



Universidad Nacional de Misiones. Facultad de Ciencias Exactas,
Químicas y Naturales. Departamento de Genética

Tesista

Deisy Mariela Guiretti

**Variabilidad del gen latent membrane protein 1
(LMP1) del virus Epstein-Barr en el linfoma
de Hodgkin: estudios moleculares y
filogenéticos**

**Tesis presentada para obtener el título de
“Licenciada en Genética”**

Directora

Rocío Hassan

Posadas, Misiones 2007



Esta obra está licenciado bajo Licencia Creative Commons (CC) Atribución-NoComercial-CompartirIgual 4.0 Internacional. <https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/>

Licenciatura en Genética

Facultad de Ciencias Exactas, Químicas y Naturales

Universidad Nacional de Misiones

TRABAJO FINAL DE GRADUACION

**VARIABILIDAD DEL GEN *latent membrane protein 1*
(*LMP1*) DEL VIRUS EPSTEIN-BARR EN EL LINFOMA DE
HODGKIN: ESTUDIOS MOLECULARES Y
FILOGENETICOS**

DEISY MARIELA GUIRETTI

Laboratorio de Biología Molecular, Centro de Transplante de Medula Ósea

(CEMO)

Instituto Nacional de Câncer (INCa).

Rio de Janeiro, Brasil.

Directora: Rocío Hassan

A papá, mi eterno amor de cielo.

AGRADECIMIENTOS

A **Rocío Hassan** por impulsar mi curiosidad día a día gracias a su mente tan maravillosa y privilegiada, por la absurda enseñanza y confianza, su linda amistad, las risas, etc. GRACIAS!!

A **Gustavo Stefanoff** por “el chicote” en los inicios, la solidaridad, el constante cariño, por todo lo que aprendí a su lado y el buen trabajo, “las vitaminas”, entre otras cosas!!

A la **Dra. Ilana Zalberg Renault** por brindarme la plena libertad para trabajar en el laboratorio, por su incondicionalidad absoluta.

A **Paola Chabay** por su gran apoyo, colaboración y contribución en este trabajo; por las buenas trilhas recorridas y “futuras” y la estimulante etapa experimental en tiempo real.

A la jefa de la sección: Laboratorios especializados del CEMO, **Dra. Eliana Abdelhay** y a todos los **directivos del CEMO** por haberme cedido todos los medios para la realización de este trabajo en excelentes condiciones.

A **Flavia** por su excepcional compañía y calidad humana, por estar fielmente en todas mis locuras, as salama alaikum!! Un gracias tsunámico!!

A **Claudio Bidau** por sus críticos y brillantes aportes en este trabajo, a **Juancito** (tateto) por *lembrarme* del proyecto, a **Julieta** por los lindos momentos compartidos! Gracias por la milonga final **Coco!!**

Al *laboratório todo*: a la *superbacana* de **Marina**, a **Virginia, Lyana, Priscila, Vanesa, Esteban, Telminha, Mario, Marcela, Carol, María, Ana Paula, Pamela, Thiago, Rodrigo, Marininha, Gerusa, Roberta, Gisele, Fernanda, Elsa**, por haber generado el ambiente ideal para poder integrarme relativamente rápido, y en consecuencia el buen trabajo.

A **Mamá** por no haberme dejado nunca con soluciones al azar. Por transmitirme su amor y vitalidad todos los días.

A **Marcos** por cuidarme, alentarme y escucharme siempre, por los llamados frío-calor (Calafate-Río) Valeu!!

A **Mariana** por recibirme siempre con una sonrisa, por el inagotable y admirable apoyo, la más chiquita, mi *única* hermana.

A **Margarita y Rosa** por la linda y divertida visita en la recta final.

Al **Pino**, la **Chicha** y a toda la familia, hasta la pampa húmeda, por haber contribuido todos un poquito en la realización de esta etapa.

A las **Dani's, Vale, Pepa, Pachi, Sureña, Kuky**, a la mafia riocoloradense, a la banda masculina UNAM: **Mecano, Enano, Bray, Lázaro, Viejo, Matías, Mauro, Ariel, Fly, Nene, Pepe** y a Andresito por hacerme sentir que el trabajo en equipo, entre amigos, produce más que los caóticos esfuerzos individuales, por todo!

A la Lapa por perderme, a Santa Teresa por encontrarme, a todo Río por el intenso *verão*.

A mi editora **Marina** por la gran ayuda en la producción del copyright final.

Nahuel, por alegrarme el corazón, por su preciosa y mágica compañía.

INDICE GENERAL

	Pág.
Resumen	i
Abstract	ii
Lista de abreviaturas	iii
Lista de tablas	v
Lista de figuras	vi
Lista de Soluciones y Reactivos	vii
1 INTRODUCCIÓN	
1.1 Virus y Cáncer	1
1.2 El virus Epstein Barr (EBV): Historia Natural y Estructura	3
1.3 Cánceres asociados al virus EBV: Etiología	7
1.4 Patrones de Expresión viral	8
1.5 El Linfoma de Hodgkin como modelo de interacción virus-cáncer	10
1.6 Heterogeneidad Molecular del EBV	13
1.6.1 Tipos virales	13
1.6.2 Heterogeneidad molecular del gen <i>LMP1</i>	13
1.6.2.1 Región carboxilo terminal	16
1.6.2.2 Región promotora y amino terminal	19
1.7 Relaciones filogenéticas entre las variantes del EBV	21
2 OBJETIVOS	22
3 MATERIALES y MÉTODOS	
3.1 Grupo de estudio	23
3.2 Procesamiento de muestras biológicas	24
3.2.1 Manipulación y expansión de líneas celulares	24
3.2.2 Separación de células por gradiente de centrifugación	25
3.3 Detección del virus Epstein-Barr mediante la técnica de hibridización in-situ (ISH)	25
3.4 Método de IHQ para detección de la proteína latente de membrana 1 (LMP1)	27
3.5 Extracción de ácidos nucleicos	28

3.5.1	Extracción de ADN a partir de células en suspensión	28
3.5.2	Extracción de ADN a partir de tejido sólido	28
3.5.3	Extracción de ADN a partir de muestras fijadas en formol e incluidas en parafina	29
3.5.4	Extracción de ADN a partir de células epiteliales de la orofaringe	30
3.5.5	Extracción de ARN total	31
3.5.6	Evaluación de ácidos nucleicos	31
3.6	Condiciones generales de los métodos basados en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	32
3.6.1	Amplificación de genes constitutivos	34
3.6.2	Análisis de clonalidad en linfoproliferaciones reactivas	34
3.6.3	Detección y tipificación del virus EBV por PCR	35
3.6.4	Amplificación de regiones polimórficas del gen que codifica la proteína latente de membrana 1 (LMP1)	37
3.6.4.1	PCR para la región C-ter del gen <i>BNLFI</i>	38
3.6.4.2	Detección de la delección de 30 pb (del30) en la región C-ter del gen <i>BNLFI</i>	38
3.6.4.3	Amplificación de la región repetitiva de 33 pb de la región C-ter del gen <i>BNLFI</i>	39
3.6.4.4	Amplificación de la región promotora	40
3.6.4.5	Análisis del sitio de restricción <i>XhoI</i> en el exón 1 por PCR-RFLP	40
3.7	Estudio por RT-PCR de la expresión de los genes <i>EBER1</i> y <i>LMP1</i>	41
3.7.1	Retrotranscripción	41
3.7.2	Expresión de los genes GAPDH, EBER1 y LMP1 por RT-PCR	41
3.8	Procedimientos post-PCR	42
3.8.1	Visualización de los productos de PCR	42
3.8.1.1	Geles de agarosa	42
3.8.1.2	Geles de poliacrilamida	43
3.8.2	Purificación de bandas	43
3.8.3	Subclonaje en plásmidos pCR®4-TOPO	44
3.8.3.1	Aislamiento del ADN plasmidial por miniprecipitación y lisis alcalina	45
3.8.3.2	Identificación de los clones de interés	45
3.8.4	Secuenciación	46
3.8.5	Análisis de secuencias	47
3.9	Análisis filogenético	48
3.10	Análisis estadístico	48

4	RESULTADOS	
4.1	Caracterización de los grupos de pacientes estudiados	49
4.2	Clasificación histopatológica	51
4.3	Detección del virus Epstein-Barr	52
4.3.1	Métodos de PCR	52
4.3.2	Hibridización in situ e inmunohistoquímica	53
4.3.3	Detección de la expresión de LMP1 por RT-PCR	55
4.4	Tipificación viral	56
4.4.1	Características de los linfomas de Hodgkin asociados al EBV	57
4.4.2	Subtipos histológicos en relación a la infección por EBV	60
4.5	Heterogeneidad molecular	62
4.5.1	Detección de la delección de 30 pb en el gen <i>LMP1</i>	64
4.5.2	Detección de las repeticiones de 33 pb en el gen <i>LMP1</i>	66
4.5.3	Status (pérdida o retención) del sitio de restricción XhoI	69
4.5.4	Análisis de las secuencias de la región C-ter del gen LMP1	70
4.5.4.1	Variantes con alelo salvaje (wt)	74
4.5.4.2	Variantes delecionadas (del30)	77
4.5.5	Análisis de la región promotora del gen LMP1	80
4.5.6	Análisis filogenético	86
4.5.7	Agrupamiento de las secuencias	90
4.5.8	Análisis de la región N-ter	91
4.5.9	Características de importancia funcional de los promotores analizados	94
5	DISCUSION	95
6	REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	114
7	ANEXO I	121

RESUMEN

VARIABILIDAD DEL GEN *latent membrane protein 1 (LMP1)* DEL VIRUS EPSTEIN-BARR EN EL LINFOMA DE HODGKIN: ESTUDIOS MOLECULARES Y FILOGENETICOS

