

**INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL  
ESCUELA SUPERIOR DE MEDICINA  
SECCIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN**

**“Estudio de los mecanismos moleculares en el proceso  
oncogénico del linfoma de Hodgkin mediante identificación de la  
expresión de los genes Pax5 y Notch1,  
y la participación del virus de Epstein-Barr en pacientes  
pediátricos”**

**TESIS**

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE**

**MAESTRIA EN CIENCIAS DE LA SALUD**

**PRESENTA:**

**Ana Elena Sánchez Aldana**

**DIRECTORES:**

**Dra. Icela Palma Lara  
Dr. José Arellano Galindo**

**México, D.F., octubre de 2011**



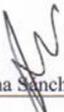


**INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL**  
**SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO**

*CARTA CESIÓN DE DERECHOS*

En la Ciudad de México el día 19 del mes septiembre del año 2011, el que suscribe Sánchez Aldana Ana Elena alumna del Programa de Maestría en Ciencias de la Salud con número de registro A100696 adscrito a La Escuela Superior De Medicina, manifiesta que es autor intelectual del presente trabajo de Tesis bajo la dirección de Dra. Icela Palma Lara, Dr. José Arellano Galindo y cede los derechos del trabajo intitulado "Estudio de los mecanismos moleculares en el proceso oncogénico del linfoma de Hodgkin mediante identificación de la expresión de los genes Pax5 y Notch1, y la participación del virus de Epstein-Barr en pacientes pediátricos", al Instituto Politécnico Nacional para su difusión, con fines académicos y de investigación.

Los usuarios de la información no deben reproducir el contenido textual, gráficas o datos del trabajo sin el permiso expreso del autor y director del trabajo. Este puede ser obtenido escribiendo a la siguiente dirección [anaelesalda@yahoo.com.mx](mailto:anaelesalda@yahoo.com.mx). Si el permiso se otorga, el usuario deberá dar el agradecimiento correspondiente y citar la fuente del mismo.

  
\_\_\_\_\_  
Ana Elena Sánchez Aldana

Nombre y firma

Proyecto financiado:

ESM-IPN SIP: 20091798; 20101275; 20113149

HIM/2008/031

## INDICE

	Página	
TABLAS	6	Con formato: Fuente: 11 pts
FIGURAS	7	Con formato: Fuente: 10 pts
<del>ABSTRACTRESUMEN</del>	8	Con formato: Fuente: 10 pts
<del>ABSTRACTRESUMEN</del>	9	Con formato: Fuente: 10 pts
INTRODUCCIÓN		Con formato: Fuente: 10 pts
Linfoma de Hodgkin		Con formato: Fuente: 9 pts
Descripción	10	Con formato: Fuente: 9 pts
Histopatología	11	Con formato: Fuente: 9 pts
Inmunofenotipo	13	Con formato: Fuente: 9 pts
PAX5	14	Con formato: Fuente: 9 pts
NOTCH1	15	Con formato: Fuente: 9 pts
Epstein-Barr		Con formato: Fuente: 10 pts
Descripción	16	Con formato: Fuente: 9 pts
Ciclo de vida	20	Con formato: Fuente: 9 pts
Genes latencia	21	Con formato: Fuente: 9 pts
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	23	Con formato: Fuente: 10 pts
JUSTIFICACIÓN	25	Con formato: Fuente: 10 pts
HIPÓTESIS	24	Con formato: Fuente: 10 pts
OBJETIVOS	24	Con formato: Fuente: 10 pts
MATERIAL Y MÉTODOS	25	Con formato: Fuente: 10 pts
RESULTADOS	42	Con formato: Fuente: 10 pts
DISCUSIÓN	57	Con formato: Fuente: 10 pts
<del>CONCLUSIÓN</del>	60	Con formato: Fuente: 10 pts
<del>PERSPECTIVAS</del>	61	Con formato: Fuente: 10 pts
REFERENCIAS	62	Con formato: Fuente: 10 pts
	57	Con formato: Fuente: 11 pts

## TABLAS

	Págs.
1. Inmunofenotipo de las células de Reed-Sternberg	14
2. Tipos de latencia del virus de Epstein-Barr	20
3. Determinación de las características del grupo caso y control	26
4. Determinación de las mezclas del VEB	26
5. Listado de anticuerpos utilizados en Inmunohistoquímica	29
6. Características de los anticuerpos utilizados en inmunofluorescencia	31
7. Preparación de soluciones utilizadas	32
8. Cuantificación de células de RS positivas	32
9. Cuantificación del virus de Epstein-Barr	33
10. Oligonucleótidos de los genes del virus de Epstein-Barr	35
11. Materiales utilizados en PCR	39
12. Condiciones de PCR	40
13. Condiciones de amplificación	41
14. Distribución por sexo de grupo caso y control	42
15. Distribución por edad en ambos sexos	44
16. Distribución por variedad histológica	44
17. Localización de ganglios incluidos en el estudio	45
18. Inmunofenotipo de las células de RS en el LHc	46
19. Expresión de PAX5 en células de RS	47
20. Expresión de NOTCH1 en células de RS	48
21. Características histológicas de los casos positivos a EBV	51
22. Cuantificación de células de RS positivas a EBV por IHQ	51
23. Características histológicas de los casos positivos a EBV por PCR	52
24. Cuantificación de células de RS positivas a EBV por ISH	54
25. Características histológicas de los casos positivos a EBERs	55
26. Genotipificación del virus de Epstein-Barr	56

## FIGURAS

	Págs.
1. Representación de la inhibición de la expresión de genes del linaje B por interacción del complejo de transcripción de Notch1 en las células de RS.	16
2. Esquema que representa el genoma del virus de Epstein-Barr	18
3. Distribución mundial de los subtipos del virus de Epstein-Barr.	19
4. Diagrama de la estrategia metodológica	27
5. Fotografía de microarreglo de tejido	28
6. Determinación de la integridad del ADN mediante la amplificación del gen $\beta$ -globina	35
7. Amplificación del gen LMP1 en gel de agarosa al 2%	38
8. Secuenciación de LMP1	39
9. BLAST con la cepa B95-8	37
10. Distribución por sexo	42
11. Distribución por edad de ambos sexos	43
12. Distribución por variedad histológica	44
13. Microfotografía de inmunofenotipo de LHc	46
14. Composición de microfotografía de LHc para PAX5 por IHQ e inmunofluorescencia	47
15. Composición de microfotografía de LHc para NOTCH1 por IHQ e Inmunofluorescencia	48
16. Inmunofluorescencia de NOTCH1/PAX5	49
17. Detección del virus de Epstein-Barr (LMP1) por Inmunohistoquímica	50
18. Detección del EBV mediante amplificación de LMP1 y LMP2	52
19. Detección de EBER's (EBV) por hibridación in situ	53
20. Positividad del virus de Epstein-Barr por ISH	54

## 1 RESUMEN

El linfoma de Hodgkin clásico (LHc) es una neoplasia del tejido linfoide que se distingue por la presencia de células neoplásicas llamadas células de Reed-Sternberg (RS). En México esta ~~neoplásia~~neoplasia se encuentra dentro de las 10 primeras causas de muerte infantil por la falta de un diagnóstico eficaz y oportuno. En el 30-40% de los casos el LHc se ha asociado a la infección del virus de Epstein-Barr (VEB), el cual permanece en fase de latencia en los linfocitos y expresa genes involucrados en la transformación, proliferación e inmortalización de las células de RS. El mecanismo por el cual las mezclas del VEB intervienen o no en la expresión de genes del desarrollo de las células linfoides que originan a la célula de RS aún no es claro. En un esfuerzo por identificar la participación de PAX5, NOTCH1 así como los genes de latencia del VEB en el proceso oncogénico del LHc se analizaron 58 muestras de ganglio linfático de pacientes pediátricos mexicanos. Mediante Inmunohistoquímica e inmunofluorescencia se identificó la expresión del inmunofenotipo, NOTCH1, PAX5 y LMP1 en cada caso. La detección y genotipificación del VEB se realizó por PCR e hibridación in situ. Se detectó la expresión de NOTCH1 en el 85.3% de los casos de LHc, siendo la esclerosis nodular la variedad más frecuente (68.7%). En los casos que se identificó la expresión de ambos genes se realizaron ensayos de doble inmunofluorescencia, encontrando que no existía colocalización. El 80% de los casos del LHc fue positivo al VEB y el subtipo B fue el de mayor porcentaje de presentación. Un hallazgo notable fue la identificación de varios casos con ambos subtipos (A y B) en la misma muestra. Con estos resultados concluimos que las células de RS presentan un inmunofenotipo aberrante al de sus células de origen (linfocitos B), debido a mecanismos moleculares involucrados en la pérdida de expresión de factores de transcripción del linaje B (PAX5). Se ha propuesto que la expresión de LMP1 y LMP2 activan de manera constitutiva la vía de señalización de Notch1, induciendo diferentes alteraciones en la identidad de las células B dando origen a las células de RS, mecanismo sugerido en modelos animales y líneas celulares. Finalmente la presencia del subtipo B en la mayoría de los casos estudiados puede sugerir un factor de mal pronóstico al favorecer la capacidad de proliferación e inmortalización de las células de RS, y la identificación de NOTCH1 podría considerarse como un marcador candidato para un diagnóstico preciso del LHc.

Palabras clave: Linfoma de Hodgkin clásico, PAX5, NOTCH1, Virus de Epstein-Barr.

## 2 ABSTRACT

2

Classical Hodgkin lymphoma (cHL) is a neoplasm of lymphoid tissue that is characterized by the presence of neoplastic Reed-Sternberg (RS) cells. In Mexico this neoplasm is one of the 10 leading causes of infant mortality due to the lack of a prompt and effective diagnosis. In 30-40% of cases, cHL has been associated to Epstein-Barr virus (EBV), which remains in a latent phase in lymphocytes and expresses genes involved in transformation, proliferation and immortalization of RS cells. The mechanism by which EBV mixtures are involved in the expression of lymphoid cells development genes that give rise to the RS cell is still unclear. In an effort to identify Pax5, NOTCH1 as well as the latent state genes of EBV involvement in the cHL oncogenic process, 58 lymph node samples of mexican pediatric patients were analyzed. The expression of the immunophenotypes NOTCH1, Pax5 and LMP1B was identified by immunohistochemistry and immunofluorescence. The detection and genotyping of EBV was performed by PCR and in situ hybridation. NOTCH1 expression was detected in 85.3% of cHL cases, nodular sclerosis being the most common variety (68.7%). Double immunofluorescence essays were done in cases where the expression of both genes was identified, no colocalization was found. 80% of the cases of cHL were positive for EBV and B subtype had the highest percentage of presentation. A remarkable finding was the identification of several cases with both subtypes (A and B) in the same sample. With these results we conclude that RS cells have an aberrant immunophenotype in comparison to that of their cells of origin (B lymphocytes), due to molecular mechanisms involved in the loss of expression of transcription factors of B lineage (Pax5). It has been proposed that the expression of LMP1 and LMP2 that constitutively activate the Notch1 signaling pathway, induces different changes in the identity of B cells, giving rise to RS cells, a mechanism suggested in animal models and cell lines. Finally, the presence of B subtype in the majority of the cases studied may suggest a poor prognostic factor, as it enhances proliferation and immortalization of RS cells. The identification of NOTCH1 could be considered a candidate marker for a precise cHL diagnosis.

Keywords: classical Hodgkin lymphoma, Pax5, NOTCH1, Epstein-Barr virus.

Con formato: Fuente:  
(Predeterminado) Calibri, 11 pto

Con formato: Normal, Izquierda,  
Interlineado: sencillo

### 3 INTRODUCCION

#### 3.1 LINFOMA DE HODGKIN

##### 3.1.1 DESCRIPCIÓN

El linfoma de Hodgkin (LH) es una neoplasia linfoide que se origina, preferentemente, en los nódulos linfáticos cervicales y se disemina a través de los vasos linfáticos. Esta neoplasia se caracteriza por la presencia de células tumorales llamadas células de Reed-Sternberg (Kuppers 2009).

##### 3.1.2 EPIDEMIOLOGÍA

El LH presenta una incidencia de 3 casos nuevos al año por cada 100 000 habitantes, en México se reportan 1057 de nuevos casos en el 2008, sin embargo frecuentemente son subdiagnosticadas en hospitales de primer y segundo nivel por no contar con los recursos necesarios para un diagnóstico adecuado. (GLOBOCAN 2008 database. <http://www-dep.airc.fr/>).

La edad de diagnóstico de esta enfermedad presenta una distribución bimodal con un pico de máximo de incidencia en la juventud, entre los 20 y los 35 años, y otro a partir de los 50 años, aunque es poco frecuente en menores de 10 años. La distribución por sexo presenta una relación 3:1, siendo los varones los que presentan una mayor incidencia (Jarrett, Krajewski et al. 2003).

De acuerdo a la Organización Mundial de la Salud el LH se clasifica en linfoma de Hodgkin clásico (LHc) el cual representa el 95%, tan solo un 5% corresponde a LH de predominio linfocítico nodular (LHPLN) (Swerdlow SH 2008).

El LHc presenta cuatro subtipos, el mayoritario es la esclerosis nodular (EN), que corresponde el 70% de los casos con LHc, seguido de la variedad celularidad mixta (CM) con el 20-25% de los casos, el predominio linfocítico (PL) con un 5% y el subtipo menos incidente es el subtipo depleción linfocítica (DL), que engloba menos del 1% de los pacientes (Küppers 2009).

Aproximadamente el 40-60% de los linfomas de Hodgkin se han asociado a la confección con el virus de Epstein-Barr (VEB) en población caucásica, esta depende del grupo étnico, localización geográfica, sexo y edad (Kurzrock 2004; Asano 2009).

### 3.1.3 HISTOPATOLOGÍA

El LHc morfológicamente se caracteriza por la presencia de células gigantes muy típicas, llamadas células de Reed-Sternberg (RS), que inducen la acumulación reactiva de linfocitos, histiocitos y granulocitos. A diferencia de otras neoplasias linfoides, las células neoplásicas del LHc constituyen una fracción minúscula del 1% al 5% de la masa total de células tumorales.

Las células RS típicas son muy grandes (15 a 45  $\mu$  de diámetro), binucleadas o bilobuladas, donde cada mitad parece una imagen especular de la otra. En ocasiones existe la presencia de más núcleos, o el único presente está multilobulado. El núcleo está rodeado de abundante citoplasma anfófilo y contiene grandes nucléolos en ojos de búho, parecidas a inclusiones, rodeados generalmente de un halo claro y cuyo tamaño es similar al de un linfocito pequeño (5 a 7  $\mu$  de diámetro) (Mani 2009).

El LHc se divide en cuatro subtipos diferentes de acuerdo a la morfología de las células de RS y la composición de las células reactivas del infiltrado. Por orden de incidencia encontramos: EN, CM, DL y PL(Campo, Swerdlow et al.; Swerdlow SH 2008):

**-Esclerosis Nodular (EN):** Se caracteriza por la existencia de la variedad lacunar de las células RS, con núcleos multilobulados y un abundante citoplasma. En tejidos fijados con formol, este citoplasma se retrae hacia la membrana plasmática que da una apariencia de encontrarse en una laguna. Estas células pueden formar agregados celulares que suelen ir asociados a reacciones necróticas, y por la presencia de bandas de colágeno que dividen al tejido linfoide en nódulos bien delimitados. Las fibras pueden ser escasas o abundantes, y las células neoplásicas se hallan sobre un fondo polimorfo de linfocitos T pequeños, eosinófilos, células plasmáticas y macrófagos.

**-Celularidad Mixta:** La estructura ganglionar está difusamente sustituida por un infiltrado celular heterogéneo (linfocitos, histiocitos, neutrófilos, eosinófilos, células plasmáticas y macrófagos); normalmente uno de ellos predomina sobre los demás, entremezclados con las células neoplásicas. Suele haber abundantes células de RS clásicas y de la variedad mononuclear. Los histiocitos pueden mostrar características epiteliales, sobre todo en los casos asociados al VEB, Y es la variedad comúnmente asociada al VEB.

