal center B-cell neoplasm characterized by prominent nuclear factor-kB activation." *Mod Pathol* 25(7): 968-982.
- 122) Morales, D. y col. (2010). "Epstein-Barr virus as a prognostic factor in de novo nodal diffuse large B-cell lymphoma." *Leuk Lymphoma* 51(1): 66-72.
- 123) Moreno, F. y col. (2012). Registro Oncopediátrico Hospitalario Argentino. Incidencia 2000-2009. Supervivencia 2000-2007. Tendencia de Mortalidad 1997-2010. Buenos Aires, Instituto Nacional del Cancer.
- 124) Morrison, J. A. y col. (2003). "Epstein-Barr virus latent membrane protein 2A activates beta-catenin signaling in epithelial cells." *J Virol* 77(22): 12276-12284.
- 125) Myklebust, J. H. y col. (2013). "High PD-1 expression and suppressed cytokine signaling distinguish T cells infiltrating follicular lymphoma tumors from peripheral T cells." *Blood* 121(8): 1367-1376.
- 126) Nadal, D. y col. (1994). "Non-Hodgkin's lymphoma in four children infected with the human immunodeficiency virus. Association with Epstein-Barr Virus and treatment." *Cancer* 73(1): 224-230.
- 127) Nakamura, S. y col. (2008). EBV positive diffuse large B-cell of the elderly Lyon, France, IARC Press.
- 128) Nanbo, A. y col. (2002). "Epstein-Barr virus RNA confers resistance to interferon- α -induced apoptosis in Burkitt's lymphoma." *EMBO Journal* 21: 21954-21965.
- 129) Nguyen-Van, D. y col. (2011). "Epstein-Barr virus-positive diffuse large B-cell lymphoma of the elderly expresses EBNA3A with conserved CD8+ T-cell epitopes." *Am J Blood Res* 1(2): 14.
- 130) Niedobitek, G. (1998). "[Epstein-Barr virus infection in the pathogenesis of nasopharyngeal carcinoma]." *Pathologie* 19(5): 337-344.
- 131) Niedobitek, G. y col. (1995). "Heterogeneous expression of Epstein-Barr virus latent proteins in endemic Burkitt's lymphoma." *Blood* 86(2): 659-665.
- 132) Niller, H. H. y col. (2014). "Role of epigenetics in EBV regulation and pathogenesis." *Future Microbiol* 9(6): 747-756.
- 133) Ning, S. y col. (2003). "Interferon regulatory factor 7 regulates expression of Epstein-Barr virus latent membrane protein 1: a regulatory circuit." *J Virol* 77(17): 9359-9368.
- 134) Nirschl, C. J. y col. (2013). "Molecular pathways: coexpression of immune checkpoint molecules: signaling pathways and implications for cancer immunotherapy." *Clin Cancer Res* 19(18): 4917-4924.
- 135) Noda, C. y col. (2011). "Identification and characterization of CCAAT enhancer-binding protein (C/EBP) as a transcriptional activator for Epstein-Barr virus oncogene latent membrane protein 1." *J Biol Chem* 286(49): 42524-42533.
- 136) Novelli, S. y col. (2013). "Epidemiology of lymphoid malignancies: last decade update." *Springerplus* 2(1): 70.
- 137) Ok, C. Y. y col. (2013). "EBV-positive diffuse large B-cell lymphoma of the elderly." *Blood* 122(3): 328-340.

- 138) Ortac, R. y col. (2002). "Prognostic role of natural killer cells in pediatric mixed cellularity and nodular sclerosing Hodgkin's disease." *Anal Quant Cytol Histol* 24(5): 249-253.
- 139) Oschlies, I. y col. (2006). "Diffuse large B-cell lymphoma in pediatric patients belongs predominantly to the germinal-center type B-cell lymphomas: a clinicopathologic analysis of cases included in the German BFM (Berlin-Frankfurt-Munster) Multicenter Trial." *Blood* 107(10): 4047-4052.
- 140) Oudejans, J. J. y col. (1996). "Analysis of major histocompatibility complex class I expression on Reed-Sternberg cells in relation to the cytotoxic T-cell response in Epstein-Barr virus-positive and -negative Hodgkin's disease." *Blood* 87(9): 3844-3851.
- 141) Oudejans, J. J. y col. (1997). "Activated cytotoxic T cells as prognostic marker in Hodgkin's disease." *Blood* 89(4): 1376-1382.
- 142) Ouyang, Q. y col. (2003). "An age-related increase in the number of CD8+ T cells carrying receptors for an immunodominant Epstein-Barr virus (EBV) epitope is counteracted by a decreased frequency of their antigen-specific responsiveness." *Mech Ageing Dev* 124(4): 477-485.
- 143) Oyama, T. y col. (2003). "Senile EBV+ B-cell lymphoproliferative disorders: a clinicopathologic study of 22 patients." *Am J Surg Pathol* 27(1): 16-26.
- 144) Oyama, T. y col. (2007). "Age-related EBV-associated B-cell lymphoproliferative disorders constitute a distinct clinicopathologic group: a study of 96 patients." *Clin Cancer Res* 13(17): 5124-5132.
- 145) Ozsan, N. y col. (2013). "Epstein-Barr virus (EBV) positive diffuse large B cell lymphoma of the elderly-experience of a single center from Turkey." *Pathol Res Pract* 209(8): 471-478.
- 146) Panagopoulos, D. y col. (2004). "Comparative analysis of signal transduction by CD40 and the Epstein-Barr virus oncoprotein LMP1 in vivo." *J Virol* 78(23): 13253-13261.
- 147) Park, S. y col. (2007). "The impact of Epstein-Barr virus status on clinical outcome in diffuse large B-cell lymphoma." *Blood* 110(3): 972-978.
- 148) Parvaneh, N. y col. (2013). "Primary immunodeficiencies predisposed to Epstein-Barr virus-driven haematological diseases." *Br J Haematol* 162(5): 573-586.
- 149) Pawelec, G. (2014). "T-cell immunity in the aging human." *Haematologica* 99(5): 795-797.
- 150) Pereira Suarez, A. L. y col. (2013). "Presence of human papilloma virus in a series of breast carcinoma from Argentina." *PLoS One* 8(4): e61613.
- 151) Perrine, S. P. y col. (2007). "A phase 1/2 trial of arginine butyrate and ganciclovir in patients with Epstein-Barr virus-associated lymphoid malignancies." *Blood* 109(6): 2571-2578.
- 152) Pfaffl, M. W. (2001). "A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR." *Nucleic Acids Res* 29(9): e45.
- 153) Pope, J. H. y col. (1968). "Transformation of foetal human leukocytes in vitro by filtrates of a human leukaemic cell line containing herpes-like virus." *Int J Cancer* 3(6): 857-866.