INTRODUCCION: El virus Epstein-Barr esta involucrado en la patogénesis del linfoma de Hodgkin (LH), exhibiendo un programa de latencia II caracterizado por la expresión de los genes *EBER*, *EBNA1*, *LMP1* y *LMP2*. La proteína LMP1 es considerada el principal oncogén viral, presentando alta variabilidad molecular, principalmente en su región C-terminal (C-ter). El objetivo de este trabajo fue estudiar la variabilidad molecular del *LMP1* en aislamientos de LH para identificar polimorfismos génicos que podrían contribuir al potencial oncogénico del virus y servir como marcadores epidemiológicos. **MATERIALES Y METODOS:** Fueron estudiados 71 casos con LH y 40 controles no neoplásicos (CNN). El EBV fue detectado por PCR e hibridización in situ (EBER-ISH) y la expresión de LMP1 fue detectada por inmunohistoquímica (IHQ) y RT-PCR. La asociación con EBV fue identificada en 34 casos de LH y 11 CNN. La tipificación (EBV-1 y EBV-2) fue realizada por PCR para el gen *EBNA2*. PCR específicas fueron utilizadas para detectar la presencia de una delección de 30 pb (del30) y el número de repeticiones de 33 pb en la región C-ter de *LMP1*. La pérdida del sitio de restricción *XhoI* (exón 1) fue determinada por RFLP-PCR. Fueron amplificados un fragmento del promotor (nt -217 a +1), de la región N-ter (nt 1-137) y de la región C-ter (aa 232-370), seguido de secuenciación. Árboles filogenéticos fueron construidos a partir de matrices de distancia, usando el método de "Neighbor Joining". **RESULTADOS:** La variante del30 fue encontrada en 20/35 LH y 3/11 CNN. La presencia de la variante del30 mostró una tendencia de asociación con el LH ($p = 0,15$, Test de Fisher). La mayoría (94%) de las variantes del30 mostraron también un número mayor de repeticiones de 33pb (5 a 7), cuando comparadas con el alelo salvaje ($p < 0,0001$, Test de Fisher), sugiriendo que fenómenos activos de recombinación pueden estar jugando un papel en la variabilidad de la región C-ter. El sitio de restricción *XhoI* fue retenido en el 64% de los casos. La pérdida y/o retención del sitio *XhoI*, no demostró asociación significativa con los marcadores moleculares y secuencias. El análisis de las secuencias C-ter mostró que las variantes salvajes (N=20) presentaron 4 patrones moleculares, incluyendo secuencias relacionadas filogenéticamente con el prototipo B95.8 (35%). Fue notoria la ausencia de variantes altamente mutadas del tipo D/CAO. En las secuencias de variantes del30 (N=13), el grupo C europeo fue el mas representado. Una inserción de 15 pb (ins15) (aa 276-280) presente en secuencias filogenéticamente asociadas a B95.8/A (alelo salvaje), fue observada en 10/13 secuencias del30 vs 3/13 secuencias salvajes ($p = 0,01$, $\chi^2 = 5,54$). Estos resultados sugieren selección positiva de las variantes ins15/del30 en la región sudeste de Brasil. El análisis de las secuencias del promotor de *LMP1*, mostró un 41% de los aislamientos sin mutaciones recurrentes, mientras que el 59% restante presentó mutaciones recurrentes similares a las observadas en la variante africana Raji, europea D y asiática CAO, así como mutaciones no descritas previamente. El análisis conjunto de las diferentes regiones del gen *LMP1* permitió realizar tres grupos: (I) promotor sin mutaciones (excepto por -158 C>T), asociado a regiones N y C-ter B95.8/A y B (41%) (II) promotor con mutaciones compartidas D/CAO/Raji, asociado a C-ter del30 (12%) (III) promotor similar a la variante Raji pero con C-ter del30 (47%) En el promotor, el sitio ATF/CREB (-45 a -38), potente activador de la expresión, fue encontrado mutado en todos los casos de los grupos II y III, descartando selección negativa de estas variantes. El análisis filogenético del promotor agrupó los aislamientos brasileños, separándolos de las variantes asiáticas y D europea, así como respaldó la clasificación de los grupos I – III propuesta. Discordancias entre los árboles inferidos a partir de las secuencias del promotor y de C-ter son probablemente debidas a la fijación de una variante recombinante. **CONCLUSIONES:** Este trabajo es la primera descripción de promotores del gen *LMP1* en aislamientos de EBVs circulantes de América del Sur y permitió describir la variabilidad presente en el gen *LMP1* en casos de LH y CNN EBV+ de la región Sudeste de Brasil, así como realizar inferencias filogenéticas y patogénicas. Los resultados sugieren que las secuencias del promotor y de C-ter de *LMP1* podrían ser adecuadas para el estudio de la evolución del EBV en relación a las migraciones humanas, así como para estudios epidemiológicos. Estudios futuros podrán dilucidar la prevalencia, diferencias en la actividad biológica y potencial oncogénico de las variantes descritas.

ABSTRACT

INTRODUCTION: Epstein-Barr virus is pathogenically involved with Hodgkin lymphoma (HL), displaying a type II latency program characterized by the expression of *EBER,s*, *EBNA1*, *LMP1* and *LMP2* genes. The LMP1 protein is considered the main viral oncogene and has a marked molecular variability at the C-terminal region. The objective of this work was to study the molecular variability of the LMP1 gene in isolates of HL in order to identify the genetic polymorphism that could contribute to the oncogenic potential of the virus and hence be useful as an epidemiological marker. **MATERIALS AND METHODS:** This study included 71 cases with HL and 40 non neoplastic controls (NNC). The EBV was detected by PCR (polymerase chain reaction) and hybridisation *in situ* (EBER-ISH) and the expression of LMP1 was detected by immunohistochemistry (IHC) and RT-PCR. EBV typing (EBV-1 and EBV-2), was carried out by PCR for the *EBNA2* gene. Specific PCRs were used to screen a 30 base pair deletion (del30) and the number of 33bp tandem repeats in the C-terminal region of *LMP1*. Loss of the *XhoI* restriction site (exon 1) was determined by RFLP-PCR. Sequencing was performed in one promoter (nt -217 a +1), one N-terminal (nt 1-137), and one C-terminal (aa 232-370) segments. Phylogenetics analysis was performed using the distance “Neighbor Joining” method. **RESULTS:** EBV was identified in 34 cases of HL and 11 of NNC. The del30 variant was found in 20/35 HL and 3/11 NNC. The presence of del30 showed a trend to be associated with LH ($p = 0,15$, Fisher’s Test). Most of the variants with del30 (94%) also showed a high number of 33bp tandem repeats (5 to 7) when compared with the wild type allele ($p < 0,0001$, Fisher’s Test). This suggested that recombination could play an important role in the C-terminal region variability. *XhoI* was retained in 64% of cases and did not show any significant association with the molecular markers or sequences. The analysis of wild type C-ter sequences showed four molecular pattern (N=20) had, including 35% of isolates phylogenetically related to the B95.8 prototype. The absence of D/CAO-related variants was remarkable. The del30 variant sequences (N=13), European group C was the most frequently represented. One 15 pb insertion (ins15) (aa 276-280) which is typical of B95.8-A related sequences was observed in 10/13 del30 sequences vs 3/13 wild type sequences ($p = 0,01$, $\chi^2 = 5,54$), suggesting a positive selection of ins15/del30 variants in the Southeastern region of Brazil. The analysis of LMP1 promoter sequences disclosed 41% of unmutated isolates, homologous to B95.8 prototype, while 59% showed mutations already described in Raji African variant, European D and Asian CAO, as well as previously undescribed mutations. Combined C-ter /promoter region analysis allowed to define three groups of sequences: (I) unmutated promoter (except for -158 C>T), associated with N- and C-ter regions characteristic of B95.8/A and B (41%) (II) promoters with D/CAO/Raji shared mutations, associated with a del30 C-ter region (12%) (III) promoters similar to Raji variant but associated with a del30 C-ter region (47%). The ATF/CREB domain (-45 to -38), a strong LMP1 transcription activator, was found mutated in all of thwe group II and III isolates, ruling out a negative selection of these “weak”promoters in HL. Phylogenetics analysis of the promoter sequences was able to cluster togheter the brazilian isolates, separating them out from the Asian and European D variants. It also supported the group I-III classification anticipated by sequence analysis. Promoter and C-ter trees showed discordant inferences, probable due to the fixation of a new recombinant variant. **CONCLUSIONS:** This work reports the first description of LMP1 promoters in South American isolates, allowing to describe variability in the LMP1 gene in HL and NNC from the South Eastern region of Brazil, as well as to perform pathogenic and phylogenetics inferences. Our results suggest that *LMP1* promoter and C-ter sequences might be suitable for epidemiologic studies as well as for understanding EBV evolution in relation with human migrations. Future studies may be able to elucidate the prevalence, biological activity and oncogenic potential of these newly described *LMP1* variants.

LISTA DE ABREVIATURAS

ADN	Ácido desoxirribonucleico
BCIP	5-bromo-4-cloro-3-indol-fosfato
Bisacrilamida	N,N'-metilen bis-acrilamida
BSA	Albumina sérica bovina
CM	Celularidad Mixta
CNF	Carcinoma nasofaríngeo
CNN	Control no neoplásico
CTAR	Región activadora carboxilo terminal
DAB	3,3'-diaminobenzidina
Del30	Delección de 30 pb
DEPC	Dietilpirocarbonato
DMSO	Dimetilsulfóxido
dNTPs	Deoxiribonucleosidos trifosfatos
DP	Depleción Linfocítica
EBNA	Antígenos nucleares del virus Epstein-Barr
EBV	Virus Epstein-Barr
EDTA	Ácido Etileno-diamino-tetraacético
EN	Esclerosis Nodular
FIP	Fijación e impregnación en parafina
GAPDH	Gliceraldehído-3-fosfato-desidrogenasa
HEPES	N-[2-hidroxietyl]piperazina-N'-[2-ácido etanosulfónico]
HHV-8	Herpesvirus humano
H-RS	Células de Hodgkin y Reed Sternberg
HR	Hiperplasia reactiva
HS	Hipermutación somática
IARC, WHO	Agencia Internacional de Investigación en Cáncer de la Organización Mundial de la Salud
Ig	Inmunoglobulina
IHQ	Inmunohistoquímica
Ins15	Inserción de 15 pb
ISH	Hibridización in situ
JAK	Proteína quinasa Janus
LB	Linfoma de Burkitt
LCL	Línea celular linfoblastoide

LH	Linfoma de Hodgkin
LH-HIV	LH relacionado con el síndrome de la inmunodeficiencia adquirida - SIDA
LMP	Proteína latente de membrana
LSAB	Anticuerpo monoclonal secundario biotinilado
NBT	Azul nitro tetrazolio
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PL	Predominio Linfocítico
PRO	Promotor
PS	Portador sano
PTLD	Enfermedades linfoproliferativas post-transplante
RFLP-PCR	Polimorfismo de longitud en los fragmentos de restricción
SB	Solución Bloqueante
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SFB	Suero fetal bovino
SP	Sangre Periférica
STAT	Factor transductor de señal y activador de la transcripción
TA	Temperatura ambiente
TEMED	N,N,N',N'-tetrametilenodiamina
Triton	t-octilfenoxipolietoxietanol
Tween	Polioxietilensorbitan

LISTA DE TABLAS

	Pág.
1.1 Cánceres asociados al EBV	8
1.2 Programas de latencia viral y neoplasias asociadas	9
3.1 Líneas celulares utilizadas como controles	24
4.1 Distribución de edades y variación de la proporción de sexos por clases de edad en los linfomas de Hodgkin estudiados.	50
4.2 Rango de edades y variación de la proporción de sexos por clases de edad en las hiperplasias reactivas estudiadas.	51
4.3 Frecuencia de los subtipos histológicos en los niños y adultos con LH	52
4.4 Proporción de pacientes EBV positivos y negativos por clases de edad en los linfomas de Hodgkin estudiados	58
4.5 Asociación del EBV con los subtipos histológicos de los linfomas de Hodgkin, de acuerdo a la edad	61
4.6 Características clínicas y moleculares de los linfomas de Hodgkin asociados al virus Epstein-Barr	62
4.7 Características demográficas de las muestras no tumorales asociadas el virus Epstein-Barr	63
4.8 Asociación entre el número de repeticiones de 33 pb y la presencia de la variante del30 en la región C-terl del gen <i>LMP1</i> en los casos estudiados	68
4.9 Características de los casos estudiados y las secuencias de la región C-ter de <i>LMP1</i>	72