**-Predominio linfocítico (PL):** La estructura ganglionar está sustituida por un infiltrado nodular impreciso formado por linfocitos pequeños mezclados con cantidades variables de histiocitos. Es sumamente difícil encontrar células RS típicas. Las células más frecuentes son las llamadas variedades linfocitarias, con un núcleo multilobulado, llamadas células en palomita de maíz.

**-Depleción linfocítica (DL):** la apariencia de este subtipo es muy variable, se caracteriza por una predominancia de células neoplásicas RS en un infiltrado no neoplásico muy escaso. Esta variedad ocupa el segundo lugar en incidencia en países desarrollados (Küppers 2005).

### 3.1.4 INMUNOFENOTIPO DEL LHc

Los linfomas por lo general conservan características fenotípicas y funcionales de las células B, las células de RS rompen con estas características al presentar un inmunofenotipo muy inusual, variable e inconstante, con pérdida de expresión de antígenos asociados a las de células B y en ocasiones expresan marcadores de diversas estirpes hematopoyéticas, en especial marcadores de linfocitos T (Christian Steidl 2010).

Las células de RS comúnmente son CD30+, CD15+ y CD 45-. También son negativas para la cadena J y para CD75, únicamente un 30-40% de los casos son positivos para el marcador de célula B como CD20, CD22 y CD79A (Mani 2009). Los factores de transcripción que regulan la expresión de genes típicos de células B, como E2A, EBF1, OCT-2, BOB.1, están ausentes en el 90% de los casos, y PU.1 está permanentemente ausente en las células de RS (Tedoldi, Mottok et al. 2007).

El origen de las células de RS se puede demostrar en un 90% de los casos por la expresión de PAX5, factor de transcripción específico de célula B que reprime aquellos genes de estirpe desigual (Holmes 2008; Decker 2010). En LH Decker (2010) propone que la inactivación de Pax5 induce la indiferenciación de las células B, lo cual promueve un fenotipo propio de células T. La pérdida de expresión de Pax5 en células progenitoras en ratón han demostrado que Pax5 puede funcionar como un supresor tumoral o como una oncoproteína en diferentes linfomas (Cobaleda 2007).

Inmunofenotipo de las células de RS	
MARCADOR	EXPRESIÓN
CD 15	Positivo en un 70-95%
CD45	Negativo en todos los casos
CD 30	Positivo en casi todos los casos
CD 20	Positivo en 30-40% de los casos
CD 79a	Positivo en un 10-20%
PAX5	Positivo en un 90%
Cadena J	Negativo en todos los casos
OCT-2	Negativo en la mayoría de los casos
BOB.1	Negativo en casi todos los casos
CD 3	Positivo en pocos casos (1%)
CD 2	Positivo en 4 %
CD 43	Negativo en todos los casos

Tabla 1. Inmunofenotipo de células de Reed-Sterberng (Tedoldi S 2002).

### 3.1.5 PAX5

PAX5 es un factor de transcripción localizado en la región 9p13, también llamado Proteína activadora específica de célula B (BSAP) . PAX5 forma parte de la familia PAX que incluye a nueve factores de transcripción, que juegan un papel indispensable y crucial en el desarrollo de diversos sistemas. En el humano, los nueve genes PAX son expresados durante varias etapas de la embriogénesis y diferenciación. PAX5 es expresado normalmente en el desarrollo cerebral, pero es esencial en la diferenciación y proliferación de las células B (Kanteti 2009).

La expresión de PAX5 es requerida en la diferenciación de los linfocitos B, principalmente en la etapa pro-B y se mantiene hasta célula B madura. Su expresión es fundamental para mantener la identidad y función de los linfocitos B. A nivel molecular, PAX5 tiene una doble función, activa genes específicos y esenciales del linaje B (Kox 2010) y al mismo tiempo, PAX5 reprime aquellos

genes de diferente estirpe con importantes funciones en la señalización, adhesión celular, migración y regulación transcripcional de otros linajes hematopoyéticos, principalmente de genes específicos del linaje T, como NOTCH1 (Roessler 2006).

La diferenciación de las células B requiere de la acción de factores de transcripción específicos de las células B como E2A, EBF y PAX5. E2A activa la expresión de EBF y ambos regulan genes necesarios para la transición de pro-B a pre-B, incluidos VpreB, mb1 y PAX5 (Cobaleda 2007) .

PAX5 es expresado en la mayoría de las neoplasias de células B, una expresión aberrante de este gen se ha asociado con diversas neoplasias pediátricas como meduloblastoma y linfomas de células B (Souabni 2007).

### 3.1.6 NOTCH

Notch codifica para un receptor transmembrana (Notch1) altamente conservado el cual es activado por dos ligandos Delta y Serrate. La vía de señalización Notch se activa en diferentes procesos de diferenciación en diversos tipos celulares. Esta vía se inicia a través de la interacción del ligando-receptor, lo cual disocia al dominio extracelular del dominio citoplasmático de Notch (NIC), el cual es liberado y tiene la capacidad de translocar al núcleo (Radtke 2004). NIC está formado por numerosos dominios de interacción proteína-proteína, al translocarse al núcleo se asocia con diversos factores de unión al ADN, CBF1, supresor de Hairless, Lag-2 (RBP-Jk) en conjunto llamado CSL. CSL unido a NIC reclutan a MAML, el tercer componente del complejo de transcripción Notch (NTC), el cual remodela la cromatina favoreciendo la expresión de genes necesarios para la diferenciación y mantenimiento de los linfocitos T (Moellering 2009).

Por otra parte NOTCH1 reprime la expresión de PAX5 a través de la inhibición de la transcripción de E2A y EBF al degradar a E47 proteína que integra al complejo E2A. Similares cambios transcripcionales se han asociado con la alteración en la identidad de la célula B y la modificación del inmunofenotipo de las células de RS.(Roessler 2006) .

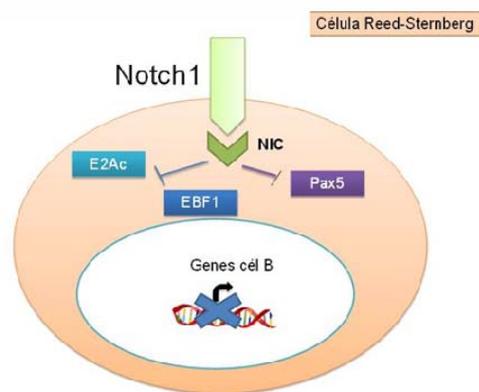


Figura 1. Representación de la inhibición de la expresión de genes del linaje B por interacción del complejo de transcripción de Notch1 en las células de RS.

## 3.2 VIRUS DE EPSTEIN-BARR

### 3.2.1 DESCRIPCIÓN

El VEB es un herpesvirus que pertenece a la subfamilia Gammaherpesviridae y al género Linfocriptovirus. El VEB puede infectar, establecer latencia que induce proliferación en los linfocitos B y se ha reportado positividad del 90% en la población mundial (Asano 2009). El primer contacto con el virus en la mayoría de los individuos es en la niñez o adolescencia, y el virus permanece latente toda la vida en una pequeña proporción de linfocitos B y en células epiteliales de la orofaringe y de las glándulas salivales (Young LS 2004).

El VEB está asociado con diversas patologías malignas y benignas como: mononucleosis infecciosa, neoplasia de origen epitelial como carcinoma nasofaríngeo, leucoplasia florida oral y neoplasias de origen linfocitario como el linfoma de Hodgkin, Burkitt, linfomas en SIDA, y enfermedades linfoproliferativas post-trasplante así como linfomas de células T periféricas (Wang 2006; Rickinson 2004).

### 3.2.2 CARACTERÍSTICAS ESTRUCTURALES

El VEB es un virus ADN con una envoltura icosaédrica de 150 nm de diámetro. Su core está formado por un ADN unido a proteínas rodeado por una nucleocápside de 162 capsómeros a su vez rodeada por una envoltura externa que contiene abundantes glicoproteínas. La envoltura externa muestra 4 glicoproteínas y 2 proteínas no glicosiladas: gp350/220, gp250/200, gp115, gp85, p160 y p140. El VEB difiere de otros herpesvirus en que su capa externa está compuesta predominantemente de la glicoproteína, gp350/220 (Kintner and Sugden 1979).

El genoma del VEB es un ADN lineal con doble cadena (dsDNA) de 172 kb y un 59% de G/C. Consta de una secuencia corta única de 10 kb (US) seguida por una secuencia de repeticiones internas de 40 kb (IR-1) y otra gran secuencia de 120 kb dividida en elementos repetitivos de menor tamaño (IR-2, IR-3, IR-4). Además, en ambos extremos, contiene secuencias repetidas terminales de 0.5 kb. Ya que, cada virus difiere en la frecuencia de la repetición de estas secuencias y mantiene sus características en las sucesivas repeticiones (Young LS 2004). Después de la infección de la célula huésped, el genoma viral se hace circular formando enlaces covalentes entre las dos secuencias terminales repetidas constituyendo un episoma localizado en el núcleo, del que pueden encontrarse entre 10 y 30 copias (Lui 2010).

El genoma del VEB puede producir entre 100 y 150 productos genéticos que se dividen en cuatro clases: proteínas de la fase latente, proteínas de la fase replicativa precoz inmediata, proteínas de la fase replicativa precoz y proteína de la fase tardía, 11 genes se expresan durante la infección latente, 2 pequeños ácidos ribonucleicos (ARN) denominados EBER-1 y EBER-2. 6 antígenos nucleares (EBNA-1,-2,-3A, -3B, -3C y -LP) y tres proteínas de membrana (LMP-1,-2A y -2B) (Lupton and Levine 1985).

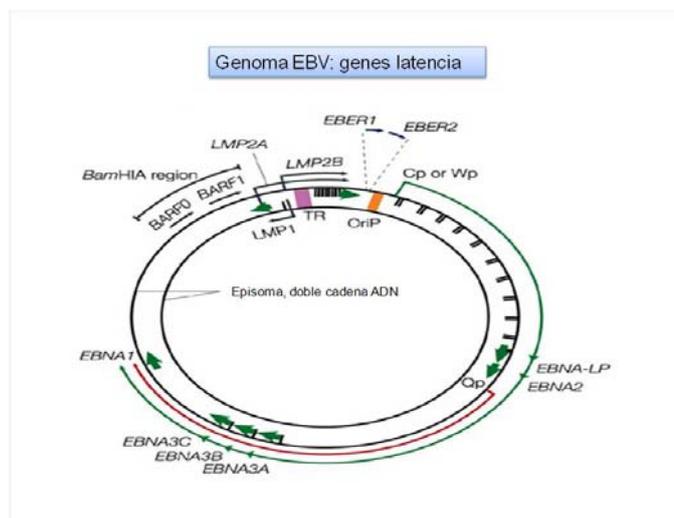


Figura 2. Esquema que representa el genoma del virus de Epstein-Barr.

El antígeno nuclear EBNA-1 del VEB es el único necesario para la replicación del ADN viral en la fase latente. El resto de las proteínas requeridas son producidas por la célula huésped, y el inicio de la replicación del ADN se realiza en la zona denominada oriP. EBNA-1 se une a las dos zonas que forman oriP para iniciar la replicación del ADN (Kieff E 2007).

Existen dos tipos diferentes de virus que se diferencian en las secuencias de los genes implicados en la infección latente: VEB-1 o A y VEB-2 o B (Rowe, Young et al. 1989). La diferencia entre los dos subtipos se produce principalmente en el gen EBNA-2 siendo la secuencia primaria de aminoácidos de EBNA-2 idéntica solo en un 56% (Cancian, Bosshard et al. 2011).

Estudios de prevalencia han demostrado que el tipo 2 de VEB es inusual en la población sana de occidente pero relativamente frecuente en África central, Nueva Guinea y países en vías de desarrollo. Los sujetos infectados por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) pueden infectarse con VEB tanto del tipo A como por el tipo B (Sixbey 1989). En líneas celulares linfoblastoides generadas *in vitro* el subtipo B del EBV es más eficiente en la inmortalización de las células B *in vitro* que el subtipo A (Jian-Hong Lu 2010).



Figura 3. Distribución mundial de los subtipos del virus de Epstein-Barr. (Kieff E 2007)

### 3.2.3 TRANSMISIÓN

El VEB se transmite a través de la saliva por contacto bucal o por partículas de aerosol. También puede ser adquirido por transfusiones y trasplantes de órganos. La infección inicial ocurre en las células epiteliales de la orofaringe. Durante la etapa de infección productiva en las células epiteliales de la oro y nasofaringe los linfocitos B que están en este tejido también se infecta (Thompson 2004). En los linfocitos B el virus permanece, generalmente, en forma de infección latente y puede entrar en ciclo lítico o replicativo en el que puede infectar a otros linfocitos o reinfectar células epiteliales (Jennifer A. Morrison 2004). El principal reservorio del VEB es el sistema linfoide.

### 3.2.4 CICLO DE VIDA

#### 3.2.4.1 FASE DE LÍTICA

En la fase lítica o de síntesis de novo del virus, se expresan alrededor de 100 genes de manera sincrónica se involucran en la amplificación del ADN viral así como en la codificación de los componentes estructurales necesarios para su morfogénesis y la liberación de la progenie (Blake 2010). La transición de la fase productiva (lítica) a la fase de latencia, se propone que depende de la expresión de los factores de transcripción Zta (también llamado Z, ZEBRA o EB1) y Rta (también nombrado R) los cuales son codificados por las proteínas virales BZLF1 y BRF1(Kalla M 2010). La expresión de dichos factores de transcripción son los mayores reguladores hasta el momento propuestos que son necesarios para la inducción a la fase de latencia (Jillian A. Bristol 2010).

#### 3.2.4.2 FASE DE LATENCIA

Estudios en cultivos celulares y muestras de biopsias de tumores humanos sobre la expresión genética del VEB han identificado tres formas diferentes de infección latente (Seiko 2010).

Tipo de latencia	Patología asociada	Perfil génico
I	Linfoma de Burkitt	EBNA 1, EBER y BamHI-A
II	Linfoma de Hodgkin y Carcinoma nasofaríngeo	EBNA 1, LMP 1,2A, 3B, EBER, BamHI-A y algunos microRNA's
III	Desórdenes linfoproliferativos post-trasplante	EBER, EBNA 1, 2, 3A, 3B , LP, BamHI-A así como LMP 1, 2A y 3B

Tabla 2. Tipos de latencia del virus de Epstein-Barr

Posterior a la infección in vitro de los linfocitos B, la expresión de los genes de latencia del VEB muestran un patrón temporal. EBNA-LP y EBNA-2 son los más precoces en aparecer alcanzando niveles máximos sobre las 24 horas. EBNA-1, 3A, -3B, -3C y LMP1 se expresan tardíamente y llegan a detectarse a las 24 horas. EBER-1 y -2 alcanzan su máxima expresión a las 36 horas (Kieff E 2007).

EBNA-1 es una proteína de 60-85 kDa, dentro de sus funciones es la activación de la transcripción, replicación de ADN viral y la conservación del mismo. Se asocia con cromosomas del hospedero en metafase y puede jugar un papel en la correcta división de los episomas de VEB en las células hijas de los linfocitos después de la división celular. Para realizar su función la proteína EBNA-1 requiere múltiples lugares de unión y dominios, esto sugiere que para su funcionamiento necesita interactuar con diversas proteínas (Bornkamm 2001).

EBNA-2 es una proteína fosforilada que es esencial para que se produzca la immortalización del linfocito B es necesaria para la transcripción de los genes virales LMP-1, LMP-2A y -2B (Cancian, Bosshard et al. 2011). La estructura de la proteína es diferente en los dos tipos de EBV; el tipo A tiene un peso 90 kDa y el tipo B de 78 KDa (Rowe, Young et al. 1989).