- 154) Preciado, M. V. y col. (2002). "Epstein Barr virus-associated lymphoma in HIV-infected children." *Pathol Res Pract* 198(5): 327-332.
- 155) Quintanilla-Martinez, L. y col. (2009). "Gray zones around diffuse large B cell lymphoma. Conclusions based on the workshop of the XIV meeting of the European Association for Hematopathology and the Society of Hematopathology in Bordeaux, France." *J Hematop* 2(4): 211-236.
- 156) Quintanilla-Martinez, L. y col. (1997). "Primary non-Hodgkin's lymphoma of the intestine: high prevalence of Epstein-Barr virus in Mexican lymphomas as compared with European cases." *Blood* 89(2): 644-651.
- 157) Reiter, A. y col. (2008). "Recent advances in the understanding and management of diffuse large B-cell lymphoma in children." *Br J Haematol* 142(3): 329-347.
- 158) Rickinson, A. B. y col. (2007). Epstein Barr virus. *Fields Virology*. P. M. H. D M Knipe. Philadelphia, Lippincott Williams & Wilkins. 2: 2655-2700.
- 159) Robertson, E. S. (2010). *Epstein-Barr Virus: Latency and Transformation*, Caister Academic Press.
- 160) Robertson, K. D. y col. (1995). "Transcriptional activation of the Epstein-Barr virus latency C promoter after 5-azacytidine treatment: evidence that demethylation at a single CpG site is crucial." *Mol Cell Biol* 15(11): 6150-6159.
- 161) Rowe, M. y col. (2009). "Burkitt's lymphoma: the Rosetta Stone deciphering Epstein-Barr virus biology." *Semin Cancer Biol* 19(6): 377-388.
- 162) Rozali, E. N. y col. (2012). "Programmed death ligand 2 in cancer-induced immune suppression." *Clin Dev Immunol* 2012: 656340.
- 163) Russell, J. H. y col. (2002). "LYMPHOCYTE-MEDIATED CYTOTOXICITY." *Annual Review of Immunology* 20(1): 323-370.
- 164) Sabattini, E. y col. (2010). "WHO classification of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues in 2008: an overview." *Pathologica* 102(3): 83-87.
- 165) Samanta, M. y col. (2008). "Epstein-Barr virus-encoded small RNA induces IL-10 through RIG-I-mediated IRF-3 signaling." *Oncogene* 27(30): 4150-4160.
- 166) Sanders, R. y col. (2014). "Considerations for accurate gene expression measurement by reverse transcription quantitative PCR when analysing clinical samples." *Anal Bioanal Chem* 406(26): 6471-6483.
- 167) Sandlund, J. T. y col. (1996). "Non-Hodgkin's lymphoma in childhood." *N Engl J Med* 334(19): 1238-1248.
- 168) Schutyser, E. y col. (2003). "The CC chemokine CCL20 and its receptor CCR6." *Cytokine Growth Factor Rev* 14(5): 409-426.
- 169) Shah, W. y col. (2011). "A reversed CD4/CD8 ratio of tumor-infiltrating lymphocytes and a high percentage of CD4(+)FOXP3(+) regulatory T cells are significantly associated with clinical outcome in squamous cell carcinoma of the cervix." *Cell Mol Immunol* 8(1): 59-66.
- 170) Shair, K. H. y col. (2007). "EBV latent membrane protein 1 activates Akt, NFkappaB, and Stat3 in B cell lymphomas." *PLoS Pathog* 3(11): e166.

- 171) Shimoyama, Y. y col. (2009). "Age-related EBV-associated B-cell lymphoproliferative disorders: diagnostic approach to a newly recognized clinicopathological entity." *Pathol Int* 59(12): 835-843.
- 172) Shimoyama, Y. y col. (2006). "Senile Epstein-Barr virus-associated B-cell lymphoproliferative disorders: a mini review." *J Clin Exp Hematop* 46(1): 1-4.
- 173) Shimoyama, Y. y col. (2008). "Age-related Epstein-Barr virus-associated B-cell lymphoproliferative disorders: special references to lymphomas surrounding this newly recognized clinicopathologic disease." *Cancer Sci* 99(6): 1085-1091.
- 174) Siegel, R. y col. (2013). "Cancer statistics, 2013." *CA Cancer J Clin* 63(1): 11-30.
- 175) Sjoblom, A. y col. (1998). "An ATF/CRE element mediates both EBNA2-dependent and EBNA2-independent activation of the Epstein-Barr virus LMP1 gene promoter." *J Virol* 72(2): 1365-1376.
- 176) Steidl, C. y col. (2011). "Molecular pathogenesis of Hodgkin's lymphoma: increasing evidence of the importance of the microenvironment." *J Clin Oncol* 29(14): 1812-1826.
- 177) Stewart, S. y col. (2004). "Epstein-Barr virus-encoded LMP2A regulates viral and cellular gene expression by modulation of the NF-kappaB transcription factor pathway." *Proc Natl Acad Sci U S A* 101(44): 15730-15735.
- 178) Strong, M. J. y col. (2013). "Epstein-Barr virus and human herpesvirus 6 detection in a non-Hodgkin's diffuse large B-cell lymphoma cohort by using RNA sequencing." *J Virol* 87(23): 13059-13062.
- 179) Stuhlmann-Laeisz, C. y col. (2014). "Epstein-Barr virus-negative diffuse large B-cell lymphoma hosts intra- and peritumoral B-cells with activated Epstein-Barr virus." *Virchows Arch*.
- 180) Swerdlow, S. H. y col. (2008). *WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues*. Lyon, France, IARC Press.
- 181) Szekely, L. y col. (1993). "EBNA-5, an Epstein-Barr virus-encoded nuclear antigen, binds to the retinoblastoma and p53 proteins." *Proc Natl Acad Sci U S A* 90: 5455-5459.
- 182) Thorley-Lawson, D. A. (2005). "EBV the prototypical human tumor virus--just how bad is it?" *J Allergy Clin Immunol* 116(2): 251-261; quiz 262.
- 183) Thorley-Lawson, D. A. y col. (2004). "Persistence of the Epstein-Barr virus and the origins of associated lymphomas." *N Engl J Med* 350(13): 1328-1337.
- 184) Tran, H. y col. (2008). "Immunodeficiency-associated lymphomas." *Blood Rev* 22(5): 261-281.
- 185) Tsai, C. N. y col. (1999). "Additive effect of Sp1 and Sp3 in regulation of the ED-L1E promoter of the EBV LMP 1 gene in human epithelial cells." *Virology* 261(2): 288-294.
- 186) Tsao, L. y col. (2007). "The clinicopathologic spectrum of posttransplantation lymphoproliferative disorders." *Arch Pathol Lab Med* 131(8): 1209-1218.
- 187) Tsao, S. W. y col. (2002). "The significance of LMP1 expression in nasopharyngeal carcinoma." *Semin Cancer Biol* 12(6): 473-487.

- 188) Tselis, A. y col. (2006). Epstein Barr Virus. . Infectious disease and therapy. T. a. Francis. New York 38.
- 189) Tumwine, L. K. y col. (2010). "EBV, HHV8 and HIV in B cell non Hodgkin lymphoma in Kampala, Uganda." *Infect Agent Cancer* 5: 12.
- 190) Uner, A. y col. (2011). "The presence of Epstein-Barr virus (EBV) in diffuse large B-cell lymphomas (DLBCLs) in Turkey: special emphasis on 'EBV-positive DLBCL of the elderly'." *APMIS* 119(4-5): 309-316.
- 191) Utsuyama, M. y col. (2009). Age-related Changes in Subpopulations of Peripheral Blood Lymphocytes in Healthy Japanese Population. Handbook on Immunosenescence. T. Fulop y col., Springer Netherlands: 203-218.
- 192) Vaysberg, M. y col. (2008). "Tumor-derived variants of Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 induce sustained Erk activation and c-Fos." *J Biol Chem* 283(52): 36573-36585.
- 193) Vetsika, E. K. y col. (2004). "Infectious mononucleosis and Epstein-Barr virus." *Expert Rev Mol Med* 6(23): 1-16.
- 194) Vouloumanou, E. K. y col. (2012). "Current diagnosis and management of infectious mononucleosis." *Curr Opin Hematol* 19(1): 14-20.
- 195) Wada, N. y col. (2011). "Epstein-barr virus in diffuse large B-Cell lymphoma in immunocompetent patients in Japan is as low as in Western Countries." *J Med Virol* 83(2): 317-321.
- 196) Williams, H. y col. (2005). "The immune response to primary EBV infection: a role for natural killer cells." *Br J Haematol* 129(2): 266-274.
- 197) Xu, Y. y col. (2001). "Prognostic significance of tumour-infiltrating T lymphocytes and T-cell subsets in de novo diffuse large B-cell lymphoma: a multiparameter flow cytometry study." *Br J Haematol* 112(4): 945-949.
- 198) Yamamoto, R. y col. (2008). "PD-1-PD-1 ligand interaction contributes to immunosuppressive microenvironment of Hodgkin lymphoma." *Blood* 111(6): 3220-3224.
- 199) Yamauchi, A. y col. (2007). "Diffuse large B-cell lymphoma in the young in Japan: a study by the Osaka Lymphoma Study Group." *Am J Hematol* 82(10): 893-897.
- 200) Young, L. S. y col. (2003). "Epstein-Barr virus and oncogenesis: from latent genes to tumours." *Oncogene* 22(33): 5108-5121.
- 201) Young, L. S. y col. (2004). "Epstein-Barr virus: 40 years on." *Nat Rev Cancer* 4(10): 757-768.
- 202) Zaidi, M. R. y col. (2011). "The two faces of interferon-gamma in cancer." *Clin Cancer Res* 17(19): 6118-6124.
- 203) Zhang, Y. L. y col. (2010). "Different subsets of tumor infiltrating lymphocytes correlate with NPC progression in different ways." *Mol Cancer* 9: 4.
- 204) Zinkernagel, R. M. y col. (1993). "Effector T-cell induction and T-cell memory versus peripheral deletion of T cells." *Immunol Rev* 133: 199-223.
- 205) Zou, P. y col. (2007). "Bortezomib induces apoptosis of Epstein-Barr virus (EBV)-transformed B cells and prolongs survival of mice inoculated with EBV-transformed B cells." *J Virol* 81(18): 10029-10036.