LISTA DE FIGURAS

	Pág.	
1.1	Episoma del virus Epstein-Barr	5
1.2	Estructura de la proteína latente de membrana 1 (LMP1)	15
3.1	Esquema de la estrategia de amplificación del gen <i>EBNA2</i> para la detección y tipificación del EBV	36
3.2	Esquema del gen LMP1 representando las regiones de variabilidad en los dominios C-ter. Del30	37
4.1	Distribución de frecuencias de las diferentes clases de edad (5 años) en los pacientes con linfoma de Hodgkin	50
4.2	Detección del virus Epstein-Barr por PCR para los genes <i>EBERs</i> y BamHW	53
4.3	Detección de la expresión de los transcritos virales <i>EBERs</i> por ISH	54
4.4	Detección de la expresión de la proteína LMP1 por IHQ	55
4.5	Detección de la expresión del ARNm de LMP1 y <i>EBER</i> por RT-PCR	56
4.6	Tipificación del EBV por PCR para el gen <i>EBNA2</i>	57
4.7	Asociación del EBV con los diferentes rangos etarios analizados en el linfoma de Hodgkin.	59
4.8	Frecuencia de los subtipos esclerosis nodular (EN) y celularidad mixta (CM) en los casos EBV+ por clase de edad	61
4.9	Amplificación de la delección de 30 pb en la región C-ter del gen <i>LMP1</i>	65
4.10	Proporciones de las variantes delecionadas (del30) y salvajes (wt) en los linfomas de Hodgkin EBV+ por clases de edad	65
4.11	Análisis de las unidades repetitivas de 33 pb	67
4.12	Frecuencias del número de repeticiones de 33pb en los linfomas de Hodgkin y controles no neoplásicos EBV+	67
4.13	Asociación entre el número de repeticiones de 33 pb y la presencia de la del30 en la región C-ter del gen <i>LMP1</i> de los linfomas de Hodgkin	68
4.14	Método de RFLP-PCR para un segmento N-ter conteniendo el sitio de restricción <i>XhoI</i>	70
4.15	Amplificación de la región C-ter	74
4.16	Alineamiento de las secuencias aminoacídicas de la región C-ter de la proteína LMP1 en los casos EBV+	79
4.17	Esferograma representando la reacción de secuenciación (ins15)	76
4.18	Alineamiento de secuencia de la región promotora del gen <i>LMP1</i> (nt.-217 a +137)	85
4.19	Análisis filogenético de las secuencias del promotor del gen <i>LMP1</i>	88
4.20	Análisis filogenético de las secuencias de la región C-ter del gen <i>LMP1</i>	89
4.21	Alineamiento de las secuencias aminoacídicas de la región N-ter de la proteína LMP1 (aa 1 a 32)	93

SOLUCIONES Y REACTIVOS

Los tampones, medios y soluciones utilizadas en este estudio fueron preparados conforme lo descripto a continuación:

Solución isotónica de fosfatos tamponada, PBS (10X)

Solución acuosa conteniendo 0.01 M Na_2HPO_4 y 0.01 M KH_2PO_4 , 0.0027M KCl y 0.137 M NaCl, pH 7.4. Filtrada con filtro de 0.2 μm y esterilizada 20 minutos en autoclave a 1 atm.

Tampón para extracción de ADN de alto peso molecular

Solución acuosa conteniendo 10 mM de Tris-HCl (pH 8.0), 10 mM de EDTA (pH 8.0) y 10 mM de NaCl.

Solución stock de acrilamida (30%)

Solución acuosa conteniendo 29% de acrilamida (Gibco) y 1% de N,N´metilenbisacrilamida (Gibco). Filtrada con filtro de 0.2 μm mantenida a 4°C en recipiente oscuro.

Solución tampón TAE (50X)

Solución acuosa conteniendo 50 x 0,04 M Tris -Acetato (Gibco) y 0,001M EDTA (Sigma) pH 8.0.

Solución tampón TBE (5X)

Solución acuosa conteniendo 5 x 0,045 M Tris Borato (Gibco) y 0,001 M EDTA (Sigma) pH 8.0.

Solución Tris-HCl (1M)

12.11% TRIZMA® base (Gibco), pH requerido ajustado con HCl (Merck) concentrado.

Medio de cultivo LB (Luria Bertani) sólido

Al volumen deseado de medio LB adicionar:

Agar bacteriológico 1,5% (p/v)

Esterilizar 20 minutos en autoclave.

Medio de cultivo LB líquido

NaCl 1% (p/v)

Bacto-triptona 1% (p/v)

Extracto de levadura 0,5% (p/v)

H₂O bidestilada qsp 1000 mL

Esterilizar 20 minutos em autoclave a 1 atm.

Medio nutritivo SOC

Bacto-triptona 2% (p/v)

Extracto de levedo 0.5% (p/v)

NaCl 10 mM

KCl 2.5 mM

H₂O bidestilada 975 mL

Ajustar el pH a 7.0 con NaOH 5M

Esterilizar 20 minutos en autoclave a 1 atm.

Adicionar:

Mg Cl₂ 2 M (estéril)
Mg SO₄ 2 M (estéril)
Glucosa 1 M (filtrada)

Solución P1 Miniprep (Aislamiento de ADN plasmidial)

Solución conteniendo Glicose 20% (filtrada)

Tris-HCl 1 M (pH 7.5)
EDTA 0,5M (pH 8.0)
H₂O bidestilada estéril qsp
Mantener a 4°C.

Solución P2 Miniprep

[NaOH 0,2 N / SDS 1%]
NaOH 5 M
SDS 10%
H₂O bidestilada estéril qsp

Solución P3 Miniprep (Aislamiento de ADN plasmidial)

[conc. final 5 M acetato, 3 M potássio]

Acetato de potássio 5 M
Acido acético glacial
H₂O bidestilada estéril qsp

Agua-DEPC

H₂O bidestilada estéril
DEPC

Mezclar y agitar vigorosamente. Dejar descansar por una noche y autoclavar una hora a 1 atm.

Reactivos y marcas comerciales

Todos los reactivos básicos utilizados fueron proveídos por Sigma y Merck.

La enzima *Taq* DNA polimerasa, tampones de PCR y MgCl₂ por Invitrogen, y dNTPs por Pharmacia. Las excepciones son indicadas en el texto:

SFB	Gibco
RPMI-1640	Sigma
TRIZMA® base, tris(hydroxymetil)aminom etano	Gibco
HEPES, N-[2- hidroxietil]piperazina-N´- [2-ácido etanosulfonic]	Sigma
DMSO, dimetilsulfóxido	Sigma
EDTA, ácido etilendiaminotetraacético	Sigma
SDS, dodecil sulfato de sódio	Sigma
Triton X-100®, t- octilfenoxipolietoxietanol	Sigma
Azul de Trípano	Sigma
Gelatina	Sigma
Archilamida	Gibco
Azarosa	Sigma
Bromuro de etídio	Sigma
Tween20®, polioxietilensorbitan	Sigma
Penicilina	Sigma
Estreptomicina	Sigma
Ficoll®	Sigma
DNAzol®	Gibco
Proteinasa K	Gibco
Fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1)	Sigma
Persulfato de amonio	Gibco
TEMED	Gibco

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Virus y Cáncer

La oncogénesis es un proceso de transformación celular que acontece en múltiples pasos e involucra disturbios génicos y diversas alteraciones a nivel celular (Dalla-Favera and Gaidano, 2005). Su naturaleza clonal desencadena una proliferación desordenada y descontrolada de un tipo celular determinado que invade localmente y a distancia otros tejidos sanos del organismo (Jiricny, 1996). Aunque los mecanismos desencadenantes involucran alteraciones en los genes, solo un pequeño porcentaje de los cánceres son hereditarios.

Por otra parte, enfoques actuales plantean el cáncer como una enfermedad multifactorial, que surge por la interacción de factores genéticos y ambientales. Evidencias epidemiológicas y modelos celulares sustentan un papel significativo de los virus en la etiología de las neoplasias humanas, estimándose en hasta un 10% de asociación causal entre virus y cáncer (Thé, 1995).

Los cánceres asociados a virus presentan una marcada variabilidad geográfica en relación a su incidencia y características clínico-biológicas, lo que puede ser explicado por interacciones de los virus con factores ambientales y genéticos específicos de cada región y población en riesgo (Hsu and Glaser, 2000).

El virus Epstein-Barr (EBV) es un herpesvirus ampliamente extendido, que establece precozmente una infección asintomática en el 90% de la población humana, permaneciendo en estado latente en las células B de memoria (Rickinson and Kieff, 2001). En ciertas condiciones, esta infección está asociada al desarrollo de tumores malignos (Crawford, 2001; Kuppers, 2003; Thompson and Kurzrock, 2004). Por esto, en

1997, fue clasificado por la Agencia Internacional de Investigación en Cáncer de la Organización Mundial de la Salud (IARC, WHO) como un carcinógeno humano del grupo I, debido a su papel etiológico en el carcinoma nasofaríngeo (CNF) y en la linfomagénesis (IARC, 1997).

Los linfomas son proliferaciones clonales de células linfoides de origen B, T/NK caracterizados por una gran heterogeneidad en cuanto a sus características biológicas, genéticas y a las vías patogénicas involucradas (Ekstrom-Smedby, 2006). Esta heterogeneidad se extiende también a la asociación con el EBV y al papel que este cumple en el proceso de génesis tumoral (Kuppers, 2003; Thompson and Kurzrock, 2004; Young and Rickinson, 2004). Estudios previos muestran una alta frecuencia de asociación del EBV y los linfomas pediátricos en los países en desarrollo (Chabay et al., 2002) (Klumb et al., 2004), lo que abre importantes perspectivas para la utilización de la presencia del virus como blanco de estrategias terapéuticas y monitorización clínica de estas entidades.

Una tarea esencial para el entendimiento del papel patogénico de este virus, así como para el desarrollo de abordajes terapéuticos específicos, es el conocimiento de la variabilidad molecular de las cepas de virus circulantes y/o preferencialmente asociadas a las patologías en estudio.

A nivel poblacional, la investigación de prevalencias, patrones de infección viral y asociaciones con otros factores ambientales y de susceptibilidad genética en áreas de riesgo son relevantes para identificar atributos poblacionales diferenciados, así como interacciones específicas virus-huésped involucradas en la carcinogénesis viral.

1.2 El virus Epstein Barr (EBV): Historia Natural y Estructura

El EBV fue descubierto en 1964 en linajes celulares de Linfoma de Burkitt africano (Epstein, Achong, and Barr, 1964) y más tarde identificado como agente etiológico de la mononucleosis infecciosa (Hsu and Glaser, 2000). Fue identificado como un Herpesvirus, basado en homologías estructurales y de secuencias. Varias similitudes en la estructura de la familia Herpesviridae sugieren que se han originado a partir de un ancestro común. El virus ancestral evolucionó al menos en dos linajes altamente divergentes, representados por un lado por las subfamilias Beta-, y Gammaherpesvirinae que infectan aves y mamíferos, y por el otro, por la subfamilia Alfaherpesvirinae, con huéspedes en animales poiquilotérmicos (Roizman and Pellett, 2001).

El EBV pertenece a la subfamilia Gammaherpesvirinae, que, a diferencia de la subfamilia Betaherpesvirinae, es caracterizada por un rango muy estrecho de huéspedes y tipos celulares que infecta. La subfamilia Gammaherpesvirinae incluye dos géneros: Lymphocryptovirus y Rhadinovirus. El EBV es el único Lymphocryptovirus humano, así como el Herpesvirus humano 8 (HHV-8) es el representante humano del género Rhadinovirus (McGeoch, 2001).

Estudios evolutivos sobre Herpesvirus relacionados que infectan diferentes especies de primates, por ej: los Rhadinovirus HHV-8 y HSV Herpesvirus saimiri, sugieren que la “especiación” viral ocurrió aproximadamente al mismo tiempo que la especiación del huésped. De este modo los Herpesvirus muestran una íntima historia evolutiva con su huésped (McGeoch, 2001; Roizman and Pellett, 2001).

Dentro de su cápside icosaédrica, el EBV alberga un genoma de ADN doble cadena, de 172 Kb que codifica más de 85 genes (Kieff and Rickinson, 2001) luego de la infección,

adquiere estructura circular y se mantiene como episoma nucleosomal en el núcleo celular, replicándose y segregándose en sincronía con la replicación celular (Figura 1.1) (Young and Rickinson, 2004).