La proteína latente de membrana 1 del EBV (LMP1), es una proteína viral análoga a la familia de los receptores TNF en las células humanas con un peso molecular de aproximadamente 63kDa está conformada por tres dominios un región amino, una transmembrana y la región carboxilo terminal. El extremo C-terminal está conformado por tres regiones de vital importancia involucradas en la activación de vías de señalización involucradas en la transformación neoplásica (Zhong-Xin 2005) que son 1, 2 y 3 (CTAR1, CTAR2 y CTAR3). Las regiones CTAR1 (aminoácidos 194-231) y CTAR2 (aminoácidos 351-286) se unen a los factores asociados al receptor TNF (TRAF's) y a los dominios de la muerte asociados al receptor TNF (TRADD) activando las vías de señalización NF-κB y p38 cinasa (Izumi and Kieff 1997; Kung 2010). Adicionalmente el dominio CTAR2 activa la vía de señalización de la cinasa Jun N-terminal (JNK), la activación de estas diferentes vías resulta en la sobre-expresión de LMP1 así como genes

antiapoptóticos como bcl-2, A20, mck-1 y blf-1, lo cual resulta esencial en transformación celular de una célula B a una célula de RS así como en la inmortalización de la misma (Zhong-Xin 2005; Vockerodt 2008). Recientemente se identificó al dominio CTAR3 el cual se localiza entre los dominios CTAR1 y CTAR2 se propone que activa a la vía de señalización JAK-STAT (Adriaenssens 2004; Repic 2010).

La delección de 30 pb del extremo 3' del gen LMP-1 (aminoácidos 346 a 355) se ha detectado en numerosos tumores asociada a un fenotipo agresivo al determinar una prolongación en la vida media de la proteína, lo que puede incrementar el efecto oncogénico y transformante de la proteína LMP-1 (Knecht 1993). Esta variación en la secuencia del gen LMP1 también se han utilizado como herramienta en la identificación del origen étnico y ancestral en diversas poblaciones (Wang Yun 2007; Saechan 2010).

El gen que codifica los EBERs está localizado en un extremo del genoma de VEB y se expresa precozmente durante la infección latente del virus que produce un pequeño ARN mensajero no codificante que es expresado en unos 10 millones de copias por célula infectada. EBER se localiza en el núcleo y en el citoplasma y están íntimamente asociados al retículo endoplásmico rugoso de las células linfoblastoides inmortalizadas por VEB (Ting-Yung 2010).

#### **4 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**

El cambio del inmunofenotipo característico de las células B al de las células de Reed-Sternberg en el linfoma de Hodgkin clásico de pacientes pediátricos se ha asociado a la presencia del virus de Epstein-Barr. Sin embargo a la fecha aún no se ha descrito a detalle el mecanismo por el cual el VEB transforma a la célula B y si existe una variabilidad de expresión entre PAX5 y NOTCH1 ocasionada por el infección del virus.

#### **5 JUSTIFICACIÓN**

El linfoma de Hodgkin clásico es una neoplasia del sistema inmunitario. Los factores que participan en el desarrollo del LHc y en la progresión de esta neoplasia se desconocen, especialmente los eventos moleculares involucrados en la transformación de la célula de Reed-Sternberg. Las causas que originan un inmunofenotipo aberrante se ha asociado a la participación de NOTCH1, la cual ha sido caracterizada únicamente en modelos animales y en líneas células. A la fecha no existen estudios sobre la expresión de PAX5 en las diferentes variedades del LHc ni tampoco su asociación con la vía de señalización de NOTCH1 en población infantil mexicana infectada por el VEB. La variabilidad de expresión entre NOTCH1 y PAX5 en el LHc en presencia de las diferentes mezclas del virus de Epstein-Barr no ha sido esclarecida. El conocer los mecanismos moleculares por los cuales se origina la transformación de la célula B a una célula Reed-Sternberg, con facultades de proliferación e inmortalización, permitirá la identificación de nuevos marcadores que proporcionen información para el desarrollo de diagnósticos tempranos y precisos que conlleve a estrategias terapéuticas eficaces.

## 6 HIPÓTESIS

Las mezclas de virus de Epstein-Barr y la expresión de PAX5 y NOTCH1 es un factor relacionado con el cambio del inmunofenotipo B en Linfoma de Hodgkin clásico.

## 7 OBJETIVOS

### 7.1 OBJETIVO GENERAL

Identificar la expresión de NOTCH1 y PAX5 en pacientes pediátricos con linfoma de Hodgkin clásico y los subtipos del virus Epstein-Barr.

### 7.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Elaboración de microarreglo de tejido de biopsias incluidas en parafina para homogenizar la técnica de Inmunohistoquímica, inmunofluorescencia e hibridación *in situ*.
- Caracterización de la muestra mediante la identificación del inmunofenotipo y detección de LMP1.
- Comprobar la expresión de PAX5 y NOTCH1 en las diferentes variedades del LHc mediante Inmunohistoquímica e inmunofluorescencia.
- Identificación EBER mediante hibridación *in situ*.
- Detección de la presencia del virus Epstein-Barr (LMP1 y LMP2) por PCR.
- Genotipificación del virus de Epstein-Bar (EBNA 2A y 2B) por PCR.
- Análisis de la expresión de PAX5 y NOTCH1 en muestras positivas a infección múltiple de EBV.

## **8 MATERIALES Y MÉTODOS**

### **8.1 TIPO DE ESTUDIO**

Observacional, retrospectivo, transversal y comparativo.

### **8.2 UNIVERSO DE ESTUDIO**

Se utilizaron 58 muestras de biopsias de ganglio linfático incluidas en parafina, 41 de pacientes con diagnóstico clínico e histopatológico de las variedades EN, CM, DL y PL de LH clásico y 17 de pacientes con diagnóstico clínico e histopatológico diferente a LHc. Todos los pacientes fueron de origen mexicano proporcionados por el servicio de Hemato-Oncología del Hospital Infantil de México Federico Gómez y por el servicio de Oncología-Patología del Hospital Pediátrico Moctezuma del Departamento Distrito Federal.

#### **8.2.1 CRITERIOS DE SELECCIÓN DE CASOS**

##### **8.2.1.1 CRITERIOS DE INCLUSIÓN**

Muestras de biopsias incluidas en parafina de pacientes con diagnóstico clínico e histopatológico de LHEN, LHCM, LHDL y LHPL. Incluidas en el periodo de 2005 a 2010.

##### **8.2.1.2 CRITERIOS DE EXCLUSIÓN**

Muestras de biopsias incluidas en parafina que no cuenten con el diagnóstico histopatológico de LH o que no se encontraron en el periodo de 2005 a 2010.

##### **8.2.1.3 CRITERIOS DE ELIMINACIÓN**

Muestras de biopsias incluidas en parafina que durante el proceso no sean informativas por la pérdida de tejido o muestra insuficiente

## 8.2.2 CRITERIOS DE SELECCIÓN DE GRUPO CONTROL

### 8.2.2.1 CRITERIOS DE INCLUSIÓN

Muestras de biopsias incluidas en parafina de pacientes con diagnóstico clínico negativo a LH, positivos y negativos a EBV. Incluidas en el periodo de 2005 a 2010.

### 8.2.2.2 CRITERIOS DE ELIMINACIÓN

Biopsias incluidas en parafina que durante el proceso no sean informativas por la pérdida de tejido o muestra insuficiente.

- Características de grupo caso y grupo control.

Biopsias ganglio linfático			
Grupo caso		Grupo control	
LHc +	EBV +	LHc -	EBV +
LHc +	EBV -	LHc -	EBV -

Tabla 3. Determinación de las características del grupo caso y control

- Identificación de mezclas del VEB.

Mezcla EVB			
LHc+ EBV+		LH - EVB +	
EBNA2 A	EBNA2 B	EBNA2 A	EBNA2 B

Tabla 4. Determinación de las mezclas del VEB.

### 8.3 ESTRATEGIA METODOLÓGICA

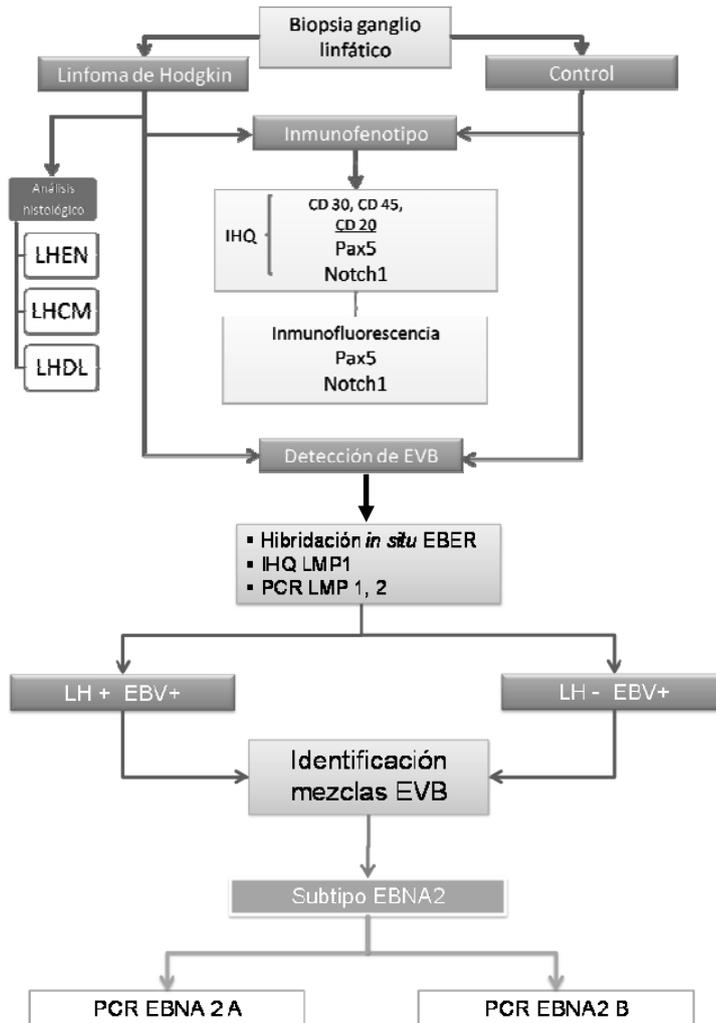


Figura 4. Diagrama de la estrategia metodológica

## 8.4 TÉCNICAS UTILIZADAS

### 8.4.1 ELABORACIÓN DE MICROARREGLO DE TEJIDO

Para homogenizar la técnica de Inmunohistoquímica, inmunofluorescencia e hibridación in situ se realizaron microarreglos de tejido. Con la ayuda de un sacabocados buster de 5 mm se tomo una muestra de la región de interés de la biopsia de ganglio, se distribuyen de manera ordenada para la formación de nuevo bloque. Se hicieron cortes de 5  $\mu\text{m}$  los cuales se montaron en portaobjetos tratados con poli-L-lisina.

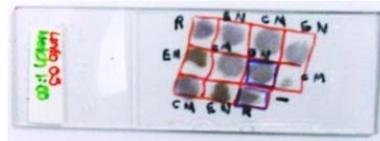


Figura 5. Fotografía de microarreglo de tejido

### 8.4.2 INMUNOHISTOQUÍMIA E INMUNOFLUORESCENCIA

Las laminillas con cortes de 5  $\mu\text{m}$  se desparafinaron a una temperatura de 65°C y con xileno, se rehidrataron en una serie gradual de etanol (100%,96%,90%,80% y 70%).

#### A. Inmunoperoxidasa

Una vez que las laminillas fueron re-hidratadas se lavaron con agua destilada y con solución salina de fosfatos (PBS) (ver tabla 6) a pH 7.2. Con el propósito de preservar la integridad de los antígenos del tejido, las laminillas fueron tratadas con amortiguador de citratos 1X (DakoCytomation, Target Retrieval Solution) y fueron sometidas de 20 a 25 lbs/ de presión y 121°C durante 5min. Se dejaron enfriar durante 20 min. El peróxido endógeno fue bloqueado con una solución de peróxido de hidrógeno al 3% durante 10 minutos a temperatura ambiente en agitación constante. Los cortes se lavaron con PBS-Tween 20 (PBS-T20) y se incubaron en

agitación durante 10 minutos a temperatura ambiente con una solución bloqueadora de proteínas (Biogenex, USA). Una vez decantado el bloqueador, las preparaciones se incubaron 12 horas en cámara húmeda a 4°C con el anticuerpo primario en la dilución estandarizada (DakoCytomation, Antibody Diluyente cat. S0809). En todos los casos se realizó un análisis de control negativo, incubando el tejido con PBS y bloqueador de proteínas. Una vez lavados los cortes con PBS-Tween20 se incubaron por 20 min con el anticuerpo secundario que es un polímero anti-IgG de ratón/conejo/cabra conjugado con estreptavidina-peroxidasa (Dako, USA). La reacción enzimática fue revelada empleando la solución de sustrato-cromógeno durante 10 segundos (kit LSAB+Sys/HRP, Dako-Cytomation, Carpintería, CA, cat K0679) contrastadas con hematoxilina, usando entellan como medio de montaje. Las muestras se observaron empleando un microscopio de campo claro (Axioskop 2 FS plus, Zeiss) a 10X, 40X y 100X aumentos. Se tomaron fotos con una cámara AxioCam HR (Zeiss).

**Especificaciones de anticuerpos primarios utilizados en Inmunohistoquímica.**

Anticuerpo primario	Origen	Código	Dilución
Mouse anti-CD30	Santa Cruz Bio-Technology, Santa Cruz California	19658	1/100
Mouse anti-CD45	Santa Cruz Bio-Technology, Santa Cruz California	1183	1/100
Mouse anti-CD20	Santa Cruz Bio-Technology, Santa Cruz California	19990	1/100
Mouse anti-LMP1	Santa Cruz Bio-Technology, Santa Cruz California	57 721	1/100

Tabla 5. Listado de anticuerpos utilizados en Inmunohistoquímica

## B. Inmunofluorescencia.

Las laminillas rehidratadas (serie gradual de etanol) se lavaron con agua destilada y PBS a pH 7.4. Con el propósito de preservar la integridad de los antígenos del tejido, las laminillas se trataron con amortiguador de citratos 1X y fueron sometidas a una presión 20 a 25 lbs/pulgada y 121°C durante 5min. Se dejaron enfriar durante 20 min y se lavaron con PBS-T20, se incubaron 10 minutos a temperatura ambiente con una solución bloqueadora de proteínas. Una vez decantado el bloqueador, las preparaciones se incubaron 12 horas en una cámara húmeda a temperatura ambiente con el anticuerpo primario. Posterior a los lavados el material se incubó nuevamente bajo las mismas condiciones con el anticuerpo secundario anti-IgG de ratón hecho en cabra y acoplado a isotiocianato de fluoresceína (FITC). Las muestras fluoresceinadas fueron tratadas con RNAsa 20 minutos y lavadas con una solución SSC 1X (ver tabla 6). Los núcleos se tiñeron en azul con DRAQ7™ con un pico de emisión de onda de 665 nm (Biostatus Limited, code: DR71000, UK) y como medio de montaje y potenciador de la fluorescencia se utilizó vectashiel (Vector, USA). El análisis de inmunofluorescencia se llevó a cabo en un microscopio confocal Axiovert 100M Software LSM 510, empleando un Laser de 488nm y 543nm, así como filtros de pase corto (BP 505-530) para FITC y pase largo (LP 560) para las tinciones de contraste del núcleo o citoplasma.

## B. Doble inmunofluorescencia.

Las laminillas rehidratadas en una serie gradual de etanol se lavaron con agua destilada y con PBS pH 7.4. Con el propósito de mantener los antígenos del tejido, las laminillas se trataron con amortiguador de citratos 1X y sometidas a una presión de 20 a 25 lbs/pulgada y 121°C durante 5min. Se dejaron enfriar durante 20 min. Después los cortes se lavaron con PBS-T20 y se incubaron 10 min. A temperatura ambiente con una solución bloqueadora de proteínas. Una vez decantado el bloqueador, las

preparaciones se incubaron toda la noche a 4°C en una cámara húmeda con el anticuerpo primario anti-NOTCH1 (1/50). Después de los lavados con PBS-T20, los cortes se incubaron por 60 minutos con el anticuerpo secundario anti-ratón fracción IgG2b acoplado a CY5 (Alexa, Company) durante 1 hora. Transcurrido el tiempo y posterior a los lavados, se incubaron con el segundo anticuerpo anti-PAX5 (1/50) acoplada en la fracción Fab a FITC durante 1 hora. Los núcleos se tiñeron en azul con DRAQ7™ con un pico de emisión de onda de 665 nm (Biostatus Limited, code: DR71000, UK). Finalmente las laminillas fueron lavadas con una solución SSC 1X y se adicionó vectashiel como medio de montaje. El análisis de inmunofluorescencia se llevó a cabo en un microscopio confocal Axiovert 100M Software LSM 510, empleando los Laser de 488 y 543nm, así como filtros de pase corto (BP 505-530) para FITC y pase largo (LP 560) para CY5.