206) zur Hausen, H. y col. (1978). "Persisting oncogenic herpesvirus induced by the tumour promotor TPA." *Nature* 272(5651): 373-375.



APÉNDICES

9 APÉNDICES

9.1 APÉNDICE A

Tabla A1. Clasificación de las neoplasias de células B de la OMS (2008)

Tabla 1. Clasificación de los linfomas de linfocitos B maduros (OMS 2008).

Clasificación de la OMS 2008: neoplasias de células B maduras.	
Leucemia linfocítica crónica/linfoma de linfocitos pequeños.	Linfoma difuso de células B grandes (LBDCG), sin otra especificación.
Leucemia promielocítica de células B.	Linfoma de células B grandes rico en células T/histiocitos.
Linfoma de la zona marginal de células B esplénico.	LBDCG primario de sistema nervioso central.
Leucemia de células peludas.	LBDCG cutáneo primario, tipo pierna.
Leucemia/linfoma de células B esplénico, no clasificado.	LBDCG EBV positivo de la edad adulta.
Linfoma linfoplasmocítico.	LBDCG asociado con inflamación crónica.
Enfermedad de cadenas pesadas.	Granulomatosis linfomatoide.
Mieloma múltiple.	Linfoma de células B grandes mediastinal primario (tímico).
Plasmacitoma solitario de hueso.	Linfoma de células B grandes intravascular.
Plasmacitoma extraóseo.	Linfoma de células B grandes ALK positivo.
Linfoma de la zona marginal extranodal de tejido linfoide asociado a mucosas (linfoma MALT).	Linfoma plasmablástico.
Linfoma nodal de la zona marginal.	Linfoma de células B originado en enfermedad de Castleman multicéntrica asociada a herpes virus 8.
Linfoma folicular.	Linfoma primario en derrame.
Linfoma folicular pediátrico.	Linfoma de Burkitt.
Linfoma del centro folicular cutáneo primario.	Linfoma de células B, no clasificado, con características intermedias entre linfoma difuso de células B grandes y linfoma de Burkitt.
Linfoma de células del manto.	Linfoma de células B, no clasificado, con características intermedias entre linfoma difuso de células B grandes y linfoma de Hodgkin clásico.

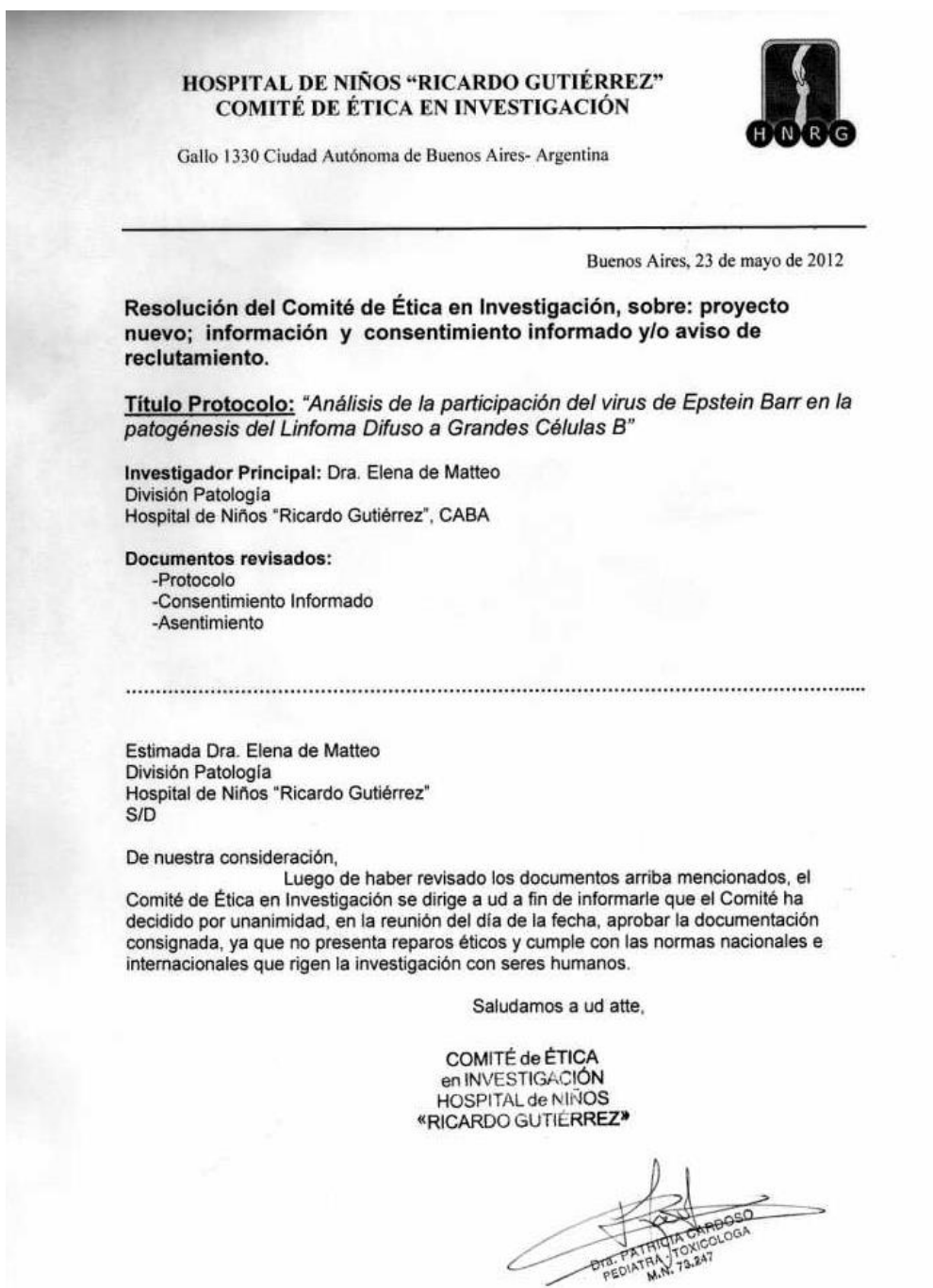
ALK: anaplastic lymphoma kinase.