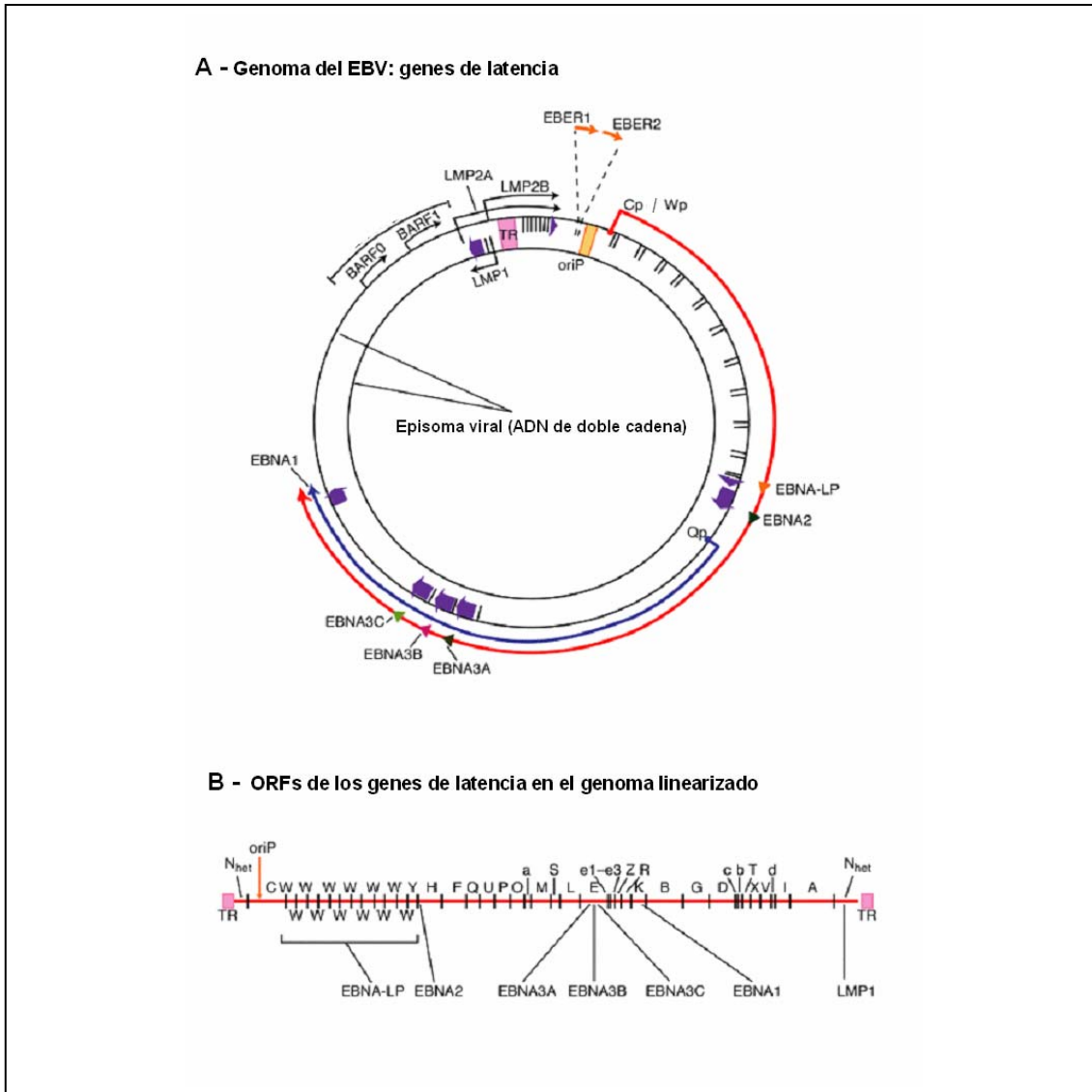


Figura 1.1: A- Episoma del virus Epstein-Barr. Diagrama mostrando la localización y sitios de comienzos de la transcripción de los genes de latencia del EBV en el episoma de ADN doble cadena. OriP, origen de replicación episomal. Las flechas violetas rellenas representan exones codificando para cada una de las proteínas latentes, y las puntas indican el sentido en el cual los genes son transcritos. Las proteínas latentes incluyen los 6 antígenos nucleares (EBNAs 1, 2, 3A, 3B y 3C, y EBNA-LP) y las 3 proteínas latentes de membrana (LMPs 1, 2A y 2B). El gen *EBNA-LP* es transcrito a partir de un número variable de exones repetitivos. *LMP2A* y *LMP2B* están compuestos de múltiples exones que se encuentran próximos a la región repetitiva terminal (RT), la cual está involucrada en la circularización del ADN lineal para producir el episoma viral. *LMP1* consta de 3 exones (no mostrados) y es el principal oncogén viral. Las flechas naranjas, en la parte superior de la figura, representan los ARNs EBER1 y 2 no poliadenilados, transcritos en gran cantidad. La flecha roja mas extensa esquematizada en la parte exterior del esquema representa la transcripción viral en un programa de latencia III (Lat III), en la cual todos los EBNAs son transcritos a partir de los promotores alternativos Cp o Wp; los diferentes EBNAs son traducidos de ARNm individuales generados por *splicing* alternativo de los mismos transcritos primarios no procesados. La flecha azul mas corta, representa el transcripto EBNA1, el cual se origina desde el promotor Qp durante Lat I y II. Las posiciones de las regiones codificantes BARF0 Y BARF1 son mostradas en este esquema. Transcritos de la región BamHIA pueden ser detectados durante la infección latente, aunque proteínas originadas desde esta región no han sido identificadas. B- ORFs de los genes de latencia del genoma EBV linearizado. ORF, open reading frame. (Young and Rickinson, 2004).

Como la mayoría de los herpesvirus, su ciclo de vida consta de una fase lítica o replicativa seguido del establecimiento de un programa de persistencia llamado “latencia” (Kuppers, 2003; Rickinson and Kieff, 2001) (Crawford, 2001). La larga co-evolución del EBV con el ser humano llevó al desarrollo de estrategias de evasión y explotación del sistema inmune del huésped (Thorley-Lawson and Gross, 2004). En la infección primaria (*primoinfección*), el virus es transmitido por la saliva e invade la mucosa linfoepitelial de la orofaringe, estableciendo un ciclo replicativo o productivo, luego del cual se generan nuevos viriones que irán a invadir nuevos linfocitos B a través de la ligación de la glicoproteína viral gp350 a receptores celulares específicos (CD21). La primoinfección ocurre usualmente durante la primera década de vida, y transcurre asintóticamente. En países desarrollados, aproximadamente el 50% de los casos donde el primer contacto ocurre en la adolescencia o la juventud, la infección viral genera una respuesta inmune vigorosa que determina un estado de morbilidad denominada mononucleosis infecciosa (Crawford, 2001).

Alternativamente, un modelo actual para la persistencia viral, que cuenta con mucho apoyo experimental, propone que el virus “direcciona” la célula a través del centro germinativo y la estimula a diferenciarse en célula B de memoria, a través de la expresión de proteínas virales específicas. En el estadio de célula de memoria, el virus silencia su expresión y establece una infección no inmunogénica, que persistirá durante la vida del huésped (Joseph, Babcock, and Thorley-Lawson, 2000; Thorley-Lawson, 2001; Thorley-Lawson and Gross, 2004; Tierney et al., 1994). Esporádicamente, el virus inducirá su entrada en el ciclo lítico, para garantizar la renovación del “pool” de células infectadas.

El EBV contribuye en el desarrollo de varias enfermedades malignas donde conduce a la célula B a convertirse en un blasto activado, actuando de ésta manera como un mitógeno específico. Además de las células B, para las cuales el EBV presenta tropismo primario, este puede también infectar linfocitos T/NK y células epiteliales. Lo que se ve reflejado en la asociación del virus con linfomas originados en estos compartimentos celulares (Murray and Young, 2001).

1.3 Cánceres asociados al virus EBV: Etiología

En la gran mayoría de los portadores, el virus no causa enfermedad debido a un delicado balance entre los sistemas de persistencia viral, los mecanismos celulares y el sistema inmune del huésped. La disrupción de este balance puede conducir al desarrollo de enfermedades asociadas al EBV (Thorley-Lawson, 2001) (Thorley-Lawson and Gross, 2004) (Joseph, Babcock, and Thorley-Lawson, 2000; Tierney et al., 1994) (Tabla 1.1). Debido a su tropismo primario, los linfomas asociados al EBV son mayoritariamente de origen celular B. El EBV está asociado patogénicamente al linfoma de Burkitt (LB) endémico, a enfermedades linfoproliferativas post-transplante (PTLD), a una fracción de linfomas de Hodgkin (LH) y a algunos linfomas de origen celular T/NK. Dentro de los cánceres de origen epitelial, el CNF muestra la asociación más consistente (Crawford, 2001; Kuppers, 2003; Rickinson and Kieff, 2001; Thompson and Kurzrock, 2004).

El papel del EBV en la patogénesis de la mayoría de las neoplasias asociadas aún no está claro (Thorley-Lawson and Gross, 2004) (Murray and Young, 2001) y los modelos actuales proponen que genes virales expresos durante la transformación celular alteran el programa de transcripción génica normal, activando constitutivamente vías de

señalización claves para la célula, (Crawford, 2001; Kuppers, 2003; Rickinson and Kieff, 2001) (Thompson and Kurzrock, 2004) o rescatando células destinadas a la apoptosis (Thorley-Lawson and Gross, 2004) (Thorley-Lawson, 2005). Por esto, el estudio de los patrones de variabilidad de estos genes/vías, tanto a nivel genómico cuanto de expresión génica, son relevantes para el entendimiento del papel patogénico del virus.

Tabla 1.1: Cánceres asociados al EBV

Neoplasia	Subtipo	Expresión del EBV	Asociación con EBV
<i>Pacientes inmunocompetentes</i>			
Linfoma de Burkitt	Endémico	Latencia I	>95%
	Intermedio		60%
	Esporádico		15-30%
Linfomas No Hodgkin	Nasal T/NK	Latencia II	>90%
	Angioinmunoblástico		?
Linfoma de Hodgkin	Esclerosis nodular	Latencia II	70%
	Celularidad mixta		>95%
	Depleción linfocítica		10-40%
	Predominio linfocítico		<5%
Carcinoma Nasofaríngeo	Tipo I (queratinizante escamoso)	Latencia II	>95%
	Tipo II (no queratinizante epidermoide)		
	Tipo III (no diferenciado)		
Cáncer gástrico	Tipo linfoepitelioma	Latencia III	>90%
	Adenocarcinoma		5-25%
Cáncer de mama	Carcinoma medular	No esclarecido	0-50%
	Adenocarcinoma		
<i>Pacientes inmunosuprimidos</i>			
Linfoprolif. Post-transplant	Varias morfologías	Latencia III	>90%
Linfomas asociados a SIDA	Inmunoblástico del SNC	Latencia III	>95%
	Otros		30-50%

1.4 Patrones de Expresión viral

El EBV es capaz de adoptar diferentes patrones de expresión génica (programas de latencia). Una vez internalizado en el linfocito, el virus establece un programa de proliferación expresando un conjunto de genes de latencia: seis antígenos nucleares (*EBNA1*, *EBNA2*, *EBNA3A*, *3B*, *3C* y *EBNALP*), tres proteínas integrales de membrana (*LMP1*, *LMP2A* e *LMP2B*), dos ARNs no poliadenilados, *EBER1* y *EBER2*, y un

conjunto de ARNs poliadenilados con capacidades codificantes no esclarecidas, los ARNs BARF. Este patrón de expresión es denominado latencia III (Joseph, Babcock, and Thorley-Lawson, 2000; Kuppers, 2003; Rickinson and Kieff, 2001; Thorley-Lawson and Gross, 2004; Tierney et al., 1994).