**Especificaciones de anticuerpos utilizados en Inmunofluorescencia**

Anticuerpo primario	Origen	Código	Dilución	Incubación	Anticuerpo secundario	Fluorocromo	Pico de emisión de onda Em (nm)
Mouse anti-PAX5	Santa Cruz Bio-Technology, Santa Cruz California	555-15	1/50	60 minutos	Goat Anti-Mouse IgG (sc2010)	FITC	519
Goat anti-NOTCH1	Santa Cruz Bio-Technology, Santa Cruz California	23299	1/50	60 minutos	Mouse Anti-Goat IgG (sc2010)	CY5	670

Tabla 6. Características de los anticuerpos utilizados en inmunofluorescencia.

<b>SOLUCIONES</b>		
I. PBS 1X, pH 7.4	Cloruro de sodio NaCl	8 g
	Cloruro de potasio KCL	0.2g
	Fosfato de sodio NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1.44 g
	Fosfato de potasio KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.24 g
	Aforar con agua destilada hasta un volumen de	1000 ml
II. PBS-Tween 20, pH 7.4	Tween 20	1 ml
	PBS 1X	1000 ml
III. Solución de SSC20X, pH 7.0	Cloruro de Sodios NaCl	175.3g
	Citrato de Sodio	88.2g
	H2O inyectable	1000mL

Tabla 7. Preparación de soluciones utilizadas.

Todos los ensayos se realizaron por triplicado, los controles positivos que se utilizaron en cada ensayo de acuerdo al anticuerpo utilizado fueron los siguientes: para CD 45, 30, 20 y LMP1 (amígdala y ganglio normal), PAX5 (cáncer colon) y NOTCH1 (ovario). En todos los casos, se determinó la positividad de los anticuerpos primarios cuantificando la cantidad de células de Reed-Sternberg positivas por campo en un aumento de 40X.

#### **IDENTIFICACIÓN DEL INMUNOFENOTIPO DE LAS CÉLULAS DE REED-STENBERG**

<b>Cantidad de células de RS positivas</b>	<b>Valor asignado</b>
<b>1-20</b>	<b>1</b>
<b>21-40</b>	<b>2</b>
<b>41-60</b>	<b>3</b>
<b>+ 60</b>	<b>4</b>

Tabla 8. Cuantificación de células de RS positivas

### 8.4.3 HIBRIDACIÓN *IN SITU*

Los cortes de microarreglos de tejidos se desparafinaron con xileno, se rehidrataron en una serie gradual de etanol (99% y 95%) hasta agua libre de RNAsas.

La muestra se incubó con la solución de “pre tratamiento” (proteinasas K) durante 30 min a temperatura ambiente, se lavaron en 2 ocasiones con agua pura. Posteriormente la muestra se deshidrató durante 3 minutos en etanol al 95%, una vez que la muestra secó por completo se aplicaron 10µl de la sonda (Epstein-Barr virus (EBER) PNA Probe/Fluorescein código: Y5200 DAKO) la laminilla se selló y se dejó hibridar a 55°C durante dos horas. Posterior a la hibridación la muestra se lavó a 55°C durante 30 minutos en solución de trometamol al 3.6%, se ajustó la temperatura en una breve inmersión en TBS.

Para la visualización de la sonda se aplicaron 10µl de Anti-FITC/AP durante 30 minutos, posterior a la incubación se realizó lavado en 3 ocasiones en TBS y agua pura. La reacción enzimática fue revelada empleando la solución de 5-bromo-4-cloro-3-indolilfosfato (BCIP) durante 10 segundos contrastadas con hematoxilina, usando entellan como medio de montaje. Las muestras se observaron empleando un microscopio de campo claro (Axioskop 2 FS plus, Zeiss) a 10X, 40X y 100X aumentos. Se tomaron fotos con una cámara AxioCam HR (Zeiss).

En todos los casos, la detección del virus se realizó al cuantificar la cantidad de células de Reed-Sternberg positivas a EBER's por campo en un aumento de 40X.

<b>Detección de virus de Epstein- Barr (EBER) en células de Reed Sternberg</b>	
<b>Cantidad de células de RS positivas</b>	<b>Valor asignado</b>
<b>1-20</b>	1
<b>21-40</b>	2
<b>41-60</b>	3
<b>+ 60</b>	4

Tabla 9. Cuantificación del virus de Epstein-Barr

#### 8.4.4 AMPLIFICACIÓN MEDIANTE LA TÉCNICA DE REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)

La técnica fue aplicada a los casos que mostraron expresión de EBERs con el objeto de tipificar las mezclas del virus de Epstein-Barr mediante el estudio de los genes LMP1, LMP2, EBNA 2A y EBNA 2B.

Extracción de ADN de muestras se realizó a partir de cortes de 20 micrasde grosor de tejido obtenido de las biopsias de ganglio incluidas en parafina, se desparafinaron con xilol con la posterior hidratación del tejido con etanol y fueron centrifugados a 13,000 RPM. Se incubó durante toda noche a 37°C con proteinasa K a una concentración final de 100 µg/ml en un buffer de lisis formado por NaCl 100 mM, EDTA 25mM. El ADN se purificó mediante extracción volumen a volumen con fenol-cloroformo-isomílico, se precipitó con acetato de sodio y etanol absoluto, se eliminó el excedente y se resuspendió en agua libre de RNAsas.

En todas las muestras obtenidas se realizó el análisis de la concentración pureza y calidad del ADN por análisis espectrofotométrico mediante lecturas a 260 y 280 nm. La concentración de DNA fue calculada mediante la siguiente relación: La pureza se obtuvo mediante la relación de densidades ópticas obtenida con las lecturas 260/280 nm y se consideró como optima una relación 1.8-2.0.

Para determinar la calidad de las muestras se realizó electroforesis en gel de agarosa al 1 % teñido con bromuro de etidio al 0.0002.

Se verificó la integridad del ADN obtenido por el método de fenol-cloroformo a partir de biopsias de ganglio linfático incluidas en parafina, mediante la amplificación del gen constitutivo  $\beta$ -globina comparándolo con muestra de ADN humano comercial.

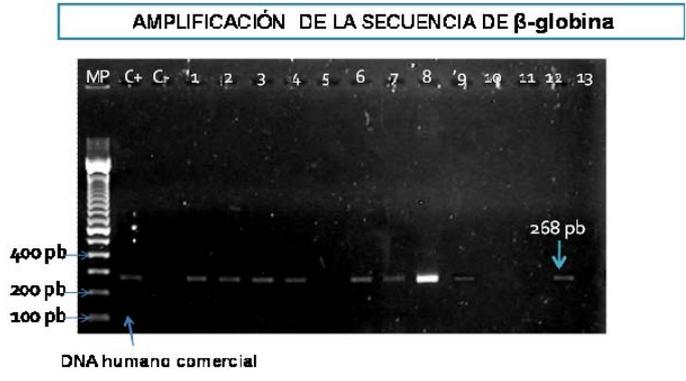


Figura 6. Determinación de la integridad del ADN mediante la amplificación del gen  $\beta$ -globina

**8.4.4.1 DISEÑO DE OLIGONUCLEÓTIDOS**

El diseño de los oligonucleótidos para la tipificación del virus de Epstein-Barr se utilizó el software VECTOR10.

Características de los oligonucleótidos			
Gen	Pares de bases (pb)	Oligonucleótido de inicio (Fw)	Oligonucleótido de terminación (Rw)
<b><math>\beta</math>-globina</b>	268	GAA GAG CCA AGG ACA GGT AC	CAA CTT CAT CCA CGT TCA CC
<b>LMP1</b>	109	CAG TCA GGC AAG CCT ATG A	CTG GTT CCG GTG GAG ATG A
<b>LMP2</b>	70	AGC TGT AAC TGT GGT TTC CAT GAG	GGC CCC TGG CGA AGA G
<b>EBNA 2A</b>	497	TCT TGA TAG GGA TCC GCT AGG ATA	ACC GTG GTT CTG GAC TAT CTG GAT C
<b>EBNA 2B</b>	300	CAT GCT AGC CTT AGG ACA TA	AGA CTT AGT TGA TGC CCT AG

Tabla 10. Oligonucleótidos de los genes del virus de Epstein-Barr

#### **8.4.4.2 CONTROL POSITIVO A PARTIR DE LINFOCITOS B DE SANGRE PERIFÉRICA**

Para contar con un control positivo para la amplificación de los genes del VEB, se realizó a partir de la separación de linfocitos B por columna de nylon.

La sangre periférica proporcionada por el servicio de Banco de sangre del Hospital Infantil de México "Federico Gómez" se diluyó un volumen igual en RPMI 1650. Se agregaron 7 ml de sangre periférica a 3 ml de solución Ficoll-Hypaque, se centrifugó a 2000 RPM durante 20 minutos a  $-4^{\circ}\text{C}$ . Se aspiraron los linfocitos los cuales por diferencia de densidad forman un anillo blanco. En tubo de Fisher nuevo se resuspendieron los linfocitos en RPMI 1640, se centrifugaron a 1 200 RPM durante 10 minutos, se decantaron los tubos y se realizó un segundo lavado con RPMI 1640. Los linfocitos resuspendidos en RPMI 1640 se mantuvieron a  $20^{\circ}\text{C}$  hasta la purificación de los linfocitos B.

El tratamiento de la fibra de nylon se realizaron lavados con HCl 1N y NaOH 1N el exceso de NaOH se elimina con agua destilada hasta que el pH del último lavado sea neutro, se secó a  $37^{\circ}\text{C}$  durante 12 horas.

Como columna se utilizaron jeringas de 10 ml a las cuales se les empacó el nylon pretratado se lavó con RPMI 1640 con suero fetal de carnero (SFC) al 20% y se incubó durante 30 minutos a  $37^{\circ}\text{C}$ . Al terminar la incubación se eliminó el exceso de medio, los linfocitos totales aislados se pasaron por la columna e incubaron durante 30 minutos a  $37^{\circ}\text{C}$ . Se lavó la columna haciendo pasar 5 ml de RPMI 1640, se eliminó el excedente. Para obtener los linfocitos B se incubó durante 30 minutos a  $37^{\circ}\text{C}$  medio RPMI 1640 con 20% de SFC, se recuperaron los linfocitos B a los cuales se les agregó RPMI más cloramina, se mantuvieron 3 días a  $37^{\circ}\text{C}$ . La extracción de ADN de los linfocitos B se realizó mediante el método de fenol/cloroformo.

Para la confirmación de nuestro control se amplificó el gen de la proteína latente de membrana 1 con las siguientes condiciones: 5 µl de ADN obtenido de los linfocitos B obtenidos de sangre periférica, 5 µl de buffer (Taq/DNA polymerase, Code: M0320S. New England, BioLabs, Inc.), 5 µl dNTP's (dNTP's Mix, PCR Grade Code: 201900, QIAGEN), 0.3 µl de Taq/ADN polimerasa (Taq/DNA polymerase Code: M0320S. New England, BioLabs, Inc.), 3 µl de oligonucleótido Fw, 7 µl de oligonucleótido Rw, 5 µl de Cloruro de Magnesio (25 mM Code: B9021S New England, BioLabs, Inc.) y c.b.p. 50 µl de agua inyectable. Condiciones de ciclado

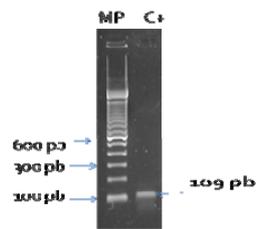


Figura 7. Amplificación del gen LMP1 en gel de agarosa al 2%

La secuenciación de los productos de PCR se realizó con un estuche para secuencia de DNA (BigDye® Terminator Cycle Sequencing Kit). El procedimiento se basa en el método de Sanger y cols.

Como cebadores para las reacciones de secuenciación se emplearon los mismos que para la amplificación pero a una concentración de 0,10mol/µl. De 2 µl del producto de PCR purificado, 2 µl de Terminator big Dye, 1 µl Primer (3,2 pmoles) y H<sub>2</sub>O hasta llevar la reacción a 6 µl.

El programa utilizado fue el siguiente: 96 °C 1 minuto, 96 °C 30 segundos 25 ciclos, 50 °C 15 segundos, 60 °C 3 minutos.

Se realizó la purificación de los productos resultantes de la reacción de secuenciación con la finalidad de eliminar los terminadores marcados que no se han utilizado en la reacción evitando el reflejo de fluorescencia, mediante las columnas de CENTRISEP.

Para la hidratación de las columnas, se agregó 800 µl de agua destilada y se incubó por 2 horas a temperatura ambiente. Se colocaron en tubos de 2 ml y se centrifugan a 3,000 rpm durante 3 minutos para eliminar el exceso de agua. La columna se colocó en tubos de 500 µl, y se agregó el producto de PCR (obtenido del paso anterior) sin tocar el sephadex y se centrifugó a 3,000 rpm por 3 minutos. Se procedió a secar el producto con desecador o ventilación y se resuspendió en 20 µl de TSR (Template Supresión Reagent). Para la secuenciación del producto de DNA secuencia específica, éste se desnaturalizó incubándose a 95 °C por 5 minutos e inmediatamente después se colocó en hielo.

El análisis de la secuencia se llevó a cabo empleando el secuenciador ABI 377 (ABI, Perkin-Elmer®).

Secuenciación de amplificado obtenido de la estandarización de PCR de LMP1

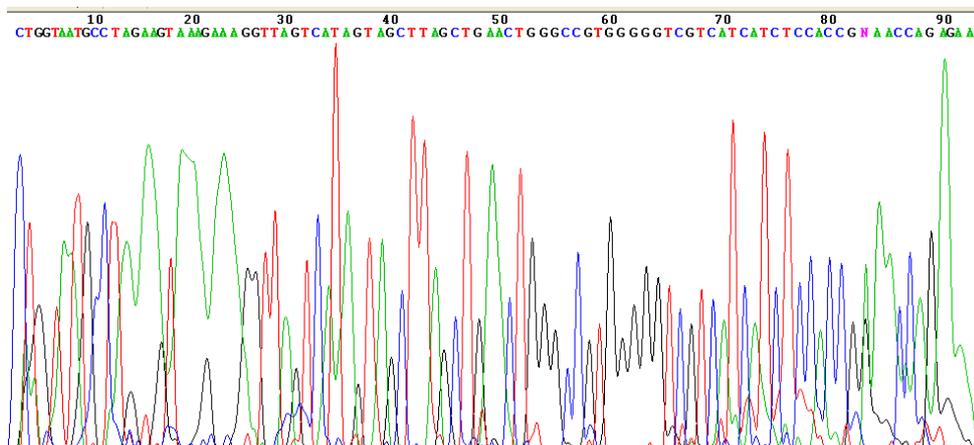


Figura 8. Secuenciación de LMP1

Se realizó un análisis *in silico* (BLAST), de la secuencia obtenida del amplificado del ADN extraído de los linfocitos B de sangre periférica, se encontró una similitud del 98% con la cepa B95-8 reportada ampliamente para identificación del virus de Epstein-Barr obtenida de la base de datos de NCBI.

```
>gb|S75235.1| latent membrane protein LMP-1 [Epstein-Barr virus type 1 EBV-1,
host=human, C15 nasopharyngeal tumor cell line, Mediterranean
isolate, mRNA Partial, 1269 nt]
Length=1269

Score = 161 bits (87), Expect = 3e-36
Identities = 88/89 (98%), Gaps = 0/89 (0%)
Strand=Plus/Minus

Query 2      TGGTAATGCCTAGAAGTAAAGAAAGGTTAGTCATAGTAGCTTAGCTGAACTGGGCCGTGG 61
             |||
Sbjct 1175   TGGTAATGCCTAGAAGTAAAGAAAGGTTAGTCATAGTAGCTTAGCTGAACTGGGCCGTGG 1116

Query 62     GGGTCGTCATCATCTCCACCGNAACCAGA 90
             |||
Sbjct 1115   GGGTCGTCATCATCTCCACCGNAACCAGA 1087
```

Figura 9. BLAST con la cepa B95-8

#### 8.4.4.3 CONDICIONES PARA PCR

Las reacciones de amplificación se llevaron a cabo en un volumen final de 50 µl. Los componentes de cada mezcla y se concentraciones respectivas se muestran en la siguiente tabla.