9.2 APÉNDICE B

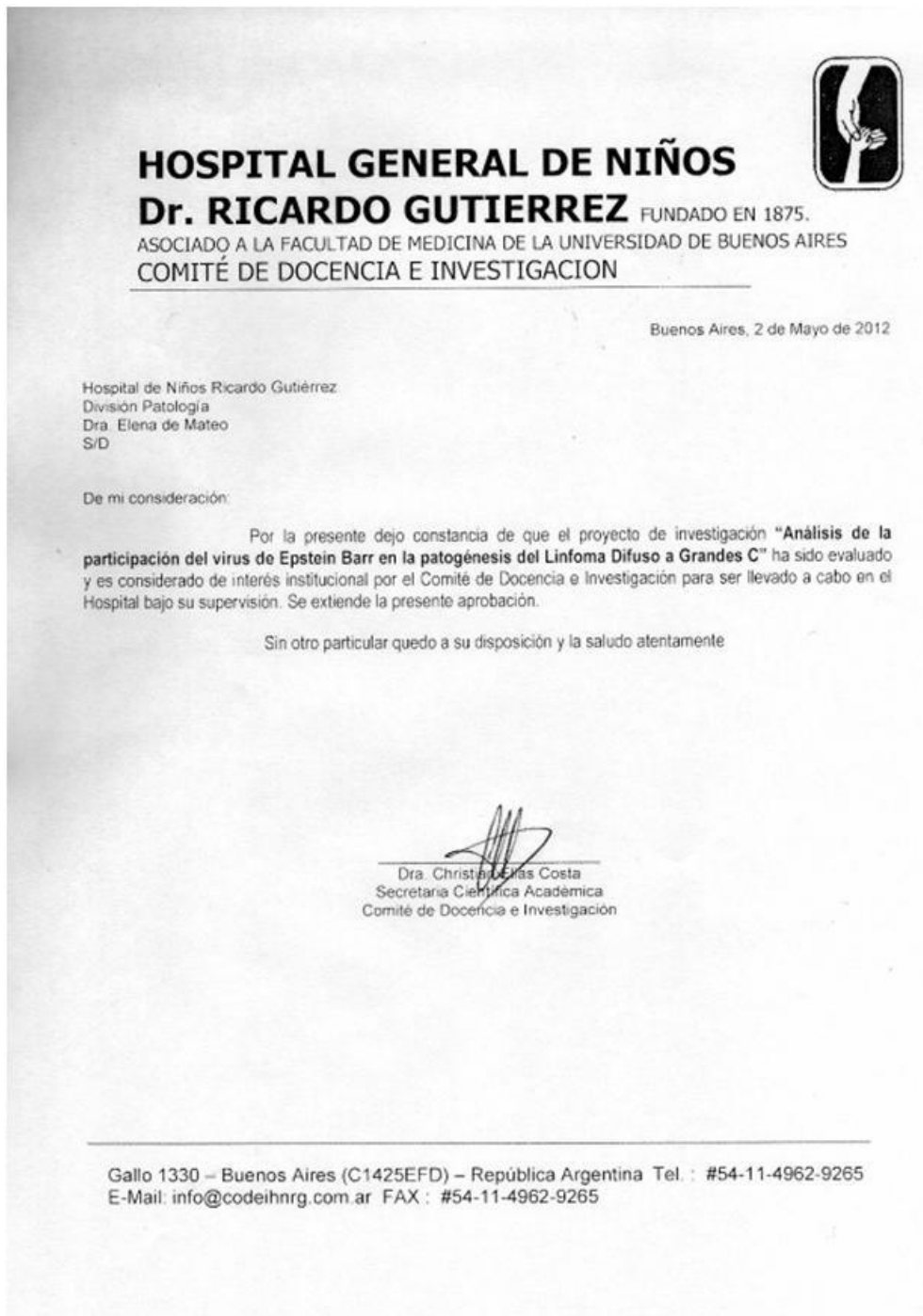
Aprobaciones del Comité de Docencia e Investigación y del Comité de Ética. Modelos de consentimiento y asentimiento informado.

Proyecto: “Análisis de la participación del virus de Epstein Barr en la patogénesis del linfoma difuso a grandes células B”

A. Nota de aprobación del comité de Ética del Hospital de Niños Ricardo Gutiérrez.



B. Nota de aprobación del comité de Docencia e Investigación del Hospital de Niños Ricardo Gutiérrez.



C. Nota de aprobación del comité de Ética de la Academia Nacional de Medicina



Buenos Aires, 13 de abril de 2010

El comité de Ética de los Institutos de la Academia Nacional de Medicina ha evaluado el protocolo "Análisis de la participación del virus de Epstein Barr en la patogénesis del Linfoma Difuso a Grandes Células B y su interacción con el microambiente tumoral", aprobando la realización del estudio a cargo de la Dra. Marina Narbaitz.

La documentación consignada no presenta reparos éticos y cumple con las normas nacionales e internacionales que rigen la investigación en seres humanos.

Asoc. Dr. ROBERTO M. AVANA
PRESIDENTE

Avda. Las Heras 3092
C1425ASU Buenos Aires
Argentina

Tel.: (54.11) 4806-6690 / 3392
Fax: (54.11) 4806-6638
e-mail: acamedbai@acamedbai.org.ar
internet: www.acamedbai.org.ar

Modelo de Consentimiento Informado

“Análisis de la participación del virus de Epstein Barr en la patogénesis del Linfoma Difuso a Grandes Células B”

Investigador Responsable: Dra. Elena De Matteo, Jefa de la División Patología, Hospital de niños R Gutiérrez.

Investigadores Colaboradores: Dra. Paola A. Chabay, Dra. María Victoria Preciado, Bioq. Melina Cohen

Lo invitamos a que su hijo/a participe de un estudio para conocer datos acerca de la infección por el virus de Epstein Barr en linfomas pediátricos. Dicho estudio se llevará a cabo en el Hospital de Niños Ricardo Gutiérrez.

Usted debe decidir si quiere que su hijo/a participe o no del estudio. Lea este consentimiento cuidadosamente y tómese el tiempo que necesite para decidirse. Pregunte a su doctor cualquier duda que tenga sobre el estudio.

La participación de este estudio es voluntaria. Si usted decide que su hijo/a no participe, esto no le traerá ningún perjuicio y su hijo/a seguirá siendo atendido en este hospital igual que antes. Usted será libre de retirarse en cualquier momento del estudio. Cualquier duda que usted tenga del estudio la podrá preguntar a su doctor, a los investigadores responsables, al Comité de Docencia e Investigación o al de Bioética. El estudio así como también las pruebas de laboratorio no tendrá costo ni retribución alguna para el paciente. Oportunamente se le informarán al paciente los resultados del estudio.

¿Qué se me pedirá que haga?

Su doctor le preguntará si usted desea que su hijo/a participe en este estudio. En caso de aceptar, deberá concurrir con su hijo/a al Servicio de Onco-hematología como lo hace habitualmente para los controles de rutina con la frecuencia que le indique el médico tratante.

¿Qué tipo de muestra se analizará?

El análisis se realizará sobre muestras de biopsia ganglionar tanto en fresco como fijadas en formol e incluidas en parafina que han sido obtenidas con anterioridad por cirugía en el momento del diagnóstico y que se encuentran conservadas apropiadamente en la División Patología del Hospital de Niños Ricardo Gutiérrez.

¿Qué es una biopsia ganglionar?

La biopsia ganglionar es un procedimiento por el cual el médico cirujano le extraerá a su hijo/a un trozo de tejido ganglio por cirugía.

¿En qué momento se tomará la muestra?

Solo se trabajará con la muestra de biopsia que ha sido tomada en el momento del diagnóstico del linfoma y que se encuentra adecuadamente conservada en la División Patología del Hospital. En todos los casos, se empleará para este estudio un pequeño fragmento de la muestra de tejido ganglionar. *No se tomará ninguna muestra extra para el propósito de este estudio.*

¿Qué pasa si decido no participar?

Si usted decide que su hijo/a no participe en este estudio, se le seguirán haciendo las extracciones de sangre para los controles de la enfermedad, sin afectar la atención de su hijo/a en esta institución. No se incluirán las muestras en este estudio.

¿Para qué se realiza este estudio?

Para conocer más datos acerca de la enfermedad de su hijo/a y posteriormente poder aplicarlos a la atención de su hijo/a y de los otros niños/as que lo requieran. Los resultados obtenidos en el presente estudio no modificarán EN ABSOLUTO diagnóstico o tratamiento de su enfermedad, solamente se utilizarán como información.