En su pasaje por el centro germinativo, a pesar de ser una etapa controvertida, el virus parece expresar un programa de latencia II, caracterizado por la expresión de EBNA1, EBERs, LMP1 y LMP2. En una célula de memoria el virus parece expresar solamente EBNA1 y LMP2, cuando esta retoma eventualmente la división celular (latencia 0 y I) (Thorley-Lawson and Gross, 2004).

Cuando el proceso neoplásico es establecido, el virus muestra un patrón de latencia particular en cada uno de los diferentes tumores que infecta, como se muestra en la Tabla 1.2 (ver Tabla 1.1 y Figura 1.1).

Tabla 1.2: Programas de latencia viral y neoplasias asociadas

Tipo de latencia	Genes virales expresos	Neoplasias asociadas
Latencia tipo I	EBNA1 (Qp) EBERs	Linfoma de Burkitt
Latencia tipo II	EBNA1 EBERs LMP1 LMP2	Linfoma de Hodgkin Carcinoma Nasofaríngeo Linfoma T/NK periférico
Latencia tipo III	EBNA1 (Cp) Todos los otros EBNAs EBERs LMP1 LMP2	Linfomas en el huésped inmunocomprometido - asociados a SIDA - post-transplante

EBNAs, antígenos nucleares expresados por el EBV (EBNA1 a LP); LMP, proteínas latentes de membrana (LMP1, 2A y B); ARNs EBERs, transcritos no traducidos codificados por el EBV (EBER 1 y 2); NK, células “natural killer”.

1.5 El Linfoma de Hodgkin como modelo de interacción virus-cáncer

El LH fue descrito por Thomas Hodgkin en 1832, y recibió la denominación de “Enfermedad de Hodgkin” debido a que su monoclonalidad y origen celular fueron una incógnita hasta recientemente, principalmente debido a la gran variabilidad histológica de este linfoma, así como la baja representación de células neoplásicas en relación al infiltrado inflamatorio no tumoral (Kuppers, 2003).

El origen clonal y linfoide B de las células neoplásicas, denominadas células de Hodgkin y Reed-Sternberg (H-RS), fue determinado por métodos moleculares mediante análisis de células simples del tumor (Harris, 1999). Característico de este tumor es que las células H-RS representan menos del 2% de la masa tumoral, estando el resto representado por un infiltrado inflamatorio compuesto por células T, B y otros leucocitos no tumorales (Stein, Delsol, and Pileri, 2001). La particular arquitectura histológica del LH permite clasificarlo en dos grupos: predominio linfocítico (PL), una entidad rara que representa el 5% del total de los LH, y la forma “clásica” subclasificada en: esclerosis nodular (EN), celularidad mixta (CM), depleción linfocítica (DL) y rico en linfocitos (RL) (Harris, 1999). Se sabe hoy que el LH surge por la transformación de células B maduras del centro germinativo que, durante el proceso linfomagénico, son rescatadas del proceso de apoptosis (Harris, 1999) (Kanzler et al., 1996).

Varias líneas de evidencia asocian etio-patogénicamente el EBV con el LH, basadas principalmente en datos serológicos y epidemiológicos, confirmadas por la detección de su genoma monoclonal en las células H-RS. Sin embargo, su papel en esta enfermedad no es totalmente comprendido (Glaser et al., 1997) (Chapman and Rickinson, 1998; Poppema, 2005).

El LH posee características patológicas, epidemiológicas y virológicas que lo distinguen de otros linfomas. Aproximadamente 20-40% de los casos con LH se encuentran asociados al EBV en países desarrollados, mientras la asociación entre el EBV y el LH en países en vías de desarrollo es de aproximadamente el 80%, especialmente en la población pediátrica (IARC, 1997). Respecto a su asociación con los subtipos histológicos, es descripto que el EBV es mas frecuente en el subtipo CM, que en los otros subtipos histológicos (Harris, 1999).

En relación a las edades, el EBV muestra un patrón bimodal de asociación, encontrándose más relacionado con niños, preferentemente menores de 10 años, y adultos, de edad superior a los 50 años, que con adultos jóvenes (Glaser et al., 1997) (Armstrong et al., 1998; Jarrett, Armstrong, and Alexander, 1996; Jarrett et al., 1991). En relación a esto, Armstrong et al, en 1998, propusieron un modelo de “tres entidades”, para el LH: LH en niños (EBV positivos, con predominio del subtipo CM), LH en adultos jóvenes (EBV negativo, con predominio del subtipo EN) y LH en adultos de mayor edad (EBV positivos subtipo CM) (Armstrong et al., 1998).

Sexo y situación socio-económica son también factores relacionados a la asociación del LH con el EBV, encontrándose el EBV asociado LH en países subdesarrollados o a sectores sociales menos favorecidos, en los países desarrollados. Varios estudios han mostrado una frecuencia de pacientes EBV positivos mayor en el sexo masculino que en el sexo femenino (Glaser et al., 1997) (Jarrett, Armstrong, and Alexander, 1996). De este modo, la asociación entre el EBV y el LH es compleja desde el punto de vista epidemiológico, dependiendo de varios factores tales como desarrollo económico del país de residencia, subtipo histológico, sexo y edad.

En el LH, el EBV exhibe un programa de latencia II, que involucra la expresión de los genes *EBNA1*, *LMP1* y *LMP2* (Chapman and Rickinson, 1998; Grasser et al., 1994; Kuppers, 2003; Rickinson and Kieff, 2001). La consistencia de este patrón de latencia viral implica el posible rol del virus en la patogénesis del LH y/o la posible susceptibilidad del tumor a una respuesta inmune celular EBV-específica. El mencionado patrón de expresión, así como evidencias experimentales recientes, sugieren fuertemente el papel del virus en el rescate y transformación de las células tumorales, ya que estas moléculas pueden comportarse como equivalentes de dos de las principales señales de supervivencia de las células centro-germinales: las señales tónicas del receptor de células B (*LMP2A*) y las señales de activación y proliferativas de CD40 (*LMP1*) (Brauninger, Schmitz, and Bechtel, 2006; Chaganti et al., 2005; Mancao, Altmann, and Jungnickel, 2005). Entre las neoplasias linfoides con latencia II, el LH representa un buen modelo para estudiar el papel patogénico del virus en situaciones de inmunocompetencia, donde no es expresado el principal transactivador viral, *EBNA2*, y por lo tanto, la regulación génica viral es altamente dependiente del microambiente celular. Otro factor que hace importante el estudio de este tumor es la escasez de modelos *in vitro* de latencia II, debido a que las células EBV+ en latencia I y II cuando se encuentran en condiciones de cultivo, ante la relajación de la inmunovigilancia, pasan la mayoría de las veces a expresar un programa de latencia III.

1.6 Heterogeneidad Molecular del EBV

1.6.1 Tipos virales

Existen dos tipos de EBV bien caracterizados, actualmente denominados tipos 1 y 2 (EBV-1 y EBV-2). Estudios *in vitro* mostraron que el EBV de tipo 2 tiene un potencial de transformación en células B menor que el de tipo 1. Esto es debido a diferencias existentes en genes de latencia (*EBNALP*, *EBNA2*, *EBNA3A*, *B* y *C*) (Dambaugh et al., 1984; Rickinson and Kieff, 2001; Young et al., 1987) principalmente en los genes, *EBNA2* y *EBNA3C* (Dambaugh et al., 1984).

EBV-1 y EBV-2 difieren en su distribución geográfica. Mientras que el EBV-1 predomina en los países Occidentales, ambos tipos están extendidos en África ecuatorial y Nueva Guinea (Hsu and Glaser, 2000). De manera general, se acepta que la prevalencia del tipo viral 2 en una población es un reflejo indirecto de su grado de inmunodeficiencia global. En el mismo sentido, la mayoría de los portadores sanos son infectados con el EBV-1, aunque un porcentaje menor puede portar múltiples cepas de EBV, lo que parece ser mucho más frecuente en los pacientes inmunosuprimidos (Brooks et al., 2000). Estos datos, junto con la capacidad transformante atenuada del EBV-2 sugieren que una condición inmunosuprimida preexistente es condición para que el EBV-2 sea capaz de efectuar una infección linfocítica generando posteriormente células B transformadas (Buisson et al., 1994).

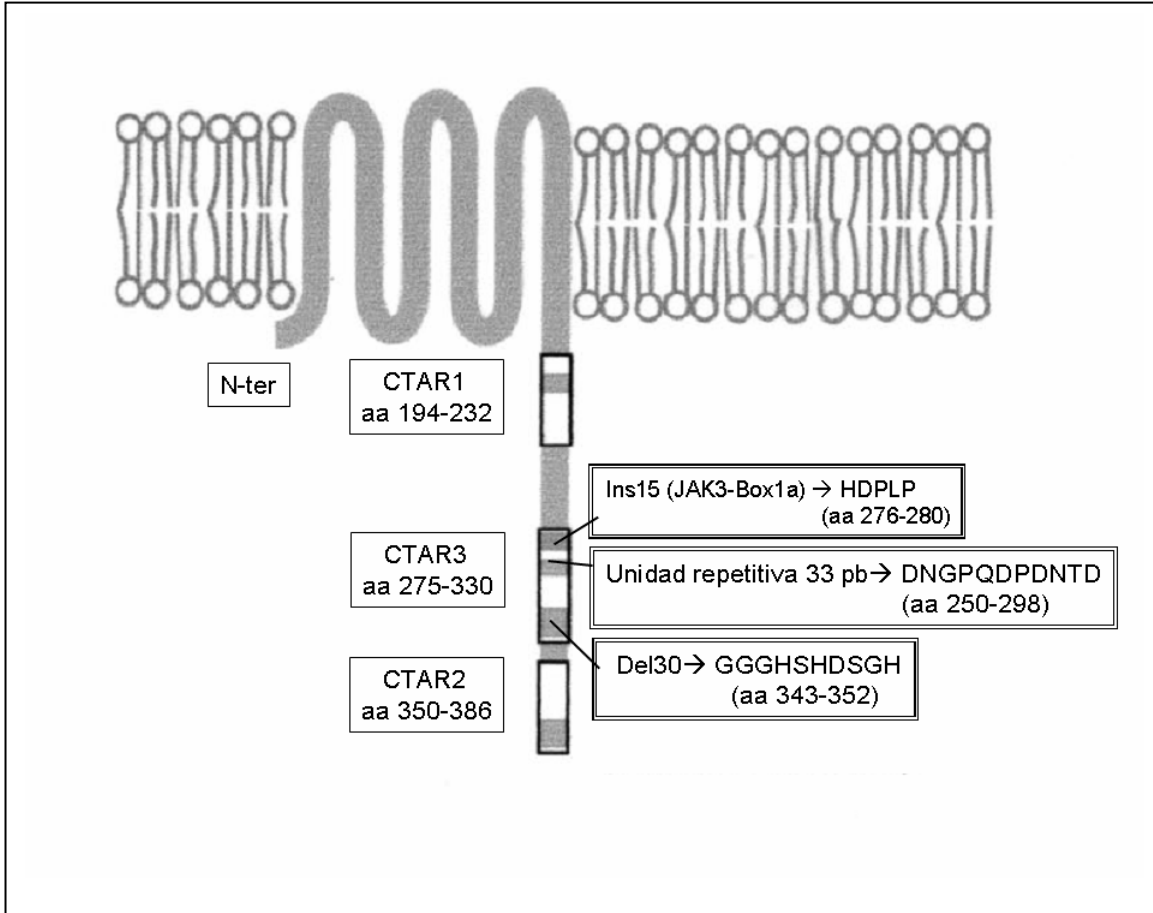
1.6.2 Heterogeneidad molecular del gen *LMP1*

Como mencionado anteriormente, cada una de las diferentes enfermedades asociadas al EBV es caracterizada por un fenotipo viral y celular único (Crawford, 2001; Kuppers,

2003; Rickinson and Kieff, 2001). Una proteína viral que ha recibido considerable atención es la proteína latente de membrana 1 (LMP1), la cual es expresada en todas las neoplasias asociadas al EBV con latencia II y III, excepto en el linfoma de Burkitt (latencia I).