Materiales utilizados en PCR			
Material	Presentación	Origen	Código
dNTP's	dNTP's mix Grade (200 µl)	PCR QUIAGEN	201900
Buffer termopolimerasa	Buffer libre de magnesio 10x	New England, Biolabs, Inc.	B9005S
Cloruro de Magnesio	25 mM MgCl	New England, Biolabs, Inc.	B9021S
Taq polimerasa	Taq/DNA polymerase	New England, Biolabs, Inc.	M0320S

Tabla 11. Materiales utilizados en PCR

Las condiciones estandarizadas por cada gen se enlistan en la siguiente tabla:

Gen	Oligo Fw 10 pm (µl)	Oligo Rw 10 pm (µl)	dNTP's 25 pm (µl)	Cloruro de magnesio (µl)	Buffer termo polimerasa (µl)	Taq Polimerasa 5U/µl (µl)
<b>β-globina</b>	1	1	4	1.5	5	1
<b>LMP1</b>	1.2	2.6	4	1.5	5	0.5
<b>LMP2</b>	6.6	8	4	1.5	5	0.5
<b>EBNA2A</b>	3.4	4.5	4	1.5	5	1
<b>EBNA2B</b>	4.2	3.6	4	1.5	5	1

Tabla 12. Condiciones de PCR

Los protocolos de amplificación incluían siempre una incubación inicial a 94°C durante treinta segundos, 35 ciclos consecutivos de desnaturalización, hibridación de oligonucleótidos y extensión y un paso final de extensión a 72°C durante 5 minutos. Las condiciones concretas de amplificación por gen se detallan en la siguiente tabla.

<b>Condiciones de amplificación del virus de Epstein-Barr</b>			
	Temperatura	Tiempo	Número de ciclos
<b>Desnaturalización inicial</b>	94°C	5 minutos	1
<b>Desnaturalización</b>	94°C	30 segundos	35
<b>Hibridación</b>			
<b>B-globina</b>	58	30 segundos	35
<b>LMP1</b>	60	30 segundos	35
<b>LMP2</b>	62	30 segundos	35
<b>EBNA 2A</b>	64	30 segundos	35
<b>EBNA 2B</b>	58	30 segundos	35
<b>Extensión</b>	72°C	30 segundos	35
<b>Extensión final</b>	72°C	10 minutos	1
	4°C	∞	1

Tabla 13. Condiciones de amplificación

En todos los experimentos se incluyó un control positivo de amplificación consistente de ADN extraído de linfocitos B con VEB. Se incluyó también un tubo conteniendo todos los componentes de la reacción excepto el ADN para descartar la existencia de contaminaciones.

Una vez realizada la amplificación, 10 µL de cada producto de amplificación de la PCR se sometieron a electroforesis en geles de agarosa al 2% con 5 µg/ mL de bromuro de etidio en TBE 1X a 100 voltios durante una hora. Finalizada la electroforesis los fragmentos amplificados se visualizaron colocándolos en el transiluminador.

## 9 RESULTADOS

El grupo de estudio fue constituido por 58 biopsias de ganglio linfático incluidas en parafina. Las características clínicas e histológicas de los dos grupos y los resultados obtenidos por inmunohistoquímica y técnicas moleculares son las siguientes:

### 9.1 CARACTERÍSTICAS DEMOGRÁFICAS

#### 9.1.1 Distribución por sexos

De los 58 casos 44 (75.8%) correspondieron al sexo masculino, mientras los 14 (24.1%) casos restantes correspondieron al sexo femenino. Con una relación 3.1:1, siendo el sexo masculino el de mayor incidencia.



Figura 10. Distribución por sexo

La distribución por sexo de grupo caso, casos con diagnóstico histopatológico de LHc y grupo control, casos que no contaron con el diagnóstico de LHc fue la siguiente:

Distribución por sexo del grupo caso y control				
N=58				
sexo	LHc +	%	LHc -	%
Muestra (n)	41	70.6	17	29.3
Masculino	32	75.6	12	70.5
Femenino	9	21.9	5	29.4

Tabla 14. Distribución por sexo de los grupo caso y control

### 9.1.2 DISTRIBUCIÓN POR EDAD

El intervalo de edades, en el momento del diagnóstico del linfoma, en el conjunto de todos los paciente estaba comprendido entre 0.3 a 15 años con una media aritmética de 5.6 años y una desviación estándar de +/- 4.2.

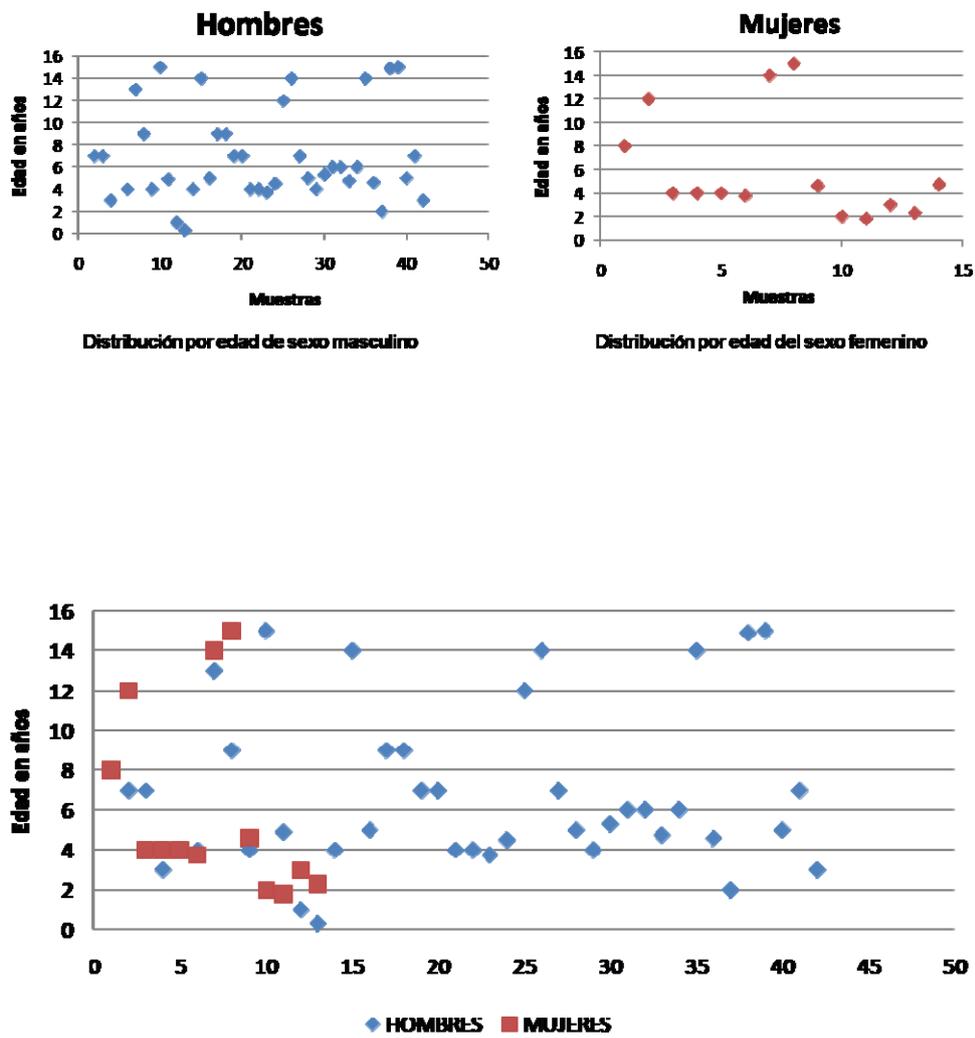


Figura 12. Distribución por edad de ambos sexos

DISTRIBUCIÓN POR EDAD EN AMBOS SEXOS			
Sexo	No. muestra	Rango de edad (años)	Media aritmética (años)
Masculino	44	0.3 a 15	5.54
Femenino	14	3 a 13	4.70

Tabla 15. Distribución por edad en ambos sexos

### 9.1.3 DISTRIBUCIÓN POR VARIEDAD HISTOLÓGICA

La agrupación de los 41 linfomas de Hodgkin clásico por tipos histológicos es la siguiente:

CARACTERÍSTICAS	N= 41	Porcentaje (%)
<b>Histología</b>		
EN	16	39.0
CM	16	39.0
DL	4	9.75
PL	2	4.87
LH NO ESPECIFICO	3	7.31

Tabla 16. Distribución por variedad histológica

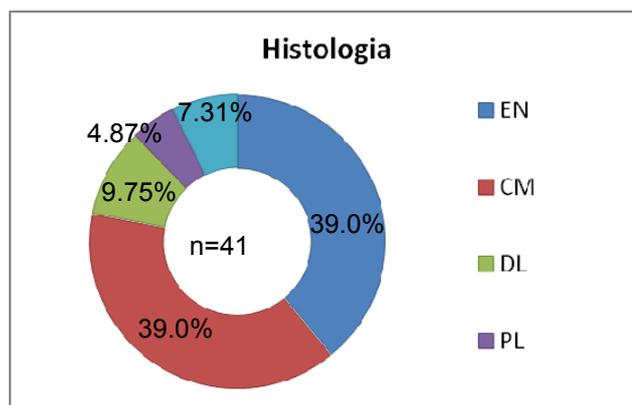


Figura13. Distribución por variedad histológica

### 9.1.4 RELACIÓN LOCALIZACIÓN

De las 58 biopsias de ganglios incluidas en parafina, 17 casos (29.3%) fueron ganglios de localización cervical, 14 casos (24.1%) de localización mesenterial, 2 casos (3.4%) ganglios de localización retroperitoneal, axilar y supraclavicular. 1 de los casos (1.7%) fueron de localización infraclavicular y paraórtico.

REGIÓN	LHcEN	LHcCM	LHcDL	LHcPL	No específico	Reactivo
<b>Muestra n=58</b>	16	16	4	2	3	17
<b>Retroperitoneal n=2</b>	-	1	1	-	-	-
<b>Cervical izquierdo n=17</b>	5	6	1	1	1	3
<b>Cervical derecho n=17</b>	4	7	2	-	1	3
<b>Infraclavicular n=1</b>		1	-	-	-	-
<b>Axilar n=2</b>	2	-	-	-	-	-
<b>Mediastinal n=2</b>	1	-	-	-	1	-
<b>Mesenterio n=14</b>	4	-	-	-	-	10
<b>Paraortico n=1</b>	-	-	-	-	-	1
<b>Supraclavicular n=2</b>	-	1	-	1	-	-

Tabla 17. Localización de los ganglios incluidos en el estudio

## 9.2 INMUNOFENOTIPO

Se utilizó la técnica Inmunohistoquímica para la determinación del inmunofenotipo de LHc identificó clonalidad a CD 30 en 40 casos 97.5% de los cuales 41 casos 100% presentaron expresión de la proteína CD 45 , 36 (87.8) de los casos fueron negativos para CD20.

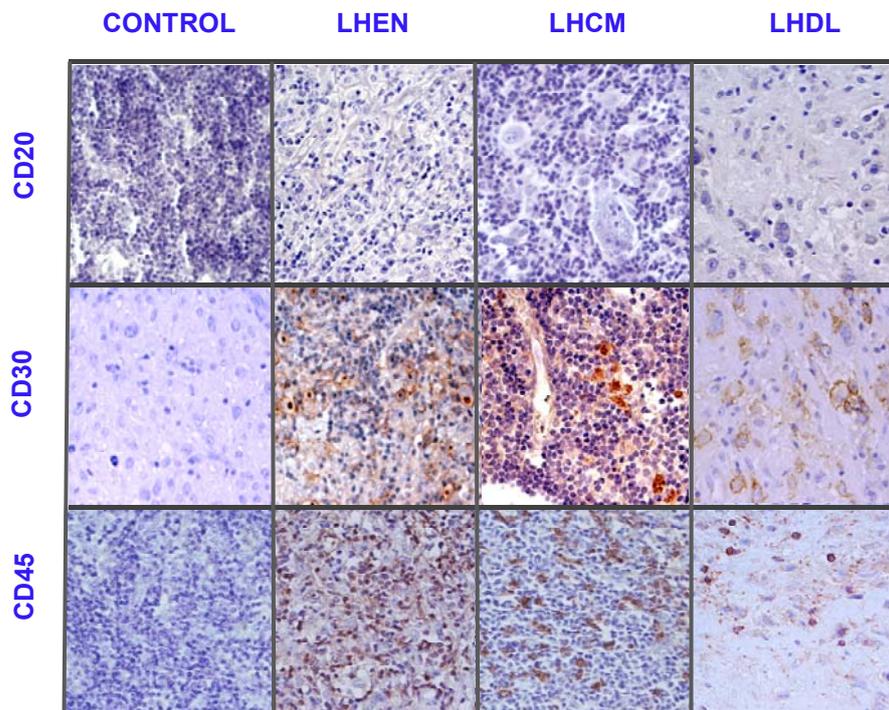


Figura 13. Micrografías de inmunohistoquímica (40X) que son representativas de cada tipo de variedad del LHc

Identificación del inmunofenotipo de las células de RS en el LHc					
Marcador	LHEN	LHCM	LHDL	LHPL	Reactivo
CD 30	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	NEGATIVO
CD 45	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	NEGATIVO
CD 20	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	POSITIVO

Tabla 18 Inmunofenotipo para homogenizar la muestra

### 9.3 VARIABILIDAD DE EXPRESIÓN ENTRE NOTCH1 Y PAX5

#### 9.3.1 EXPRESION DE PAX5

EXPRESIÓN DE PAX5 EN CÉLULAS DE REED-STERNBERG								
Variedad	Muestra total	%	PAX5	%	1	2	3	4
LHc (n)	41	79.6	11	26.8	10	4	6	-
LHEN	16	39	4	25	1	1	2	-
LHCM	16	39	4	25	2	1	1	-
LHDL	4	9.7	1	25	1	-	-	-
LHPL	2	4.8	-	-	-	-	-	-
LH NO ESP	3	7.3	2	75	-	-	2	-
CONTROL	17	29.3	9	57.9	6	2	1	-

Tabla 19. Expresión de PAX5 en células de RS

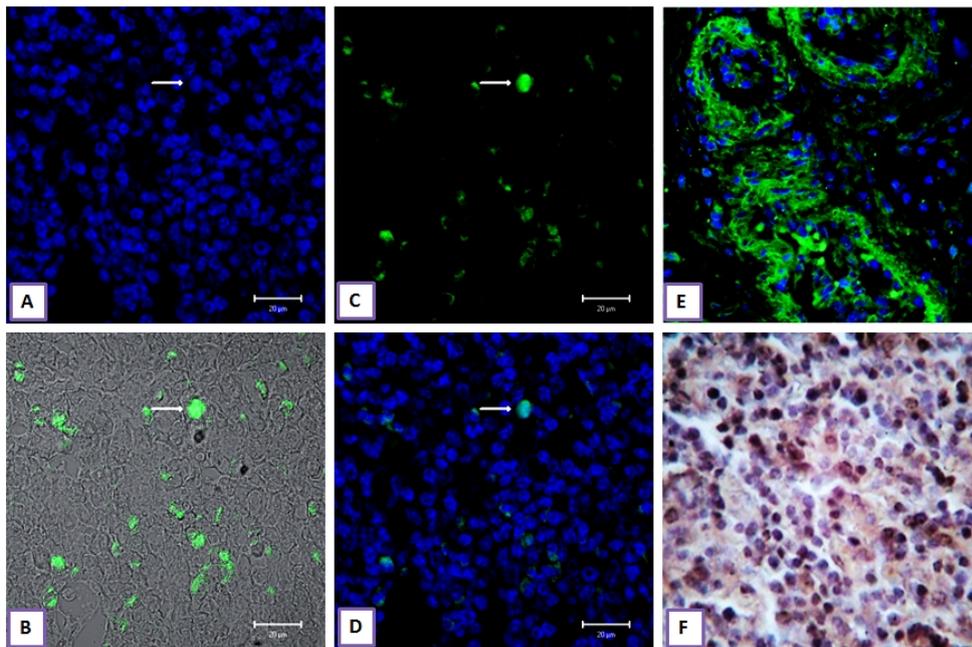


Figura 14. Inmunohistoquímica e inmunofluorescencia de ganglio linfático para PAX5 (40X). A: Inmunofluorescencia que muestra el marcaje con DRAQ7™ para núcleos (azul). B. Localización de la expresión de PAX5 en canal de campo claro marcado con FITC (verde). C. Expresión de PAX5 en un solo canal (verde). D. Micrografía que muestra la expresión de PAX5 y el marcaje para núcleos de forma simultánea. E. Cáncer de colon control positivo para la expresión de PAX5 (verde) y F. Inmunohistoquímica de ganglio linfático que muestra la expresión de PAX5 (control positivo).