¿Quiénes más participarán del estudio?

Participarán otros niños/as con linfoma que concurran al Servicio de Hematología del Hospital de Niños Ricardo Gutiérrez.

¿La información recogida es confidencial?

Si usted consiente en formar parte de este estudio, cualquier registro médico correspondiente podrá ser leído por los investigadores o los Comités de Ética y de Investigación y Docencia para controlar que el mismo sea llevado a cabo correctamente. Mediante la firma del formulario de Consentimiento Informado Escrito, usted está autorizando para que esto se pueda realizar. La información recogida durante el estudio será almacenada en una computadora, pero el nombre del paciente no aparecerá en ninguno de los registros. Solo su médico conocerá qué información está relacionada con el paciente. Los resultados del estudio pueden ser publicados en la literatura médica, pero se mantendrá la confidencialidad en el manejo de los datos dado que la identidad de los pacientes no será revelada según la Ley N° 25.326.

He leído y entiendo este consentimiento informado. Acepto voluntariamente participar de este estudio. Entiendo que debo concurrir con mi hijo/a al Hospital de Niños Ricardo Gutiérrez para el diagnóstico de su enfermedad según le indique el médico tratante y que la muestra de biopsia ganglionar extraída a mi hijo puede ser utilizada para el estudio de infección por el virus de Epstein Barr.

“Con la firma de este consentimiento informado Usted no renuncia a los derechos que posee de acuerdo con el Código Civil y las leyes argentinas en materia de responsabilidad civil por daños.”

Nombre del paciente

Firma del padre, madre o tutor / Aclaración / N° y Tipo de Documento / Fecha

Firma del médico investigador/ Matrícula/ Aclaración / N° y Tipo de Documento / Fecha

Firma del testigo / Aclaración / N° y Tipo de Documento / Fecha

Modelo de Asentimiento para pacientes pediátricos

“Análisis de la participación del virus de Epstein Barr en la patogénesis del Linfoma Difuso a Grandes Células B”

Te invitamos a participar de un trabajo de investigación para estudiar la infección por el virus de Epstein Barr en niños. Este estudio se hace para saber un poco más de la enfermedad que tenés. De este estudio participarán también otros niños y niñas que están infectados por el este virus y que se atienden en este Hospital.

Si querés, podés participar de este estudio. Si no querés, esto no te traerá ningún problema y te van a seguir atendiendo en este hospital como hasta ahora. Además, podés dejar de participar cuando quieras. Tu mamá/papá/tutor está/n de acuerdo con que participes.

Para este estudio, lo único que tendrás que hacer es venir al Hospital como siempre. Si el médico piensa que es necesario estudiar cómo están tus ganglios y te hacen una biopsia, un pedacito de la misma biopsia se va a estudiar también en el laboratorio.

Este estudio es confidencial. Por eso, tu nombre no va a figurar en ningún lado. Los datos serán almacenados en una computadora y solamente el médico que te atiende conocerá tu nombre.

Nombre del paciente/ firma

Firma del médico / Aclaración / Número y Tipo de Documento / Fecha

Firma del testigo / Aclaración / Número y Tipo de Documento / Fecha

9.3 APÉNDICE C

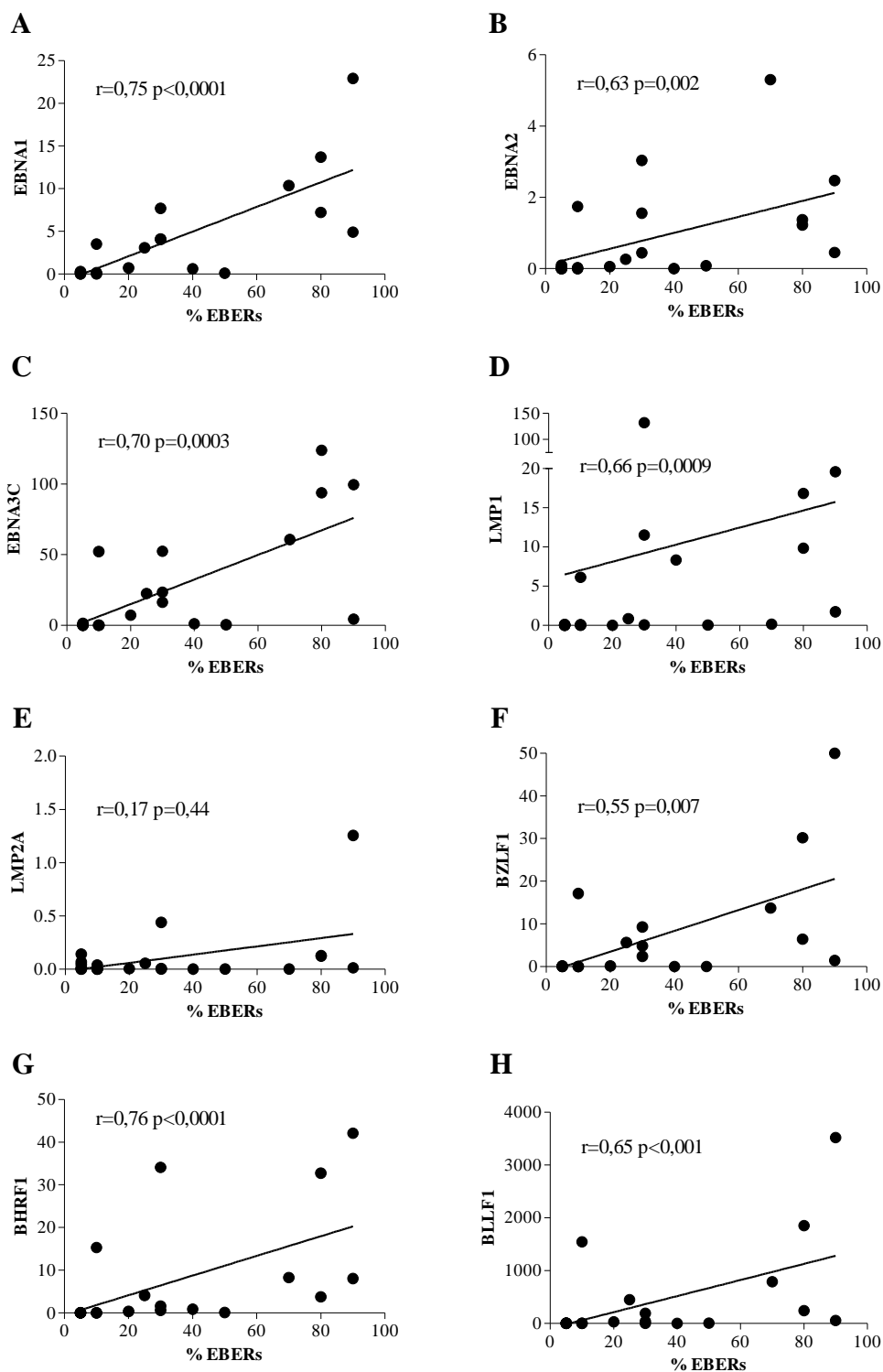


Figura A1. Correlación entre el porcentaje de células tumorales EBERS+ y la expresión de genes virales de latencia: A) EBNA1, B) EBNA2, C) EBNA3C, D) LMP1 y E) LMP2A; y de ciclo lítico: F) BZLF1, G) BHRF1 y H) BLLF1. El análisis se realizó en todos los casos de LDGCB que presentaron expresión de los transcritos EBERS en las células tumorales. Coeficiente de correlación de Spearman