La proteína LMP1 es reconocida como la principal oncoproteína latente, por estar involucrada en la transformación de células B, y por ser la única capaz de inducir un crecimiento maligno e hiperplasia en ratones transgénicos (Crawford, 2001; Rickinson and Kieff, 2001; Young and Rickinson, 2004). Es una molécula señalizadora de superficie, independiente de la unión al ligando, que actúa como un equivalente viral de CD40 activado constitutivamente, el cual, a su vez, tiene un rol clave en la activación y diferenciación de las células B (Kuppers, 2003). La proteína LMP1 induce síntesis de ADN e inhibe la apoptosis por estimular la sobre-expresión de BCL2 y NF- κ B entre otros (Chen et al., 1992; Eliopoulos and Young, 2001).

Estructuralmente, LMP1 es una proteína integral de membrana de 63 KDa que consta de 386 aminoácidos organizados en tres dominios: un corto dominio citoplasmático amino terminal (N-ter), seis segmentos transmembrana hidrofóbicos que median la oligomerización de las moléculas LMP1 en la membrana plasmática y un largo motivo citoplásmico carboxilo-terminal (C-ter) de 200 aminoácidos (Figura 1.2). Esta región codifica motivos de señalización intracelular a través de las regiones activadoras carboxilo terminal (CTAR), estimulando diversas vías, a saber: NF- κ B, JNK, MAPK y JAK3/STAT (Chen et al., 1992; Eliopoulos and Young, 2001; Young and Rickinson, 2004).



Pese a la dificultad de atribuir un fenotipo LMP1 alterado a sustituciones aminoacídicas simples, varios estudios sugieren que cambios aminoacídicos específicos localizados en dominios funcionales de la proteína LMP1 pueden incrementar su potencial oncogénico (Burrows et al., 2004; Sandvej et al., 2000). Por lo tanto, es interesante considerar la posibilidad de que ciertos cambios específicos de secuencia puedan definir genotipos oncogénicos. Aunque algunos estudios epidemiológicos han fracasado en establecer una correlación entre secuencias específicas de *LMP1* y determinadas patologías (Khanim F, 1996; Walling, Shebib, and Weaver, 1999), otros han identificado variantes de EBV con

genes *LMP1* que presentan un elevado potencial de transformación celular y decrecimiento en la inmunogenicidad (Blake, Eliopoulos, and Dawson, 2001; Fielding et al., 2001), correlacionándose con diferencias en patrones de crecimiento y con el curso clínico de enfermedades como CNF y LH.

1.6.2.1 Región carboxilo terminal

El gen que codifica la proteína LMP1 es uno de los más variables del EBV (Walling, Shebib, and Weaver, 1999). Su región C-ter codifica marcadores polimórficos tales como una delección de 30 pb (del30), una inserción de 15 pb (ins15), un número variable de repeticiones en tándem de 33 pb y mutaciones en *hot spots* característicos (Sandvej, Gratama, and Munch, 1997; Walling, Shebib, and Weaver, 1999).

La del30 se localiza en el tercer exón y se expande en un área crítica (codones 343 al 352), que es parte de una región mediadora de señalización de la vía JNK/AP-1 (CTAR-2), y parece cumplir una función en la regulación de la vida media de la proteína (Blake, Eliopoulos, and Dawson, 2001; Fielding et al., 2001). La ins15 codifica un motivo de señalización para la proteína Janus Kinase 3 (JAK3). El número variable de la secuencia repetitiva de 33 pb, localizada entre los aminoácidos 250-298 se sobrepone con un motivo de señalización de la proteína JAK3 (motivo JAK3-Box1a), en la región activadora CTAR-3 (Khanim et al., 1996) (Blake, Eliopoulos, and Dawson, 2001; Walling, Shebib, and Weaver, 1999).

Estos polimorfismos identificados en el extremo C-ter de LMP1 permitieron describir variantes moleculares y formular hipótesis acerca de la tumorigenicidad de las cepas del virus (Guidoboni, Ponzoni, and Caggiari, 2005; Sandvej et al., 2000; Sandvej, Gratama,

and Munch, 1997; Zhou et al., 1994). Los principales modelos de clasificación de las variantes de LMP1 se basan en las secuencias de la región C-ter y la presencia o ausencia de la del30 (Sandvej, Gratama, and Munch, 1997; Walling, Shebib, and Weaver, 1999) (Sandvej, 2000). El sistema Europeo de clasificación considera 4 grupos de secuencias (A-D) e incluye también secuencias de la región N-ter y del promotor (Sandvej, Gratama, and Munch, 1997).

La identificación de cepas de EBV tumor-específicas, contribuiría en confirmar evidencias sobre el papel patogénico del EBV, particularmente si cambios estructurales afectando la transcripción de genes virales claves fuesen demostrados.

En relación a esto, la del30 es foco de atención particular en investigaciones sobre variantes oncogénicas del EBV. Esta alteración genética ha sido también observada en procesos no neoplásicos, indicando estar ampliamente distribuida entre los individuos EBV positivos, independiente de la condición maligna. No obstante, en algunas regiones geográficas, su frecuencia es mayor en patologías neoplásicas, sugiriendo un mayor *fitness* respecto al tipo salvaje (Chabay et al., 2004; Dirnhofer, Angeles-Angeles, and Ortiz-Hidalgo, 1999; Guidoboni, Ponzoni, and Caggiari, 2005). Lo mencionado anteriormente, sustenta el interés en dilucidar si la mera presencia de la del30 del gen *LMP1* está correlacionada con la susceptibilidad y/o el grado de agresividad de la neoplasia y por lo tanto puede ser usada como una herramienta para determinación de pronóstico de la enfermedad (Williams and Crawford, 2006).

En relación a la asociación de la variante del30 con un incremento en la actividad oncogénica viral, datos conflictivos han resultado de estudios epidemiológicos e *in-vitro* (Fielding et al., 2001; Mainou and Raab-Traub, 2006). En América del Norte y

poblaciones europeas, la del30 LMP1 fue observada en el 70% de los linfomas asociados a HIV, pero su presencia fue significativamente menor en portadores EBV asintomáticos (Knecht et al., 2001). De manera inversa, la del30 fue detectada en un 20-30% de los LH EBV positivos en individuos europeos inmunocompetentes (Knecht. H et al., 1993; Sandvej et al., 2000). En los LH EBV+ de la China, la frecuencia de la del30 fue de 83%, siendo esta asociación similar en los controles no neoplásicos debido a que 86% de éstos también presentó la del30 (Zhou et al., 2001) . Lo mismo fue detectado en México, donde 80% de los LH y 59% de los controles no neoplásicos mostraron la variante delecionada (Dirnhofer, Angeles-Angeles, and Ortiz-Hidalgo, 1999). En América del Sur, existen pocos estudios de caracterización genética de las variantes virales circulantes. Una alta frecuencia de la del30 ha sido reportada en algunos estudios de América del Sur (Chabay et al., 2004; Chen et al., 1996; Hayashi et al., 1997). No obstante, aunque la variante delecionada fue encontrada solo en 7,4% de la población sana Argentina, (Correa et al., 2004) aproximadamente 60% de los casos no neoplásicos de Brasil presentaron la del30 (Hayashi et al., 1997). De este modo, no es claro si la alta frecuencia de la del30 en cánceres asociados al EBV simplemente refleja la predominancia geográfica de estas variantes o si es debido a interacciones virus-huésped especiales que inducen una producción y/o selección incrementada de mutantes LMP1 delecionados, como sugerido previamente en un estudio de LH asociado a HIV+ (Guidoboni et al., 2005).

1.6.2.2 Región promotora y amino Terminal

El gen *LMP1* en un programa de latencia II es regulado de manera independiente del transactivador EBNA2, estando su expresión influenciada por el entorno celular, de forma todavía no bien entendidas.

Variaciones de secuencias en la región promotora parecen contribuir a la gran heterogeneidad molecular del gen *LMP1*. Sin embargo esta variabilidad solamente fue investigada en 2 estudios: en LH Europeos y el sudeste asiático (Sandvej et al., 2000) (Zhou et al., 2001). Dentro de la clasificación Europea, el grupo D es el que mayor número de mutaciones presenta tanto en el gen *LMP1*, incluyendo su región reguladora, similarmente la variante de la línea celular CAO, aislada a partir de un CNF asiático asociado al EBV. Esta última variante presenta 46 mutaciones en su promotor con respecto al prototipo B95.8 (Sandvej, Gratama, and Munch, 1997). Estudios previos han demostrado diferencias significativas entre LMP1-B95.8 y LMP1-CAO respecto al grado de tumorigenicidad (Fielding et al., 2001; Flavell and Murray, ; Sandvej et al., 2000; Sandvej, Gratama, and Munch, 1997). Se postula que la divergencia a nivel de secuencia en la variante CAO esté asociada con el desarrollo de una enfermedad más agresiva, generando un aumento en la actividad de expresión de moléculas claves de diferentes vías de señalización celular. Sin embargo, la importancia funcional de estas mutaciones es desconocida (Sandvej et al., 2000).

El promotor de *LMP1* contiene diversos sitios de reconocimiento de factores de transcripción, entre ellos el sitio de reconocimiento de factores activadores de la transcripción y de unión a elementos de respuesta a cAMP (ATF/CREB), ubicado entre las posiciones -45 a -38 (relativo al sitio de iniciación de la transcripción).

Otra vía de señalización de importancia funcional en la proteína LMP1 es JAK3/STAT. El promotor de *LMP1* es responsivo a los factores de transcripción STAT (transductor de señal y activador de la transcripción), que a la vez es activado por las regiones codificantes C-ter de la proteína LMP1, en lo que es caracterizado como un *loop* positivo de autorregulación (Chen et al., 2001) (Chen, Lee, and Zong, 2001; Goormachtigh, Ouk, and Mougel, 2006). En la literatura, la activación aberrante de la vía JAK/STAT ha sido descrita en varios cánceres humanos (Bowman, Garcia, and Turkson, 2000; Weber-Nordt, Egen, and Wehinger, 1996). El análisis de los diferentes patrones de secuencia tanto de la región promotora, como de la región C-ter, donde se localiza un sitio de unión (motivo JAK3-Box 1a) a la proteína JAK3 en el dominio CTAR-3 (ver Figura 1.2) (Fielding et al., 2001), contribuiría al entendimiento de la participación de la vía de señalización STAT en la expresión del gen *LMP1*.