### 9.3.2 EXPRESIÓN DE NOTCH1

EXPRESIÓN DE NOTCH1 EN CÉLULAS DE REED-STERNBERG								
Variedad	Muestra total	%	NOTCH1	%	1	2	3	4
<b>Muestra (n)</b>	58	100	35	85.3	19	13	2	1
<b>LHEN</b>	16	39	11	68.7	6	5	-	-
<b>LHCM</b>	16	39	9	56.2	4	3	1	1
<b>LHDL</b>	4	9.7	4	100	2	1	1	-
<b>LHPL</b>	2	4.8	-	-	-	-	-	-
<b>LH NO ESP</b>	3	7.3	3	100	2	1	-	-
<b>CONTROL</b>	17	29.3	8	47	5	3	-	-

Tabla 20. Expresión de NOTCH1 en células de RS

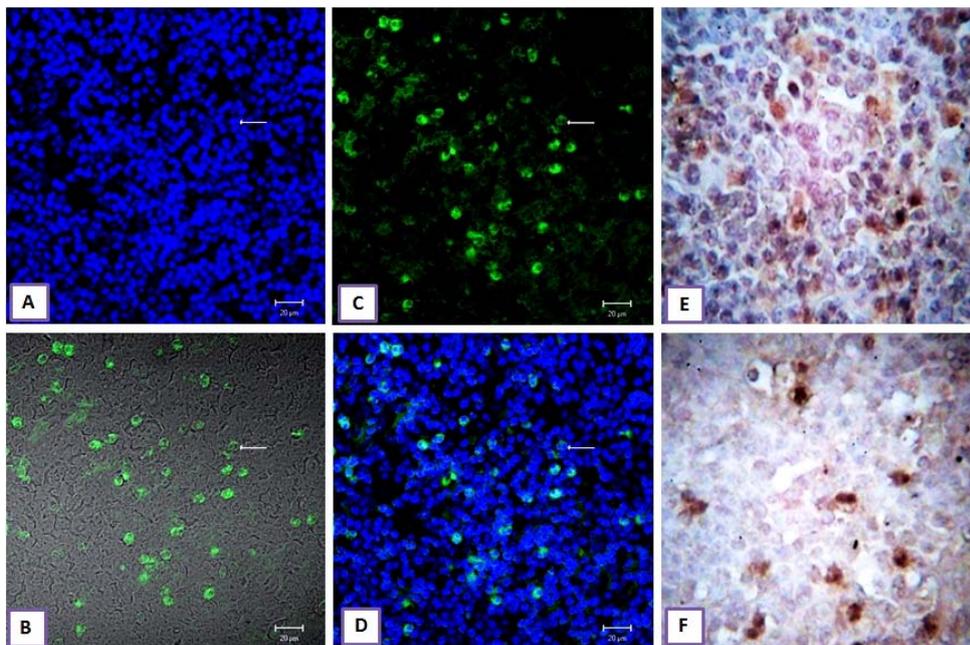


Figura 15. Inmunohistoquímica e inmunofluorescencia de ganglio linfático para NOTCH1(40X). A: Inmunofluorescencia que muestra el marcaje con DRAQ7<sup>TM</sup> para núcleos (azul). B. Localización de la expresión de NOTCH1 en canal de campo claro marcado con FITC (verde). C. Expresión de NOTCH1 en un solo canal (verde). D. Micrografía que muestra la expresión de NOTCH1 y el marcaje para núcleos de forma simultánea. E y F. Inmunohistoquímica de ganglio linfático que muestra la expresión de NOTCH1 (control positivo).

### 9.3.3 DOBLE INMUNOFLUORESCENCIA PAX5/NOTCH1

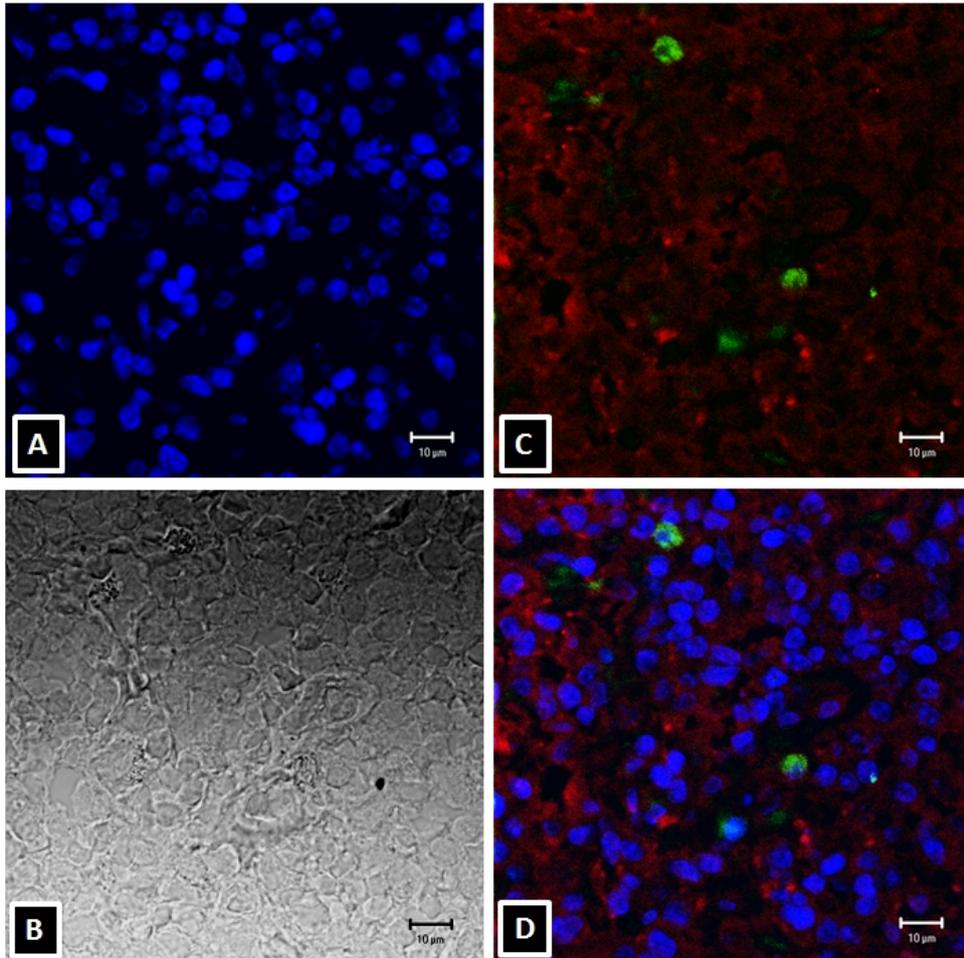


Figura 16. Doble inmunofluorescencia para PAX5 y NOTCH1 en LHCM. A. Muestra la tinción de núcleos con DRAQ7<sup>TM</sup> (azul). B. Imagen que muestra la morfología del LHCM con el canal de campo claro. C. Se muestra la inmunotinción para PAX5 (verde) y NOTCH1 (rojo) con dos canales. D. Imagen que muestra que no existe co-expresión de los marcadores en la misma célula (3 canales).

## 9.4 DETECCIÓN DEL VIRUS DE EPSTEIN-BARR

### 9.4.1 EXPRESION DE LA PROTEINA LATENTE DE MEMBRANA 1

La detección del virus de Epstein-Barr por la técnica de inmunohistoquímica mediante la expresión de la proteína LMP1 fue en el 62% (36/58) de las muestras estudiadas, en el grupo caso con diagnóstico histopatológico de LHc (LHc+) se observó positividad en un 73.1%( 30/41).

Composición de microfotografías representativas (40X) de la expresión de la proteína latente de membrana 1 (LMP1) en las diferentes variedades de Linfoma de Hodgkin clásico.

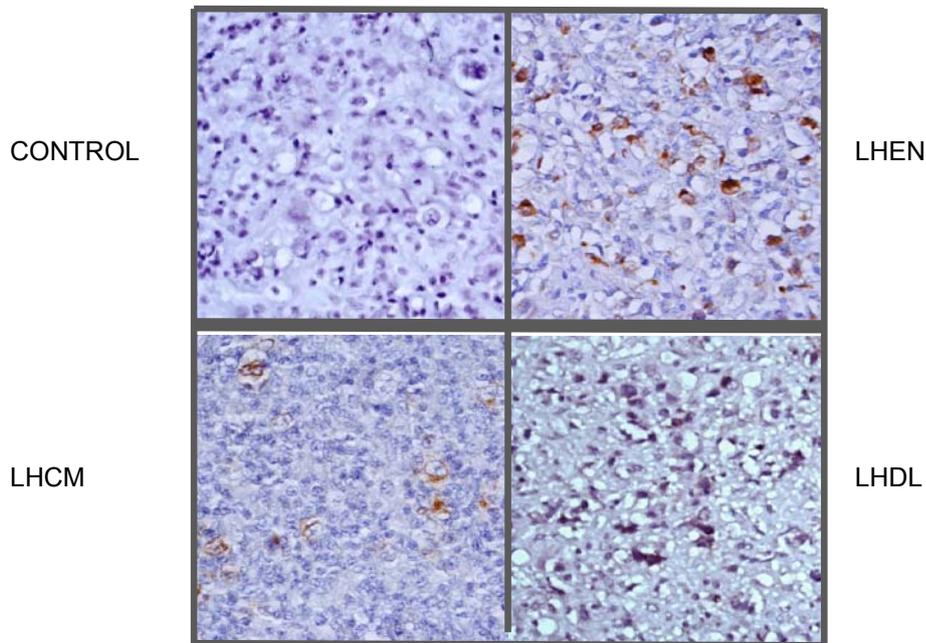


Figura 17. Detección del Virus de Epstein-Barr (LMP1) por Inmunohistoquímica

La positividad del virus en relación a la histología se detalla en la tabla siguiente:

IDENTIFICACIÓN DE LMP1 POR INMUNOHISTOQUÍMICA						
	Total muestra	%	EBV+	%	EBV-	%
			36	87.7	22	37.9
<b>LHc +</b>	41	70.6	30	73.1	11	26.8
<b>Histología</b>						
<b>EN</b>	16	39	12	75	4	25
<b>CM</b>	16	39	11	68.7	5	31.5
<b>DL</b>	4	9.7	3	75	1	25
<b>PL</b>	2	4.8	2	100	-	
<b>NESP</b>	3	7.3	2	75	1	25
<b>LHc -</b>	17	29.3	6	35.2	11	64.7

Tabla 21. Características histológicas de los casos positivos a EBV

La variedad con mayor expresión de LMP1 fue EN, con una positividad del 75% (12/16), en 16 (44.4%) de los casos positivos a EBV+ se cuantificaron de 1 a 20 células de Reed-Sternberg por campo, los detalles se muestran en la siguiente tabla:

IDENTIFICACIÓN DEL VIRUS DE EPSTEIN BARR EN LAS CÉLULAS DE REED-STERBERG EN LINFOMA DE HODGKIN POR IHQ								
Variedad	Muestra total	%	EBV+	%	1	2	3	4
<b>Muestra (n)</b>	58	100	36	62	16	9	4	7
<b>LHEN</b>	16	39	12	75	8	1	2	1
<b>LHCM</b>	16	39	11	68.7	2	2	2	5
<b>LHDL</b>	4	9.7	3	75	1	1	-	1
<b>LHPL</b>	2	4.8	2	100	-	2	-	-
<b>LH NO ESP</b>	3	7.3	2	75	1	1	-	-
<b>CONTROL</b>	17	29.3	6	35.2	4	2	-	-

Tabla 21. Cuantificación de células de RS positivas a EBV por IHQ

## 9.4.2 DETECCIÓN DE LMP1 Y 2 POR PCR

### Detección del EBV

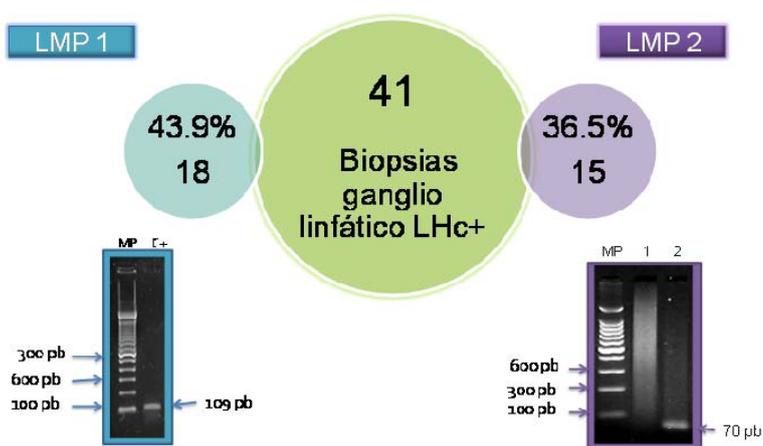


Figura 18. Detección del EBV mediante amplificación de LMP1 y LMP2

IDENTIFICACIÓN DE EBV MENDIANTE LA AMPLIFICACION DE LOS GENES LMP1 Y LMP2						
	Total muestra	%	LMP1	%	LMP2	%
<b>LHC +</b>	41	70.6	18	43.9	15	36.5
<b>Sexo</b>						
<b>Masculino</b>	32	75.6	13	72.2	9	60
<b>Femenino</b>	9	21.9	5	27.7	6	40
<b>Histología</b>						
<b>EN</b>	16	39	6	33.3	4	26.6
<b>CM</b>	16	39	8	44.4	9	60
<b>DL</b>	4	9.7	2	11.1	1	6.6
<b>PL</b>	2	4.8	1	5.5	2	13.3
<b>NESP</b>	3	7.3	1	5.5	1	6.6

Tabla 23. Características histológicas de los casos positivos a EBV por PCR

### 9.4.3 DETECCIÓN DEL EBER POR HIBRIDACIÓN IN SITU

Del número total de ganglio estudiados, se observó positividad al virus de Epstein-Barr mediante la técnica de hibridación in situ para EBER's en 33 (80.4%) de los casos con diagnóstico de LHc, y en 7 (41.1%) de los casos del grupo control. Mientras que 8 (19.5%) de los casos de LHc y 10 (58.8%) de los ganglios negativos al diagnóstico de LHc fueron negativos al virus de Epstein Barr.

Microfotografías representativas (40x) de la detección de Virus de Epstein-Barr mediante hibridación in situ en las diferentes variedades de LHc.