9.4 APÉNDICE D

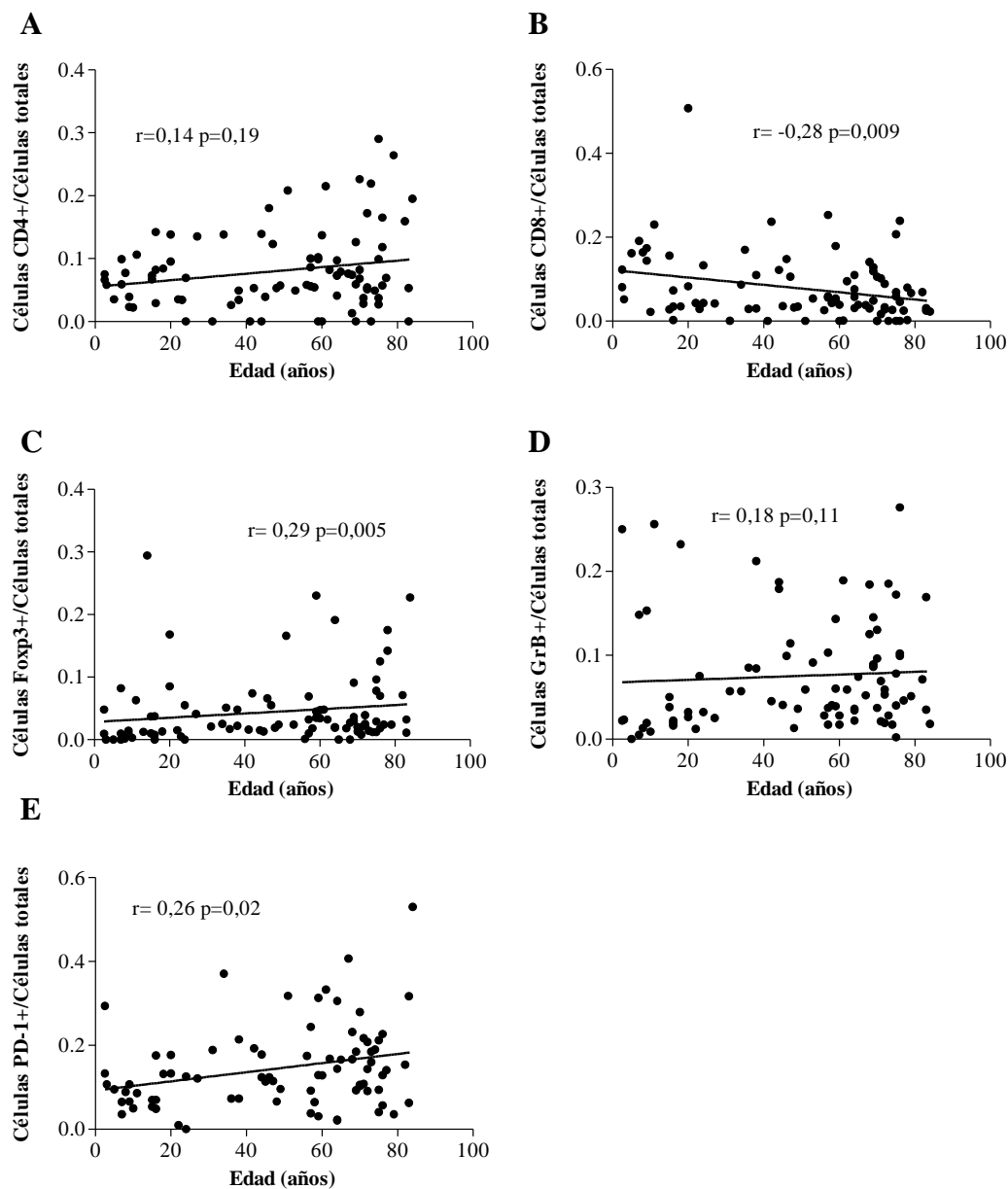


Figura A2. Correlación entre el recuento de las subpoblaciones del microambiente y la edad de los LDGC. A) CD4+, B) CD8+, C) Foxp3+, D) GrB+ y E) PD-1+. Cuantificación: linfocitos positivos para cada marcador/células totales (1000x). Coeficiente de correlación de Spearman

9.5 APÉNDICE E

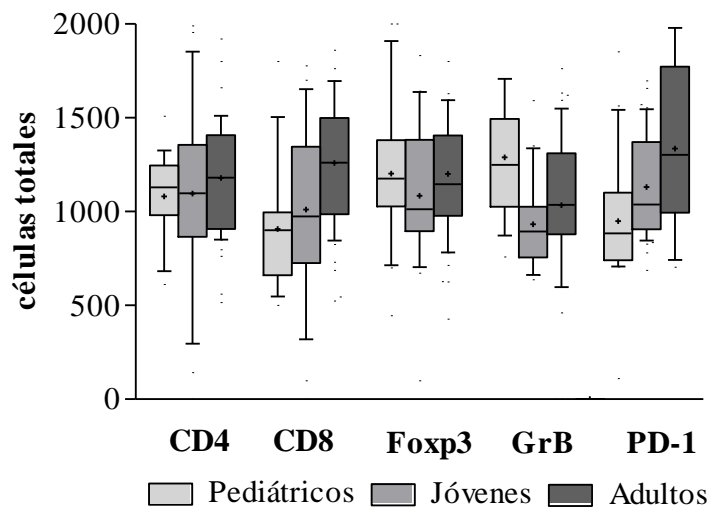


Figura A3. Cuantificación del número de células totales en la inmunomarcación de CD4, CD8, Foxp3, GrB y PD-1 en pacientes pediátricos, adultos menores y mayores de 50 años con LDGCB. Los resultados se representan en diagramas de cajas. La línea horizontal dentro de cada caja indica la mediana. Las líneas horizontales por fuera de las cajas representan los percentiles 5 y 95. La media se indica como +. Cuantificación: células totales contadas para cada marcador (1000x).

9.6 APÉNDICE F

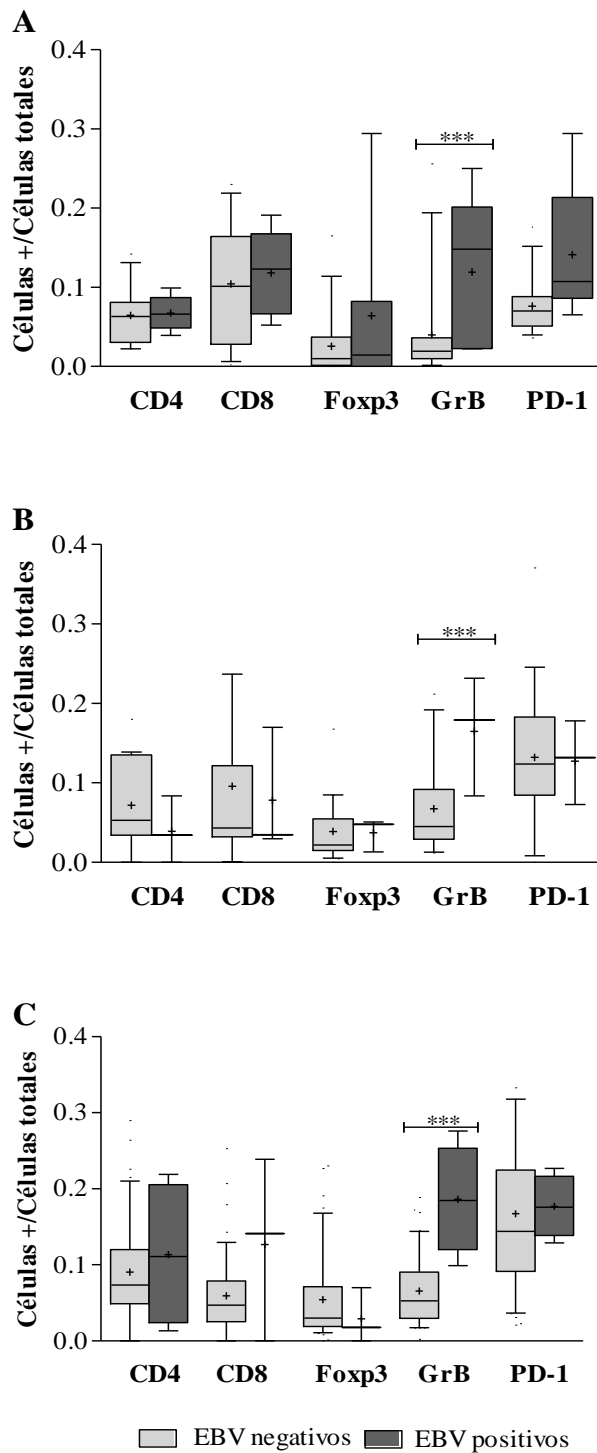


Figura A4. Cuantificación de células CD4, CD8, Foxp3, GrB y PD-1 positivas en pacientes A) pediátricos, B) menores de 50 años y C) mayores de 50 años con LDGCB EBV+ y EBV- Los resultados se representan en diagramas de cajas. La línea horizontal dentro de cada caja indica la mediana. Las líneas horizontales por fuera de las cajas representan los percentiles 5 y 95. La media se indica como +. Cuantificación: linfocitos positivos para cada marcador/células totales (1000x). ***: $p < 0,001$. Test de Mann-Whitney