Otro tipo de polimorfismos, surgidos por mutaciones puntuales que generan la pérdida de un sitio de restricción fueron utilizados en estudios anteriores como marcadores de variantes virales (Khanim et al., 1996). La pérdida de un sitio de restricción de la enzima *XhoI* en el primer exón del gen *LMP1* fue originalmente identificado en variantes mas oncogénicas de EBV asociado a CNF surgido en el sudeste asiático. El patrón de mutaciones responsable de la pérdida del sitio de restricción no fue consistentemente hallado en aislamientos virales de EBV de Europa, África (línea celular Raji) y Nueva Guinea (Khanim et al., 1996). Hasta el presente, no existen estudios sobre la prevalencia de este marcador, así como sobre los patrones moleculares en el promotor de *LMP1* provenientes de EBV circulantes en América del Sur. Por esto, es interesante estudiar, en las diferentes situaciones geográficas donde el linfoma de Hodgkin se desarrolla, la

presencia de estos polimorfismos, contribuyendo a un mejor entendimiento biológico de la asociación virus-cáncer así como, la posibilidad de desarrollar marcadores epidemiológicos para esta neoplasia en particular.

1.7 Relaciones filogenéticas entre las variantes del EBV

De acuerdo con la definición de especie viral reconocida por el ICTV (International Committee on the Taxonomy of Viruses): “Una especie viral es una clase politética de virus que constituye un linaje replicante y ocupa un nicho ecológico particular” (Van Regenmortel, 1990), las variantes moleculares del EBV (EBV-1 y EBV-2) difieren marcadamente en varias secuencias génicas, con consecuencias funcionales en algunas propiedades biológicas, incluyendo potencial de transformación. Sin embargo, (a) las variantes no ocupan nichos ecológicos distintos, (b) las diferencias mapean en un número limitado de genes, y (c) han sido detectadas secuencias intermediarias, producto de recombinación entre ellas. De esta manera, las variantes de EBV deben ser reconocidas como variantes “alélicas” de la misma especie. Con esta misma lógica, las variantes del gen LMP1 son consideradas intraespecíficas, y los estudios filogenéticos más comprensivos permiten trazar relaciones evolutivas entre ellas. Como el EBV es un virus de ADN de genoma grande y con relaciones co-evolutivas con su hospedador, las diferencias evolutivas entre los linajes son pequeñas. Sin embargo, en un estudio con 22 variantes de la región C-ter de LMP1 (103 secuencias) fue identificado un origen monofilético de todas las variantes, y de tres a siete linajes claramente diferenciados (Walling, Shebib, and Weaver, 1999).

2. OBJETIVOS

Objetivos Generales

Estudiar la variabilidad molecular de regiones polimórficas del gen *LMP1*, en casos de linfoma de Hodgkin y condiciones no neoplásicas asociados al virus Epstein-Barr de la región Sudeste de Brasil, tendiente a identificar asociaciones patogénicas significativas.

Objetivos Específicos

Determinar la frecuencia y tipificación de la infección por el virus EBV, por hibridización in situ para los ARN EBERs, por inmunohistoquímica para LMP1 y por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), caracterizando clínico-biológicamente los diferentes subtipos histológicos de LH y condiciones no malignas.

Caracterizar los genotipos circulantes del virus EBV mediante la secuenciación de regiones promotoras y codificantes del gen *LMP1* para identificar las variantes prevalentes en la región geográfica estudiada.

Correlacionar los resultados obtenidos en los estudios moleculares con las características clínico-biológicas del grupo investigado.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Grupo de estudio

En el presente trabajo fueron estudiados 111 casos de linfoproliferaciones primarias: 71 LH y 40 hiperplasias reactivas benignas (HR), admitidas en el Centro de Transplante de Medula Ósea (CEMO) y los Servicios de Oncología Clínica, Hematología y Anatomía Patológica del Instituto Nacional do Câncer (INCA), Rio de Janeiro, Brasil. Todos los casos de LH fueron diagnosticados en personas inmunocompetentes, mientras que 4 casos de hiperplasia reactiva (HR) fueron positivos para el virus de la inmunodeficiencia humana adquirida (HIV). Los casos incluidos fueron colectados en el período de 2002 a 2006 y clasificados según criterios morfológicos e inmunohistoquímicos, de acuerdo a la clasificación de la Organización Mundial de la Salud (OMS) (Jaffe et al., 2001), por el servicio de Anatomía Patológica del INCA. Los pacientes con LH fueron caracterizados como pediátricos (0 a 15 años, N = 12) o adultos (> a 15 años, N = 59). Con el mismo criterio, 11 casos con hiperplasia reactiva fueron considerados pediátricos y 29 adultos.

Adicionalmente, fueron estudiadas 15 muestras de lavado de orofaringe de individuos sanos, que junto con los casos de HR, fueron considerados como controles no neoplásicos (CNN).

Del grupo de LH, en 46 casos, se analizaron paralelamente muestras correspondientes a material fijado en formol e incluido en parafina (FIP) proveniente de LN, las cuales fueron utilizadas para realizar técnicas de hibridización *in situ* (ISH), inmunohistoquímica (IHQ) y extracción de ADN.

En los 111 casos, las muestras consistieron en material fresco: linfonodos (N=98), tumores mediastínicos (N=3), tumor retroperitoneal (N=1), tumor paravertebral (N=1),

proceso linfoproliferativo en dermis (N=2), vejiga (N=1), amígdalas (N=3) y dos muestra de sangre periférica (N=2). En dos casos se obtuvieron 2 muestras del mismo paciente. Como controles, fueron analizadas 7 líneas celulares provenientes de diferentes neoplasias hematológicas: linfoma de Burkitt, linfoma de efusión pleural y eritroleucemia (Tabla 3.1).

Tabla 3.1: Líneas celulares utilizadas como controles

Nombre	Origen	Característica	Referencias
Raji	LB endémico	EBV+	[CCL-86 ATCC]
CEMO 3	LB	EBV+	Lab Biol Mol (INCA)
Ramos	LB esporádico	t(8;14) (q24;q32), EBV -	[CRL-1596 ATCC]
Namalwa	LB endémico	t(8;14) (q24;q32), EBV+	[CRL-1432 ATCC]
BC1	Linfoma de efusión pleural	HHV-8+, EBV+Tipo 2	[CRL-2230 ATCC]
BC2	Linfoma de efusión pleural	EBV+ Tipo 1	[CRL-2231 ATCC]
K562	Eritroleucemia	t(9;22), BCR-ABL+, EBV-	[CCL-243 ATCC]

Abreviaciones: LB, Linfoma de Burkitt; EBV, virus Epstein-Barr; Lab. Biol. Mol. (INCA), Laboratorio de Biología Molecular del Instituto Nacional de Cáncer; ATCC, *American type culture collection*.

El trabajo experimental fue desarrollado en el laboratorio de Biología Molecular, CEMO, INCA. Los diagnósticos histopatológicos, así como los resultados de las determinaciones de ISH e IHQ fueron revisados por el médico especialista en Patología, Mário Henrique Magalhaes Barros, del Laboratorio de Biología Molecular.

3.2 Procesamiento de muestras biológicas

3.2.1 Manipulación y expansión de líneas celulares

Las líneas celulares fueron cultivadas en medio RPMI-1640 (Sigma) suplementado con 20% de suero fetal bovino (SFB) (Invitrogen), penicilina (100 IU/ml), estreptomycin (50

$\mu\text{g/ml}$) y L-glutamina, en una atmósfera de 5% de CO_2 a 37 °C en condiciones de total esterilidad. Las células en suspensión fueron mantenidas a una concentración de 1×10^6 células/ml realizándose controles periódicos para determinar el tiempo de repique adecuado. Ensayos de viabilidad celular fueron realizados periódicamente mediante la coloración de Azul de Trípano (Sigma).

3.2.2 Separación de células por gradiente de centrifugación

Las muestras de sangre periférica (SP) fueron colocadas sobre un volumen igual de Ficoll-Histopaque®-1077 (Sigma) y centrifugadas a 2000 rpm por 20 minutos a 25°C. Las células mononucleares localizadas en la interfase fueron extraídas con pipeta Pasteur y transferidas a un nuevo tubo. Seguidamente, fueron realizados 2 lavados con PBS, por centrifugación a 1500 rpm, por 7 minutos a 25°C. Las células fueron resuspendidas en 1 ml de PBS y contadas en cámara de Neubauer. Finalmente se separaron alícuotas celulares para posterior extracción de ADN y ARN.

3.3 Detección del virus Epstein-Barr mediante la técnica de hibridización in-situ (ISH)

El objetivo de esta técnica fue detectar la presencia del EBV en muestras FIP, utilizando sondas con marcación fluorescente, específicas para el ARN viral EBER (Novocastra NCL-EBV-K). Los transcritos EBERs son abundantes (10^6 / célula) y se concentran en el núcleo de células infectadas latentemente promoviendo la supervivencia celular y la persistencia viral.

Esta técnica consta de 3 etapas:

Pre-tratamiento: Las secciones histológicas fueron colocadas sobre portaobjetos tratados con poli-D-Lisina, para permitir la adhesión del tejido. Las preparaciones fueron desparafinadas con xilol e hidratadas con lavados sucesivos de etanol (Merck) a concentraciones descendentes. La digestión enzimática fue realizada con proteinasa K (200 µg/ml) (Invitrogen) en tampón Tris-HCl 50mM (pH 7.6) por 20 minutos a 65°C. Posteriormente las preparaciones fueron deshidratadas en lavados sucesivos de etanol a concentraciones ascendentes y dejadas secar a temperatura ambiente (TA).

Hibridización: Las preparaciones fueron incubadas con la ribosonda para los transcriptos EBERs en solución de hibridación, por 2 hs a 37°C en cámara húmeda. Completado el tiempo de hibridación, los portaobjetos fueron sometidos a 3 lavados en tampón TBS [50mM Tris-HCl, 150 mM NaCl pH 7,6] conteniendo 0,1% de Tritón X-100, por 3 minutos cada uno, a TA.

Detección: Se realizó una incubación con 100 µl de solución bloqueante (SB) [TBS, 0,1% Tritón X-100, 3% p/v BSA], por 10 minutos a TA en cámara oscura. Eliminado el exceso de SB, se adicionó el anticuerpo monoclonal primario conjugado con la enzima fosfatasa alcalina [F(ab') anti-FICT/AP] (Novocastra), diluido 1:200 en SB y se incubó por una hora minutos a TA.

Las preparaciones fueron lavadas en tampón substrato de la fosfatasa alcalina [100 mM Tris-HCl, 50 mM MgCl₂, 100 mM NaCl pH 9.0] por 5 minutos a TA. Eliminado el exceso, se adicionó, en oscuridad, la solución de revelación conteniendo 1 ml de tampón substrato de la fosfatasa alcalina, 8 µl del substrato enzimático 5-bromo-4-cloro-3-indol-fosfato (BCIP) y azul nitro tetrazolio (NBT) y 1 µl del inhibidor enzimático Levamisole 1

M. Las preparaciones se incubaron en cámara oscura por 16 hs a TA y finalmente fueron lavadas en agua corriente por 5 minutos. La contracoloración se realizó con Hematoxilina de Harris por 10 segundos y el montaje se realizó en medio acuoso (Glicergel, Dako). Un caso de LB-EBV+ fue utilizado como control positivo.