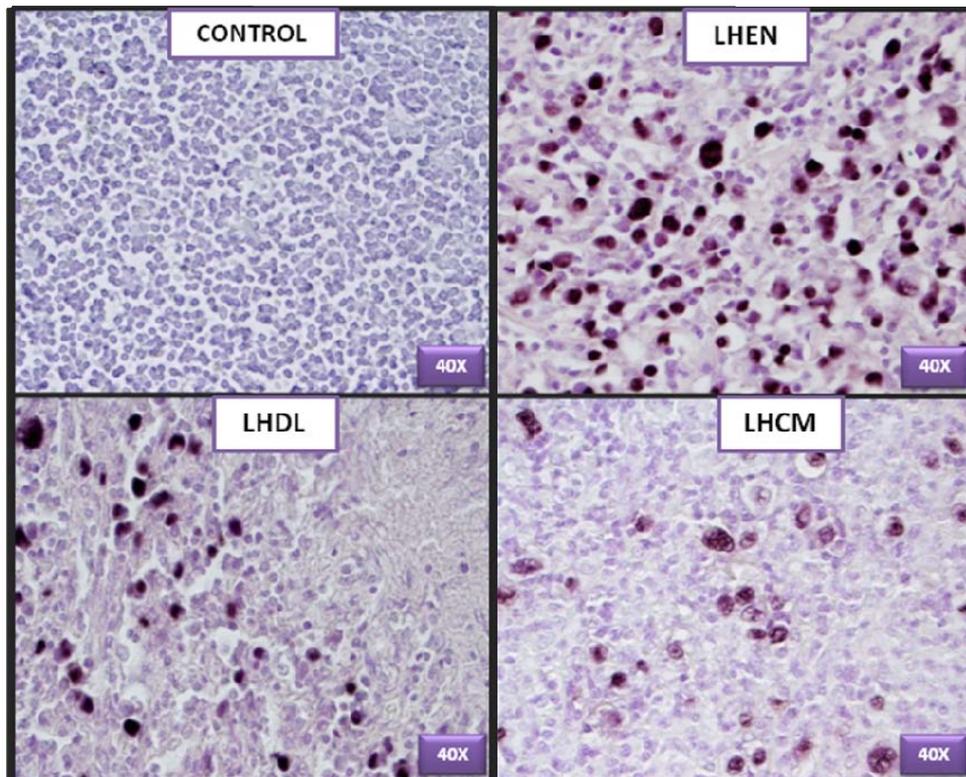


Figura 19. Detección de EBER's (EBV) por hibridación in situ

Se identificó positividad de EBER's de más de 60 células de RS por campo con un aumento de 40X en el 45. 4% (15/33), de 1-20 células en 42.4% (14/33), de 21-60 células en 9% (2/33) y de 41-60 células en 3% (1/33) en los casos diagnosticados con LHc.

La identificación del virus por variedad histológica se detalla en la siguiente tabla.

IDENTIFICACIÓN DEL VIRUS DE EPSTEIN BARR EN LAS CÉLULAS DE REED-STERBERG EN LINFOMA DE HODGKIN POR ISH								
Variedad	Muestra total	%	EBV+	%	1	2	3	4
<b>Muestra (n)</b>	58	100	33	80	28	3	1	15
<b>LHEN</b>	16	39	13	81.2	7	-	-	6
<b>LHCM</b>	16	39	12	75	6	2	-	4
<b>LHDL</b>	4	9.7	3	75	-	-	1	3
<b>LHPL</b>	2	4.8	2	100	-	-	-	2
<b>LH NO ESP</b>	3	7.3	1	33.3	1	-	-	-
<b>CONTROL</b>	17	29.3	7	41.1	7	-	-	-

Tabla 24. Cuantificación de células de RS positivas a EBV por ISH

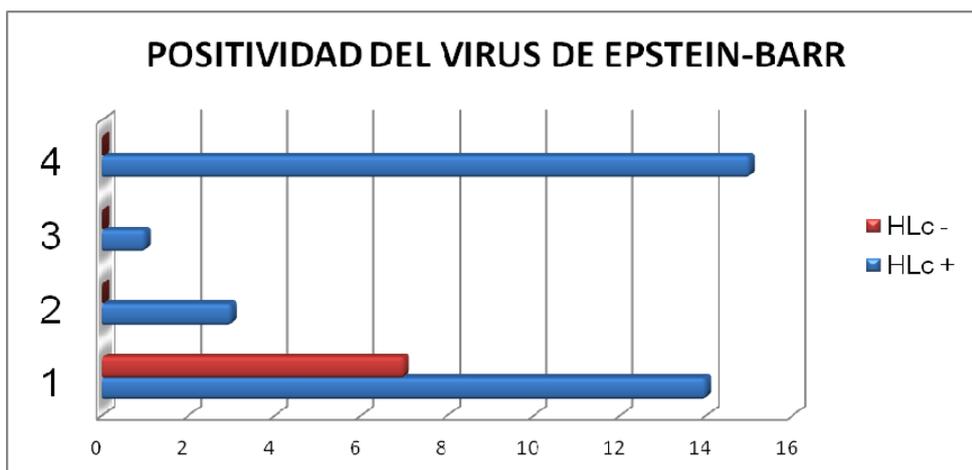


Figura 20. Positividad del virus de EBV por hibridación in situ

La variedad con mayor asociación al virus de Epstein-Barr fue esclerosis nodular en un 81.2% (13/33). Del grupo caso (LHc+ y EBV +) el 68,6 % (24/33) fueron del sexo masculino con una edad media de 7.4.

<b>A. Grupo con diagnostico de LHc que muestra la asociación con el VEB</b>						
	Muestra total	%	EVB+	%	EBV-	%
<b>LHc+</b>	41	70.6%	33	80.4	8	19.5
<b>Sexo</b>						
<b>Masculino</b>	32	75.6%	24	69.6	8	100
<b>Femenino</b>	9	21.9	9	27.2	-	-
<b>Edad media (años)</b>						
<b>Masculino</b>	5.5		7.4		6.1	
<b>femenino</b>	4.7		8.8		-	
<b>Histología</b>						
<b>EN</b>	16	39	13	81.2	3	18.75
<b>CM</b>	16	39	12	75	4	25
<b>DL</b>	4	9.7	4	100	-	-
<b>PL</b>	2	4.8	2	100	-	-
<b>NEsp</b>	3	7.3	2	66.6	1	33.3

<b>B. Grupo control que muestra la asociación con el VEB</b>						
	Muestra total	%	EVB+	%	EBV-	%
<b>LHc-</b>	17	7	41.2	10	58.8	
<b>Sexo</b>						
<b>Masculino</b>	12	70.5	71.4	7	70	
<b>Femenino</b>	5	29.4	28.5	3	30	
<b>Edad media (años)</b>						
<b>Masculino</b>	5.5	5.5		3.1		
<b>femenino</b>	4.7	6.5		2.3		

Tabla 25. Características histológicas de los casos positivos a EBER's

## 9.5 GENOTIPIFICACIÓN DEL VIRUS DE EPSTEIN-BARR

Los casos positivos a VEB por hibridación in situ se genotipificaron siendo el subtipo B predominante en nuestra población de estudio con un 30.3% (10/33) y identificándose en cuatro casos (12.1%) la existencia de los dos subtipos. Siendo la variedad celularidad mixta la que presentó mayor asociación al subtipo A en un 31.5 % (5/7), los detalles de la genotipificación se muestran en la siguiente tabla.

GENOTIPIFICACIÓN DEL VIRUS DE EPSTEIN-BARR										
	Total muestra	%	EBV+	%	EBNA 2A	%	EBNA 2B	%	EBNA 2A/2B	%
<b>LHc +</b>	41	70.6	33	80	7	21.2	10	30.3	4	12.1
<b>Histología</b>										
<b>EN</b>	16	39	13	80	2	12.5	2	12.5	1	6.25
<b>CM</b>	16	39	12	81.2	5	31.2	4	25	3	18.7
<b>DL</b>	4	9.7	4	100	-	-	2	12.5	-	
<b>PL</b>	2	4.8	2	100	-	-	1	50	-	
<b>NESP</b>	3	7.3	2	66.6	-	-	1	33.3	-	

Tabla 26. Genotipificación del virus de Epstein-Barr

El objetivo principal de este estudio fue el identificar la expresión de los genes PAX5 y NOTCH en muestras provenientes de pacientes pediátricos con diagnóstico de LHc así como su asociación con la presencia del VEB. La expresión de estos genes han sido involucrado en el proceso neoplásico como cáncer de pulmón, próstata, leucemias y linfomas (Kanteti 2009; Desouki 2010) .

Estudios epidemiológicos en países desarrollados han reportado una edad de presentación del LHc con un patrón bimodal, es decir en adolescentes y adultos mayores. En nuestro estudio la edad promedio del diagnóstico de LHc fue de 5.6 años, edad dentro del rango reportado por países como Asia e Israel (Soares A 2007; Shenoy A 2010), con predominio del sexo masculino que coincide con estudios realizados por Grufferman and Delzell (Grufferman and Delzell 1984). El subtipo histológico más frecuente en nuestra población de estudio fueron las variedades esclerosis nodular y celularidad mixta en igual porcentaje (39%), seguido por depleción linfocítica con 9.7% y el 4.8% restante correspondió a la histología con predominio linfocítico. Estos datos difieren de lo publicado en estudios epidemiológicos en países desarrollados donde se concluye que el subtipo más frecuente es celularidad mixta (30%-35%) seguido de predominio linfocítico (10-20%)(Grufferman and Delzell 1984; Punnett, Tsang et al. 2010). Estudios epidemiológicos en países desarrollados sugieren dos tipos de LHc pediátrico de acuerdo a la edad de presentación: Infantil y Adolescentes y Adultos jóvenes (AYA). LHc pediátrico se presenta en menores de 14 años de edad, y de manera típica LHc se presenta en el grupo AYA.

PAX5 es un factor de transcripción expresado normalmente durante la diferenciación de las células B y es detectado en la mayoría de las células neoplásicas que tienen este origen. Estudios en médula ósea y en modelo animal han detectado inmunoreactividad nuclear de PAX5 en el 88%. En nuestro grupo caso (LHc) se identificó la expresión de PAX5 en el 26.8% menor a lo reportado en investigaciones sobre esta proteína y LHc (Dong HY 2004; Mhaweche-Fauceglia P 2007), de manera interesante hasta donde sabemos, no existen reportes entre la asociación de las variedades histológicas del LHc con la expresión PAX5. Nuestros ensayos identificaron a la proteína en el 25% de los casos de esclerosis nodular, celularidad mixta y depleción linfocitaria, de los cuales el 57.9% (9/17) se cuantificaron en el rango 1(0 a 20 células de RS positivas), a pesar de la expresión de PAX5 suponemos que no es suficiente para evitar la pérdida del fenotipo B en la célula de RS. (Jensen K 2007).

En linfocitos, la actividad de NOTCH1 se asocia con el desarrollo de las células T durante la linfopoyesis. Se ha reportado una alteración en la expresión de NOTCH1 en diferentes leucemias y linfomas. NOTCH1 se identificó en el 85.3% de los casos estudiados, presentando una expresión en el 100% en la variedad depleción linfocítica y un 68% en esclerosis nodular. Este resultado puede estar asociado a la influencia del microambiente característico de esta variedad de linfoma donde la presencia de células que expresan inmunofenotipo T influyen de manera directa mediante una señalización paracrina adicional a la expresión de miRNAs sobre sus células vecinas que favorecen la transformación de las células de RS (He Y 2003; Dallas M 2005; Smith E 2009). La activación de NOTCH1 en células de RS puede ser secundaria a cambios de expresión de los factores de transcripción específicos de célula B, y se ha propuesto que disminuya su regulación (Maillard I 2003). Esta idea es soportada por recientes investigaciones que demuestran como la actividad de NOTCH1 en las células de RS es responsable de la degradación de E47 componente proteico de E2A (Roessler 2006) que es un factor de transcripción junto con EBF necesario para la expresión de PAX5 (Anderson 2009).

En algunos casos se identificó la expresión de PAX5 y NOTCH1 simultáneamente por medio de Inmunohistoquímica, lo que causaba confusión respecto a la regulación que tiene Notch1 sobre Pax5. En nuestro entendimiento si NOTCH1 se expresa es de suponerse que inhibe la expresión de PAX5 por lo que fue necesario identificar si se expresaba ambas proteínas en la misma célula de RS. Para este fin se realizó una doble inmunodetección, encontrando que no existía colocalización nuclear de las proteínas estudiadas.

La metodología más sensible para identificar la infección del virus de Epstein-Barr es la detección de EBER's ya que es el único gen expresado en los tres tipos de latencia. La variedad con mayor positividad al virus fue la esclerosis nodular, resultado que difiere a lo reportado en la literatura (Gandhi M 2004). Los estudios realizados sobre la incidencia del virus en LHc fueron hechos en poblaciones desarrolladas lo que permite suponer que el comportamiento de infectibilidad es diferente en poblaciones en vías de desarrollo o no desarrolladas (Adelusola KA 2009; Annegret Hofscheier 2011) Es de vital importancia el estudio de asociación entre los genes expresados por el VEB y los genes PAX5 y NOTCH1 debido a su asociación para el mantenimiento, transformación y proliferación de las células RS. La identificación de EBER's en los HLc+ fue en el 80% de los casos (33/58), mayor a lo reportado por (Küppers 2003), la variedad con predominio linfocítico fue la que presentó mayor positividad, lo cual se cree que está relacionado con la cantidad de infiltrado celular, un microambiente propicio para el desarrollo y

mantenimiento de un inmunofenotipo aberrante en la célula RS (Nam-Cha S 2009).

La expresión de LMP2A por la infección del VEB en células de RS se propone active de manera constitutiva la vía Notch. LMP2A activa mediante NOTCH1 cambios transcripcionales que resultan en la pérdida de la identidad de las células B (Anderson 2009) al degradar E47 necesario para la transcripción de PAX5 indispensable para expresión de BCR funcional fundamental para la identidad de célula B. De los casos positivos a EBER's se tipificó el subtipo mediante la amplificación de EBNA 2, el cual juega una papel importante en la proliferación e inmortalización de las células de RS (Kohlhof, Hampel et al. 2009) y se ha asociado con la activación de la vía Notch (Strobl, Hofelmayr et al. 2000). El subtipo de VEB con mayor incidencia en LHc en pacientes pediátricos de nacionalidad mexicana fue el subtipo B (30%), mientras que el subtipo A se identificó en el 21% de los casos. Estos resultados son similares a lo reportado en países como Brasil y Nigeria (Adelusola KA 2009; Barros MH 2011) pero completamente diferente a lo reportado en Suiza y Bélgica (Geertsen, Espander-Jansson et al. 1994; Trimeche M 2007). Se identificó en 4 de los casos (12.1%) la presencia de ambos subtipos, tres de ellos con el diagnóstico histopatológico de celularidad mixta, este dato resulta muy interesante ya que a nivel mundial solo se han reportado la presencia de los dos antígenos A y B en pacientes con VIH (Sculley T 1990). La expresión de ambas cepas del VEB está íntimamente ligada a la respuesta inmune por epitopes de EBNA2 comunes para el subtipo A y B (Gratama J 1992), esto nos hace pensar que más de un virus pueden infectar a un paciente, y que esta doble infección pueda deberse a un estado de inmunosupresión.

Existen pocos estudios realizados en muestras de pacientes en edad pediátrica con diagnostico de LHc que identifiquen la expresión de PAX5 y la co-infección del VEB. Dentro de nuestro conocimiento, no existen reportes sobre la expresión de NOTCH1 en pacientes con diagnostico de linfoma y tampoco asociado al VEB. Los estudios encontrados sobre la participación de notch1 en desarrollo tumoral del LHc han sido realizados en modelos animales y líneas celulares cancerosas. Nuestro estudio denota relevancia debido a que no existe en México identificación de los subtipos del VEB, siendo los primeros en identificar la mezcla de virus en población pediátrica.

## 11 CONCLUSIONES

1. La edad promedio de nuestra población de estudio es menor a lo reportado en países en vías de desarrollo.
2. La variedad histológica con mayor incidencia en los casos de LHc fue esclerosis nodular, diferente a lo reportado en la literatura.
3. En el 85.3% de los casos con diagnóstico de LHc se identificó la expresión de NOTCH1, lo que confirma la pérdida del inmunofenotipo B en las células de RS en cultivos celulares y modelo animal. Datos no reportados en pacientes pediátricos con LHc y su relación con el tipo de celularidad.
4. El virus de Epstein-Barr se identificó en el 80% de los casos de linfoma de Hodgkin clásico, mayor a lo reportado.
5. El subtipo con mayor incidencia en población infantil mexicana fue el B, que concuerda con estudios previos en nuestra población y que fueron realizados por un grupo de Investigación alemán.
6. Se identificaron en cuatro casos la expresión simultánea del antígeno EBNA 2 A y B. Datos reportados únicamente en pacientes con VIH.

## 12 PERSPECTIVAS

1. Estudiar la relación entre la expresión de PAX5, NOTCH1 y los genes de latencia del VEB con las manifestaciones clínicas y pronóstico.

~~1.~~

2. Realizar un estudio de asociación con las variedades de LHc, fenotipo y el número de copias de los genes PAX5 y NOTCH1.

~~2.~~

3. Comprobar que la inhibición de NOTCH1 a PAX5 es por medio de la degradación de E47 componente proteico de E2A, factor necesario para la expresión de PAX5 como se propone en líneas celulares y modelo animal.