9.7 APÉNDICE G

Tabla A2.1. Coeficientes de correlación (r) entre la expresión de genes virales (latentes y líticos) y los recuentos de las subpoblaciones celulares del microambiente en todos los casos de LDGCB

	CD4	CD8	Foxp3	GrB	PD-1
EBNA1	-0,47 p= 0,03	0,03	-0,36	0,17	0,22
EBNA2	-0,49 p= 0,02	0,19	-0,36	0,44 p= 0,04	0,03
EBNA3C	-0,50 p= 0,02	0,15	-0,19	0,27	0,16
LMP1	-0,60 p= 0,003	0,15	-0,49 p= 0,02	0,01	0,04
LMP2A	-0,06	-0,10	0,09	0,40	0,13
BZLF1	-0,45 p= 0,04	0,22	-0,09	0,45 p= 0,04	-0,02
BHRF1	-0,51 p=0,02	0,18	-0,30	0,35	0,13
BLLF1	-0,40 p=0,04	0,28	-0,11	0,54 p= 0,01	0,10

Se incluyen todos los casos, sin distinción por edad. Se indican los valores de p de las correlaciones que presentaron significancia estadística, el resto de las correlaciones no fueron significativas $p>0,05$; coeficiente de correlación de Spearman.

Tabla A2.2. Coeficientes de correlación (r) entre la expresión de genes virales (latentes y líticos) y los recuentos de las subpoblaciones celulares del microambiente en los casos de LDGCB discriminados por edad*Pediátricos*

	CD4	CD8	Foxp3	GrB	PD-1
EBNA1	2,5E ⁻¹⁹	0,25	-0,31	0,11	0,16
EBNA2	0,07	0,54	-0,15	0,45	-0,09
EBNA3C	-0,11	0,14	-0,34	0,07	0,30
LMP1	0,18	2,5E ⁻¹⁹	-0,70	-0,29	-0,09
LMP2A	0,80	0,80	0,20	0,53	-0,45
BZLF1	-0,04	0,40	-0,15	0,41	2,5E ⁻¹⁹
BHRF1	-0,07	-0,04	-0,47	2,5E ⁻¹⁹	0,31
BLLF1	0,14	0,57	-0,13	0,46	2,5E ⁻¹⁹

Se indican los valores de p de las correlaciones que presentaron significancia estadística, el resto de las correlaciones no fueron significativas $p>0,05$; coeficiente de correlación de Spearman.

Adultos menores de 50 años

	CD4	CD8	Foxp3	GrB	PD-1
EBNA1	-0,11	0,40	0,60	-0,50	0,50
EBNA2	-0,63	-0,60	0,40	-0,50	0,50
EBNA3C	-0,63	0,40	1,00	-0,50	0,50
LMP1	-0,63	0	0,80	-0,50	0,50
LMP2A	0,32	0,60	-0,40	1,00	0,50
BZLF1	-0,63	0	0,80	-0,50	0,50
BHRF1	-0,63	0	0,80	-0,50	0,50
BLLF1	-0,63	0	0,80	-0,50	0,50

Se indican los valores de p de las correlaciones que presentaron significancia estadística, el resto de las correlaciones no fueron significativas $p > 0,05$; coeficiente de correlación de Spearman.

Adultos mayores de 50 años

	CD4	CD8	Foxp3	GrB	PD-1
EBNA1	-0,35	-0,15	-0,35	0,34	0,55
EBNA2	-0,40	0,16	-0,60	0,52	0,30
EBNA3C	-0,30	0,17	-0,11	0,54	0,37
LMP1	-0,50	0,16	-0,32	0,12	0,58
LMP2A	-0,35	-0,25	-0,37	0,15	0,28
BZLF1	-0,16	0,49	-0,22	0,76 p=0,01	0,15
BHRF1	-0,25	0,31	-0,40	0,64 p= 0,04	0,33
BLLF1	0,03	-0,33	-0,12	0,76 p= 0,009	0,29

Se indican los valores de p de las correlaciones que presentaron significancia estadística, el resto de las correlaciones no fueron significativas $p > 0,05$; coeficiente de correlación de Spearman.

9.8 APÉNDICE H

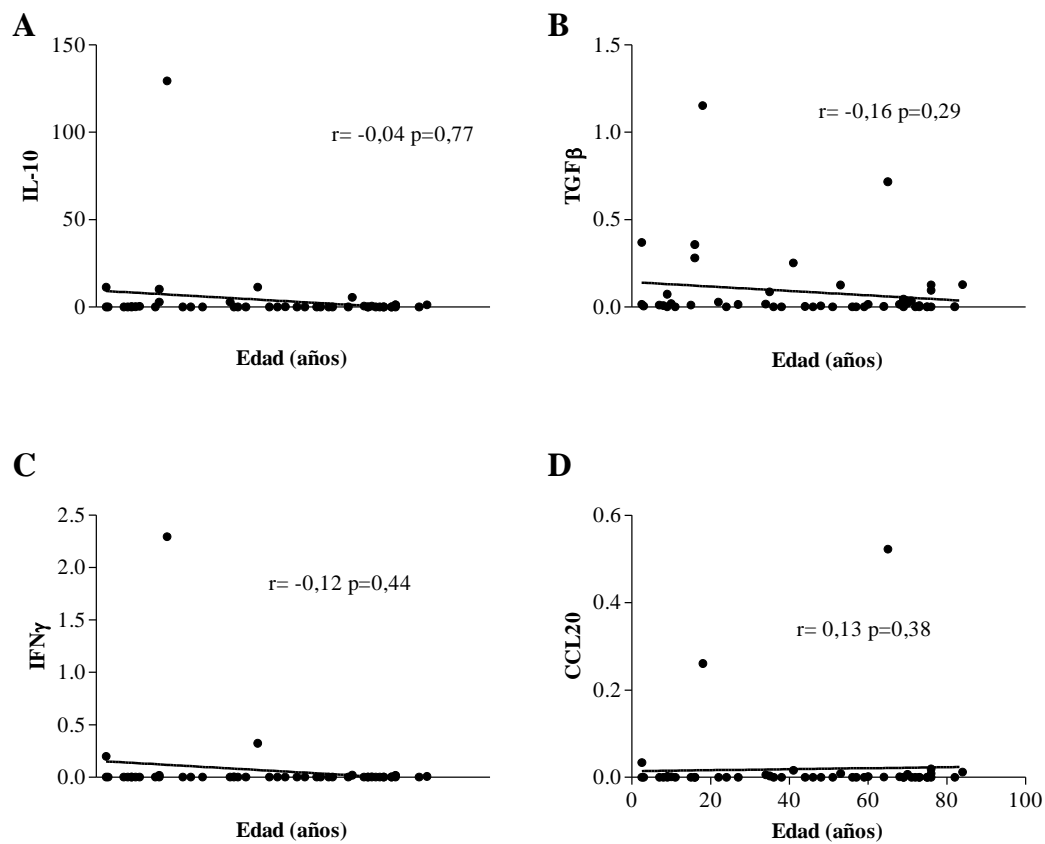


Figura A5. Correlación entre la expresión de transcritos de citoquinas y quimioquinas del microambiente y la edad de los LDGCB. A) IL-10, B) TGF β , C) IFN γ y D) CCL20. Cuantificación: expresión normalizada frente a HPRT y calibrada frente a la expresión determinada de cada una de las citoquinas y quimioquinas en CMSP estimuladas 4hs con ionomicina-PMA. Coeficiente de correlación de Spearman.