~~3.~~

4. Determinar el número de copias del VEB en las diferentes variedades y su asociación con el inmunofenotipo de las células RS.

~~4.~~

5. Realizar estudio de las variedades en la secuencia de la proteína latente de membrana 1 en población pediátrica mexicana y si existe o no relación con el pronóstico.

~~5.~~

6. Estudio epidemiológico en población mexicana sobre la incidencia del LHc con marcadores específicos y la presencia de VEB.

Con formato: Sangría: Izquierda: 1.9 cm, Sin viñetas ni numeración

Con formato: Fuente: (Predeterminado) Arial, 12 pto

Con formato: Izquierda, Sangría: Izquierda: 1.27 cm, Sin viñetas ni numeración

Con formato: Sangría: Izquierda: 1.9 cm, Sin viñetas ni numeración

Con formato: Sangría: Izquierda: 1.9 cm, Sin viñetas ni numeración

Con formato: Fuente: (Predeterminado) Arial, 12 pto

Con formato: Izquierda, Sangría: Izquierda: 1.27 cm, Sin viñetas ni numeración

Con formato: Sangría: Izquierda: 1.9 cm, Sin viñetas ni numeración

Con formato: Sangría: Izquierda: 1.9 cm, Sin viñetas ni numeración

### 13 BIBLIOGRAFIA

Adelusola KA, T. N., Rotimi O, Durosinmi M (2009). "Epstein Barr virus latent membrana protein-1 in Hodgkin's lymphoma in Nigerians." *African Health Sciences* **9**: 174-178.

Adriaenssens, E. e. a. (2004). "A novel dominant-negative mutant form of Epstein-Barr virus latent membrane protein-1 (LMP1) selectively and differentially impairs LMP1 and TNF signaling pathways." *Oncogene* **23**: 26-81-2693.

Anderson, L. a. L. R. (2009). "Epstein-Barr virus latent membrane protein 2A exploits Notch1 to alter B cell identity in vivo." *Lymphoid Neoplasia* **113**: 108-115.

Annegret Hofscheier, A. P., et. al. (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 German population." *Modern Pathology*: 1-9.

Asano, N. Y., K. et & al (2009). "Age-related Epstein-Barr virus (EBV) associated B-cell lymphoproliferative disorders: comparison with EBV-positive classical Hodgkin lymphoma in elderly patients." *Blood* **113**(12): 2629-2636.

Barros MH, H. R., Niedobitek G. (2011). "Disease patterns in pediatric classical Hodgkin lymphoma: a report from a developing area in Brazil." *Hematological Oncology*.

Blake, N. (2010). "Immune evasion by gammaherpesvirus genome maintenance proteins." *Journal of General Virology* **91**: 829-846.

Bornkamm, G. a. H., Wolfgang (2001). "Molecular virology of Epstein-Barr virus." *Philosophical Transactions of The Royal Society Biological Sciences* **356**: 437-459.

Campo, E., S. H. Swerdlow, et al. "The 2008 WHO classification of lymphoid neoplasms and beyond: evolving concepts and practical applications." *Blood* **117**(19): 5019-5032.

Cancian, L., R. Bosshard, et al. (2011). "C-Terminal Region of EBNA-2 Determines the Superior Transforming Ability of Type 1 Epstein-Barr Virus by Enhanced Gene Regulation of LMP-1 and CXCR7." *PLoS Pathog* **7**(7): e1002164.

Cobaleda, C. e. a. (2007). "Pax5: The guardian of B cell identity and function." Nature Immunology **8**(463-470).

Cobaleda, C. S., A. Delogu, A. and Busslinger, M. (2007). "Pax5: the guradian of B cell identity and function." Nature Inmmunology **8**: 463-470.

Christian Steidl, T. L., et & all (2010). "Tumor-Associated Macrophages and Survival in Classic Hodgkin's Lymphoma." New England Journal of Medicine **10**(360): 875-885.

Dallas M, V.-F. B., Delaney C, Kato K, Bernstein I (2005). "Density of the Notch lingand Delta1 determines generation of B and T cell precursors from hematopoietics stem cells." Journal Experimental Medicine **201**: 1361-1366.

Decker, T. M., M. et & al (2010). "Stepwise activation of enhancer and promoter regions of the B cell commitment gene Pax5 in early lymphopoiesis." Inmunity **30**(10): 508-520.

Desouki, M. e. a. (2010). "PAX-5: A Valuable Immunohistochemical Marker in the Differential Diagnosis of Lymphoid Neoplasms." Clinical Medicine & Research **8**(2): 84-88.

Dong HY, L. Z., Browne P, et & al (2004). "B-cell malignancies lacking common pan B-cell antigens consistently express PAX-5." Modern Pathology **12**(1): 246A.

Gandhi M, T. J., Khanna R (2004). "Epstein-Barr virus associated Hodgkin's Lymphoma." British Journal Hematology **125**: 4249-4252.

Geertsen, R., A. Espander-Jansson, et al. (1994). "Development of a recombinant enzyme-linked immunosorbent assay for detection of antibodies against Epstein-Barr virus nuclear antigens 2A and 2B." J. Clin. Microbiol. **32**(1): 112-120.

Gratama J, L. E., Lönqvist M, Oosterveer A, Klein G, Ringdén O and Ernberg I (1992). "Detection of multiple Epstein-Barr viral strains in allogenic bone marrow transplant recipients." Journal Medical of Virology **37**: 39-47.

Grufferman, S. and E. Delzell (1984). "EPIDEMIOLOGY OF HODGKIN'S DISEASE." Epidemiologic Reviews **6**(1): 76-106.

He Y, P. W. (2003). "Notch signalling in B cell." Nature Immunology **8**: 451-456.

Holmes, M. P., C. andg Nutt, S. (2008). "The regulation of the B-cell gene expression programme by Pax5." Inmmunology and Cell Biology **86**: 47-53.

Izumi, K. M. and E. D. Kieff (1997). "The Epstein-Barr virus oncogene product latent membrane protein 1 engages the tumor necrosis factor receptor-associated death domain protein to mediate B lymphocyte growth transformation and activate NF-kB." Proceedings of the National Academy of Sciences **94**(23): 12592-12597.

Jarrett, R. F., A. S. Krajewski, et al. (2003). "The Scotland and Newcastle epidemiological study of Hodgkin's disease: impact of histopathological review and EBV status on incidence estimates." Journal of Clinical Pathology **56**(11): 811-816.

Jennifer A. Morrison, M. L. G., Rajadurai Pathmanathan, and Nancy Raab-Traub (2004). "Differential signaling pathways are activated in the Epstein-Barr Virus-associated malignancies nasopharyngeal carcinoma and Hodgkin Lymphoma." Cancer Research **64**: 5251-5260.

Jensen K, H. J., Montgomery K, Kaygusuz G and Natkunam Yasodha (2007). "The utility of PAX5 immunohistochemistry in the diagnosis of undifferentiated malignant neoplasms." Modern Pathology **20**: 871-877.

Jian-Hong Lu, e. a. (2010). "Epstein Barr virus facilitates the malignant potential of immortalized epithelial cells: from latent genome to viral production and maintenance." Laboratory Investigation **90**: 196-209.

Jillian A. Bristol, A. R. R., Elizabeth A. Barlow, and Shannon C. Kenney (2010). "The Epstein-Barr virus BZLF1 protein inhibits tumor necrosis factor receptor 1 expression through effects on cellular C/EBP proteins." Journal of Virology **84**(23): 12362-12374.

Kalla M, S. A., Bergbauer M, Pich D, Hammerschmidt W (2010). "AP-1 homolog BZLF1 of Epstein-Barr virus has two essential functions dependent on the epigenetic state of the viral genome." Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of America **107**: 850-855.

Kanteti, R. e. a. (2009). "PAX5 is expressed in small-cell lung cancer and positively regulates c-Met transcription." Laboratory Investigation **89**: 301-314.

Kieff E, R. A. (2007). "Epstein-Barr virus and its replication." Fields Virology Williams & Wilkins: 2603-2654.

Kintner, C. R. and B. Sugden (1979). "The structure of the termini of the DNA of Epstein-Barr virus." Cell **17**(3): 661-671.

Knecht, H., Bachmann, E, Joske, D.J. L., Sahli, R., Emery-Goodman, A., Casanova, J.L., Zilic, M., Bachmann, F. & Odermatt, B. F. (1993). "Molecular analysis of the LMP (latent membrane protein) oncogene in Hodgkin's disease." Leukemia **7**: 580-585.

Kohlhof, H., F. Hampel, et al. (2009). "Notch1, Notch2, and Epstein-Barr virus encoded nuclear antigen 2 signaling differentially affects proliferation and survival of Epstein-Barr virus infected B cells." Blood **113**(22): 5506-5515.

Kung, C.-P. a. R.-T., Nancy (2010). "Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 modules distinctive NK-kB pathways through C-terminal activating region 1 to regulate epidermal growth factor receptor expression." Journal of Virology **84**(13): 6605-6614.

Kuppers, R. (2009). "The biology of Hodgkin's lymphoma." Nat Rev Cancer **9**(1): 15-27.

Küppers, R. (2003). "B cell under influence: transformation of B cell by Epstein-Barr virus." *nature Reviews Immunology* **3**: 801-812.

Küppers, R. (2005). "Mechanisms of B-cell lymphoma pathogenesis." *Nature Reviews Cancer* **5**(4): 251-262.

Küppers, R. (2009). "Molecular biology of Hodgkin lymphoma." *Hematology* **21**(3): 491-496.

Kurzrock, M. P. T. a. R. (2004). "Epstein-Barr Virus and Cancer." *Clinical Cancer Research* **10**: 803-821.

Lui, T. W., S. et al (2010). "EBV-positive Hodgkin lymphoma is associated with suppression of p21 and a worse prognosis." *Molecular Cancer* **9**(32): 1-12.

Lupton, S. and A. J. Levine (1985). "Mapping genetic elements of Epstein-Barr virus that facilitate extrachromosomal persistence of Epstein-Barr virus-derived plasmids in human cells." *Mol. Cell. Biol.* **5**(10): 2533-2542.

Maillard I, A. S., Pear W (2003). "Notch and the immune system." *Immunity* **19**(781-791).

Mani, H. a. J., Elaine (2009). "Hodgkin Lymphoma: An update on its biology with newer insights into classification." *Clinical lymphoma Myeloma* **9**(3): 206-216.

Mhawech-Fauceglia P, S. R., Zhang S, Terracciano L, Sauter G, Chadhuri A, Herrmann FR, Penetrante R. (2007). "Pax-5 immunoeexpression in various types of benign and malignant tumours: a high-throughput tissue microarray analysis." *Journal of Clinical Pathology* **60**: 709-714.

Moellering, R. e. a. (2009). "Direct inhibition of the NOTCH transcription factor complex." *Nature Immunology* **462**(12): 182-192.

Nam-Cha S, M.-M. S., Salcedo M, Sanjuan J, Garcia J, Piris M (2009). "Lymphocyte-rich classical Hodgkin's lymphoma: distinctive tumor and microenvironment markers." *Modern Pathology* **22**: 1006-1015.

Punnett, A., R. W. Tsang, et al. (2010). "Hodgkin Lymphoma Across the Age Spectrum: Epidemiology, Therapy, and Late Effects." *Seminars in radiation oncology* **20**(1): 30-44.

Radtke, F. e. a. (2004). "Notch regulation of lymphocyte development and function." *Nature Immunology* **5**(3): 247-254.

Repic, A. S., Mingxia. Scott, Rona and Sixbey, John (2010). "Augmented latent membrane protein 1 expression from Epstein-Barr virus episomes with minimal terminal repeats." *Journal of Virology* **84**(5): 2236-2224.

Rickinson, L. S. Y. A. B. ( 2004). "Epstein-Barr virus: 40 years on." *Nature Reviews Cancer* **4**: 757-768.

Roessler, S. a. G., R (2006). "Role of transcription factors in commitment and differentiation of early B lymphoid cells." Seminars in Immunology **18**: 12-19.

Rowe, M., L. S. Young, et al. (1989). "Distinction between Epstein-Barr virus type A (EBNA 2A) and type B (EBNA 2B) isolates extends to the EBNA 3 family of nuclear proteins." J. Virol. **63**(3): 1031-1039.

Saechan, V. S.-I., Wannapa. Kimur, Rysoduke. Mitarnun, Winyou and Ishida, Takafumi (2010). "Epstein-Barr virus strains defined by the latent membrane protein 1 sequence characterize Thai ethnic groups." 2010 **81**: 2051-2061.

Sculley T, A. A., Hurren L, Moss D and Cooper D (1990). "Coinfección with A and B type Epstein-Barr virus in human immunodeficiency virus-positive subjects." Journal Infection Disease **162**: 643-648.

Seiko, I. e. a. (2010). "Quantitative analysis of Epstein-Barr virus (EBV)- related gene expression in patients with chronic active EBV infection." Journal of General Virology **91**: 42-50.

Shenoy A, M. A., Malik N, and Flowers C (2010). "Incidence patterns and outcomes for Hodgkin Lymphoma patients in the United States." Advances in Hematology **57**: 2058-2063.

Sixbey, J. e. a. (1989). "Detection of a second widespread strain of Epstein-Barr virus." Lancet **2**: 761-765.

Smith E, A. P., Kadesh T, Axelson A, Sigvardsson M (2009). "Inhibition of EBF function by active Notch signaling reveals a novel regulatory pathway in early B-cell development " Blood **106**: 1995-2001.

Soares A, B. A., Scheliga A, et al (2007). "Socioeconomic inequality and short-term outcome in Hodgkin's lymphoma." International Journal of Cancer **20**(4): 875-879.

Souabni, A. J., Wolfram and Busslinger, Meinrad (2007). "Oncogenic role of PAX5 in the T-lymphoid lineage upon ectopic expression from the immunoglobulin heavy-chain locus." NEOPLASIA **109**(1): 281-289.

Strobl, L. J., H. Hofelmayr, et al. (2000). "Activated Notch1 Modulates Gene Expression in B Cells Similarly to Epstein-Barr Viral Nuclear Antigen 2." J. Virol. **74**(4): 1727-1735.

Swerdlow SH, C. E., Harris NL, Jaffe ES, Pileri SA, Stein H, Thiele J, Vierdiman JW (2008). "WHO Classification of Tumours." IARC **2**.

Tedoldi S, M. A., et al (2002). "Selective loss of B-cell phenotype in lymphocyte predominant Hodgkin Lymphoma." Journal

Tedoldi, S., A. Mottok, et al. (2007). "Selective loss of B-cell phenotype in lymphocyte predominant Hodgkin lymphoma." The Journal of pathology **213**(4): 429-440.

Thompson, M. a. K., Razelle (2004). "Epstein-Barr virus and cancer." Clinical Cancer Research **10**: 803-821.

Ting-Yung, L. e. a. (2010). "EBV-positive Hodgkin lymphoma is associated with suppression of p21 and a worse prognos." Molecular Cancer **9**(32): 1-12.

Trimeche M, B. C., Korbi S, Boniver J, de Leval L. (2007). "Association between Epstein-Barr virus and Hodgkin's Lymphoma in Belgium: a pathological and virological study." Leukemia Lymphoma **48**(7): 1323-1331.

Vockerodt , M. e. a. (2008). "The Epstein-Barr virus oncoprotein, latent membrane protein-1, reprograms germinal center B cell towards a Hodgkin's Reed-Sternberg-like phenotype." Journal of Pathology **216**: 83-92.

Wang, J. L. K. a. F. (2006). "Spectrum of Epstein-Barr virus-associated diseases." Annual Review of Pathology: Mechnisms of Disease **1**: 375-404.

Wang Yun, K. K. (2007). "Carboxyl-terminal sequence variation of latent membrana protein 1 gene in Epstein Barr virus associated gastric carcinoma from Eastern China and Japan." Intervirolgy **50**: 229-236.

Young LS, R. A. (2004). "Epstein-Barr virus: 40 years on." Nature Reviews Cancer **4**: 757-768.

Zhong-Xin, L. e. a. (2005). "Effect of EBV LMP1 targetd DNAzymes on cell proliferation and apoptosis." Cancer Gene Therapy **12**: 647-654.