9.9 APÉNDICE I

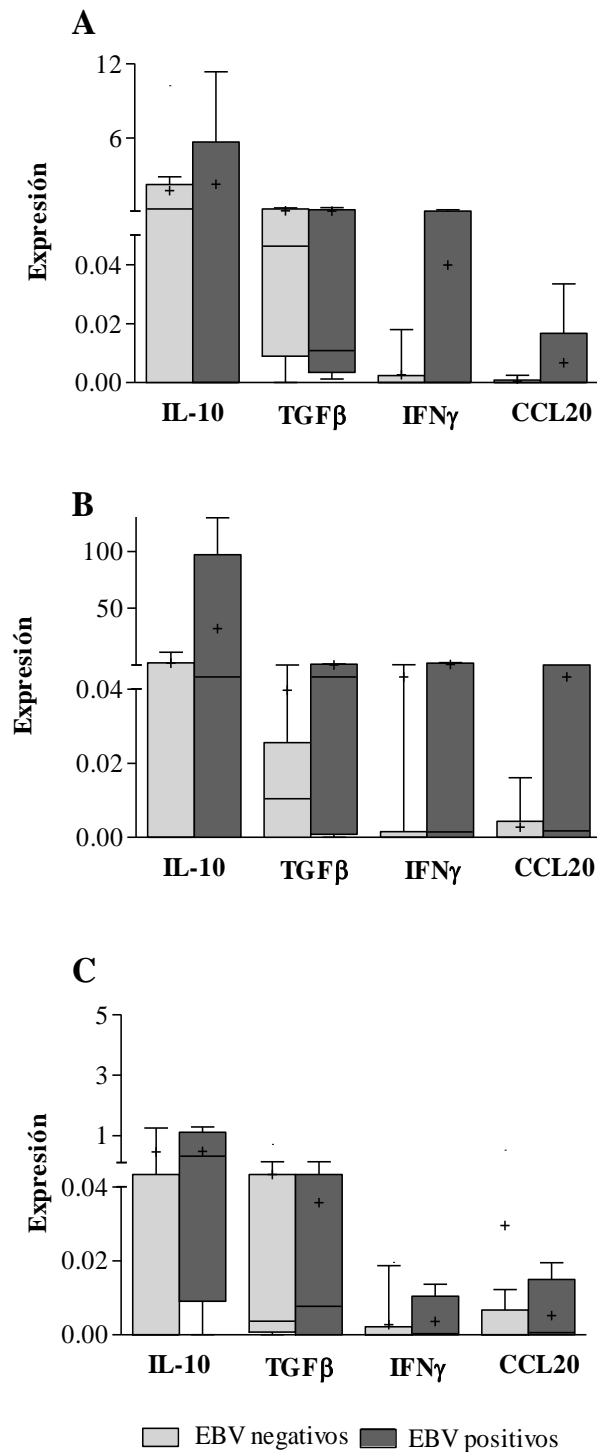


Figura A6. Cuantificación relativa de transcritos de IL-10, TGFβ, IFNγ y CCL20 en pacientes A) pediátricos, B) menores de 50 años y C) mayores de 50 años con LDGCB EBV+ y EBV-. Los resultados se representan en diagramas de cajas. La línea horizontal dentro de cada caja indica la mediana. Las líneas horizontales por fuera de las cajas representan los percentiles 5 y 95. La media se indica como +. La expresión fue normalizada frente a HPRT y calibrada frente a la expresión determinada en CMSP estimuladas 4hs con ionomicina-PMA.

9.10 APÉNDICE J

Tabla A3.1. Coeficientes de correlación (r) entre la expresión de genes virales (latentes y líticos) y la expresión de transcritos de IL-10, TGF β , IFN γ y CCL20 del microambiente en todos los casos de LDGCB

	IL-10	TGF β	IFN γ	CCL20
EBNA1	-0,22	-0,07	-0,19	-0,17
EBNA2	-0,12	-0,10	-0,13	-0,15
EBNA3C	-0,28	-0,13	-0,19	-0,23
LMP1	-0,18	0,01	-0,23	-0,16
LMP2A	0,20	0,02	0,11	0,15
BZLF1	-0,25	-0,23	-0,15	-0,23
BHRF1	-0,21	-0,050	-0,12	0,15
BLLF1	-0,08	-0,04	-0,05	-0,09

Se incluyen todos los casos, sin distinción por edad. Se indican los valores de p de las correlaciones que presentaron significancia estadística, el resto de las correlaciones no fueron significativas $p>0,05$; coeficiente de correlación de Spearman.

Tabla A3.2. Coeficientes de correlación (r) entre la expresión de genes virales (latentes y líticos) y la expresión de transcritos de IL-10, TGF β , IFN γ y CCL20 del microambiente en los casos de LDGCB discriminados por edad*Pediátricos*

	IL-10	TGF β	IFN γ	CCL20
EBNA1	-0,78 p=0,04	-0,61	-0,41	-0,76
EBNA2	-0,32	-0,63	-0,21	-0,52
EBNA3C	-0,74	-0,39	-0,20	-0,58
LMP1	-0,78 p=0,04	-0,43	-0,61	-0,80 p=0,03
LMP2A	0,37	-0,53	-0,26	-0,39
BZLF1	-0,39	-0,67	-0,21	-0,52
BHRF1	-0,74	-0,36	-0,20	-0,58
BLLF1	-0,37	-0,64	-0,20	-0,58

Se indican los valores de p de las correlaciones que presentaron significancia estadística, el resto de las correlaciones no fueron significativas $p>0,05$; coeficiente de correlación de Spearman.

Adultos menores de 50 años

	IL-10	TGFβ	IFNγ	CCL20
EBNA1	-0,56	-0,80	-0,87	-0,87
EBNA2	-0,41	-0,80	-0,87	-0,87
EBNA3C	-0,67	-0,70	-0,82	-0,82
LMP1	-0,67	-0,90	-0,98 p=0,02	-0,98 p=0,02
LMP2A	0,46	0,70	0,62	0,62
BZLF1	-0,67	-0,90	-0,98 p=0,02	-0,98 p=0,02
BHRF1	-0,67	-0,90	-0,98 p=0,02	-0,98 p=0,02
BLLF1	-0,67	-0,90	-0,98 p=0,02	-0,98 p=0,02

Se indican los valores de p de las correlaciones que presentaron significancia estadística, el resto de las correlaciones no fueron significativas $p>0,05$; coeficiente de correlación de Spearman.

Adultos mayores de 50 años

	IL-10	TGFβ	IFNγ	CCL20
EBNA1	0,19	0,04	-0,20	0,11
EBNA2	0,05	-0,16	-0,18	-0,02
EBNA3C	-0,02	-0,18	-0,33	-0,13
LMP1	0,35	0,29	0,07	0,29
LMP2A	-0,02	-0,05	-0,30	0,02
BZLF1	-0,27	-0,47	-0,38	-0,33
BHRF1	0,01	-0,18	-0,20	-0,06
BLLF1	0,06	-0,13	-0,16	-0,06

Se indican los valores de p de las correlaciones que presentaron significancia estadística, el resto de las correlaciones no fueron significativas $p>0,05$; coeficiente de correlación de Spearman.