3.4 Método de Inmunohistoquímica para detección de la proteína latente de membrana 1 (LMP1) del EBV

El objetivo de esta técnica fue inmuno-localizar la expresión de la proteína LMP1 en las células tumorales de muestras FIP. Las secciones de material colocadas sobre láminas silanizadas fueron desparafinadas con xilol e hidratadas por incubación secuencial en etanol de concentraciones descendentes. La recuperación antigénica fue realizada con tampón 10 mM citrato (pH 6,0) en horno de microondas a 950 watts por 3-8 minutos (dependiendo de la cantidad de láminas). La peroxidasa endógena se inactivó por tratamiento con H₂O₂ 30% (10 volúmenes a 3% de la solución comercial) en etanol por 5 minutos a TA. Seguidamente, se incubó el material en solución de BSA 3% en Tris-HCl pH 7,6; en cámara húmeda, para bloquear ligaciones inespecíficas. Como anticuerpo primario se utilizó el “pool” de anticuerpos monoclonales anti-LMP1 (clones CS1-4, Dako) (dilución 1:100). Después de la incubación con el anticuerpo primario por 2 hs a TA, se realizó la amplificación de la señal mediante la incubación con un anticuerpo monoclonal secundario biotinilado (LSAB, DAKO), seguido de otra incubación con estreptavidina-peroxidasa, en cámara húmeda a TA. Luego se incubaron las láminas con un complejo peroxidasa-estreptavidina y se reveló con el substrato cromógeno 3,3’-

Diaminobenzidina (DAB, DAKO), observando la progresión de la reacción por visualización de la coloración, hasta detenerla con agua destilada.

Las muestras se contra-colorearon con Hematoxilina de Harris y fueron montadas con medio acuoso para su posterior observación al microscopio óptico. Como control positivo se usó una muestra de LH, subtipo CM, con marcación específica en las membranas plasmáticas de las células H-RS.

3.5 Extracción de ácidos nucleicos

3.5.1 Extracción de ADN a partir de células en suspensión

Las suspensiones de células fueron centrifugadas 7 minutos a 1500 rpm, lavadas como mínimo 2 veces en PBS y contadas en cámara de Neubauer. Alícuotas de $1-3 \times 10^7$ de estas células fueron resuspendidas y lisadas en 1 ml de DNAzol® (Gibco BRL), siguiendo recomendaciones del fabricante. El ADN fue precipitado con 0,5 ml de etanol absoluto (Merck) a 4°C, seguido por dos lavados posteriores con etanol 95%. El ADN fue solubilizado en 300 - 500 µl de Na (OH) 8 mM y neutralizado con HEPES 0,1 M.

3.5.2 Extracción de ADN a partir de tejido sólido

Las muestras de tejido sólido fresco fueron colectadas y transportadas en medio RPMI-1640 con 20% de SFB. Los “debris” celulares fueron despreciados y el tejido restante fue sometido a disociación mecánica en placas de Petri utilizando bisturíes estériles y tijeras de punta fina. Los fragmentos disgregados fueron sometidos a una digestión por 12 hs, a 65°C en solución tampón (10 mM de Tris-HCl, 10 mM EDTA pH 8,0 y 10 mM NaCl)

con 0,1% de dodecil sulfato sódico (SDS) (Sigma) y 200 µg/mL de proteinasa K (Gibco BRL).

Al producto de digestión enzimática se adicionó un volumen equivalente de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1)(Sigma) saturado con 10 mM de Tris pH 8,0 y 1mM de EDTA. Luego de inversiones repetidas durante 10 minutos, los tubos fueron centrifugados a 3000 rpm por 30 minutos a 25°C. El sobrenadante fue transferido a un nuevo tubo y se adicionó igual volumen de cloroformo (Merck), repitiéndose la centrifugación en las mismas condiciones. El ADN fue precipitado a partir del sobrenadante con acetato de sodio 3M (pH 5,2) en una proporción 1:10 (v/v) y 2 volúmenes de etanol absoluto a 4°C, seguido de 2 lavados con etanol 70%. De acuerdo a la cantidad obtenida, el ADN fue resuspendido en 50 a 500 µL de tampón TE (Tris 10mM–EDTA 1mM).

3.5.3 Extracción de ADN a partir de muestras fijadas en formol e incluidas en parafina

Fueron procesadas muestras FIP para la obtención de ADN. Los procedimientos fueron realizados siguiendo protocolos desarrollados previamente en el laboratorio (Stefanoff, Hassan, and Gonzalez, 2003), a partir de secciones microtomizadas de 5 µm. La desparafinización de los cortes fue realizada por dos baños de 1 ml de xilol cada uno por 5 minutos y centrifugación a 5000 rpm por 10 minutos. Estos procedimientos fueron repetidos. El tejido desparafinado fue lavado 2 veces con etanol 100%. Después de eliminado el sobrenadante por centrifugación, el tejido fue secado a TA.

Los tejidos desparafinados y secos fueron resuspendidos en una mezcla de digestión, conteniendo un tampón no iónico de lisis nuclear (NIB: KCl 50 mM, Tris-HCl pH 8,0 10 mM; EDTA 0,1 mM; Tween 20® 0,5% v/v) conteniendo proteinasa K (200 µg/ml), seguido de incubación por 12 hs a 65°C. Dependiendo de la eficiencia de la digestión, fue realizada una nueva digestión con proteinasa K (200 µg/ml) por 6 hs adicionales. Completada la digestión, la proteinasa K fue inactivada por calentamiento a 95% por 8 minutos. El lisado celular se colocó por 3 minutos en baño de hielo y se centrifugó 10 minutos a 5000 rpm. El sobrenadante fue transferido a un nuevo tubo y almacenado a 4°C para procedimientos futuros.

Durante el desarrollo de esta técnica, fueron seguidos procedimientos rígidos a fin de evitar la degradación adicional del ADN por la acción de nucleasas y la contaminación cruzada entre muestras.

3.5.4 Extracción de ADN a partir de células epiteliales de la orofaringe

Las muestras de células epiteliales de la orofaringe de donadores saludables, fueron obtenidas a partir de lavados bucales con PBS por 5 minutos. La suspensión celular fue centrifugada por 30 minutos a 4000 rpm, el sobrenadante fue descartado y las células fueron resuspendidas en tampón de digestión NIB conteniendo proteinasa K (200 µg/ml). La digestión y los procedimientos pos-digestión fueron idénticos a los descriptos en la sección anterior (3.5.3).

3.5.5 Extracción de ARN total

El ARN total fue obtenido a partir de alícuotas de $2-8 \times 10^6$ células lisadas en 1 ml del reactivo TRIzol® (Invitrogen). El lisado fue agitado mecánicamente e incubado durante 5 minutos a temperatura ambiente, luego se adicionó 200 μ l de cloroformo y se centrifugó a 12.000 rpm por 10 minutos a 4°C. La fase acuosa se transfirió a un nuevo tubo y el ARN se precipitó con 500 μ l de isopropanol (Merck). El pellet de ARN fue lavado con 1 ml de etanol 75%, secado a TA y solubilizado en 12 μ l de agua DEPC (dietil-pirocarbonato). Una vez evaluado cualitativa y cuantitativamente, el ARN fue utilizado de inmediato y posteriormente almacenado a -80°C . Las manipulaciones fueron realizadas en ambientes aislados, con instrumental y material plástico libre de ARNasas y soluciones preparadas con agua tratada con DEPC para evitar la contaminación y degradación del ARN.

3.5.6 Evaluación de ácidos nucleicos

La concentración y pureza de los ADN y ARNs obtenidos fueron evaluadas por espectrofotometría. La cuantificación fue efectuada en un espectrofotómetro NanoDrop Spectrophotometer ND-1000 V3.2.1, mediante lecturas a longitudes de onda (λ) de 260 nm (ADN) y 280 nm (proteínas), considerándose una unidad de densidad óptica (DO) como equivalente a 50 $\mu\text{g/ml}$ de ADN y 40 $\mu\text{g/ml}$ de ARN. El grado de pureza de las muestras fue estimado por la relación 260/280, con valores $<$ a 2 considerados satisfactorios.

La integridad de los ADN y ARNs obtenidos fue evaluada por electroforesis en gel de agarosa 0,8% conteniendo 0,5 $\mu\text{g/mL}$ de bromuro de etidio (Gibco) en tampón TAE o

tampón fosfato 0,1M, respectivamente. Los criterios tomados en cuenta en la evaluación empírica del ADN fueron: (a) ADN de alto peso molecular, con una mayor intensidad de coloración, limitado a la zona superior del gel; (b) ADN degradado, con una migración uniforme a lo largo del gel, generando un rastro o *smear* característico y (c) ADN altamente degradado, identificado por la ausencia de *smear* superior y restringido al área próxima o inferior a 200 pb. Niveles variados de degradación fueron esperados en el ADN extraído a partir de material FIP. Como marcador de concentración e integridad, las muestras fueron comparadas con el patrón de electroforesis del ADN del fago λ no digerido (Sigma). El ARN fue considerado de calidad óptima cuando las dos poblaciones mayoritarias de ARN ribosómico (28S y 18S), estuvieron presentes, con tamaños aproximados de 5 Kb y 2 Kb respectivamente.

3.6 Condiciones generales de los métodos basados en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Las condiciones de cada una de las reacciones de PCR fueron establecidas siguiendo especificaciones estándares (Saiki et al., 1988). Las reacciones fueron diseñadas para volúmenes finales de 30-50 μ L, utilizando tampón de PCR (Invitrogen) (50 mM KCl; 10 mM Tris H-Cl pH 8,3); Cl_2Mg a concentraciones finales de 1,5-2,5 mM; dNTPs (dATP, dTTP, dCTP y dGTP; Pharmacia) a 200 μ M cada uno; oligonucleótidos cebadores o *primers* en concentraciones de 0,2 a 0,6 μ M cada uno y agua desionizada estéril hasta completar el volumen de la reacción. En todos los casos fue incorporado, por reacción, 0,2 μ g a 1 μ g de ADN y 1-2 U de *Taq* DNA polimerasa.

Todas las reacciones de PCR fueron realizadas en termocicladores Flexigene (Techne). Los perfiles térmicos de cada PCR utilizada siguieron las directivas generales para la amplificación con la *Taq* DNA polimerasa: una etapa inicial de desnaturalización a 94°C por 3 minutos, seguida de 25 a 35 ciclos con desnaturalización a 94°C por un minuto, temperatura y tiempo de *annealing* optimizados para cada conjunto de *primers* y extensión a 72°C (1 minuto/1000 pb); seguida de un ciclo final de extensión a 72°C por 10 minutos y una etapa final a 4°C.

En todas las reacciones de PCR en que se utilizaron las enzimas *Taq* DNA polimerasa Platinum® o *Taq* DNA Polymerase High Fidelity Platinum® (Invitrogen), se incluyó una etapa inicial de desnaturalización de 5 minutos a 95°C. Este paso tuvo como objetivo la activación enzimática, ya que la enzima se encuentra acomplejada con un anticuerpo específico que bloquea su actividad a temperatura ambiente, permitiendo, de esta manera, la aplicación de la metodología “*Hot Start*”.

La enzima *Taq* DNA Polymerase High Fidelity Platinum® posee una habilidad de corrección de prueba (*proofreading*) debido a su actividad exonucleasa 3'-5', aumentando la fidelidad de copia aproximadamente 10 veces más que la *Taq* DNA polimerasa común. Esta propiedad fue explotada en las metodologías implementadas para analizar mutaciones en el ADN.

A fin de evitar contaminación de las muestras con otros ADNs o con productos amplificados previamente (amplicones), fueron seguidas medidas sistemáticas, a saber: (a) Todos los materiales y reactivos utilizados en la preparación de las reacciones de PCR permanecieron siempre en ambientes físicamente separados del sector de procesamiento de los productos amplificados; (b) fueron utilizados materiales descartables, punteras con

filtro y micropipetas automáticas con desplazamiento positivo, diferenciadas para los procedimientos *pre* y *pos*-amplificación; (c) las superficies y pipetas fueron descontaminadas con alcohol isopropílico 70% antes de cada proceso; (d) siempre fueron utilizados guantes descartables, siendo substituidos frecuentemente durante todos los procedimientos de pre y post- amplificación.

3.6.1 Amplificación de genes constitutivos

Antes de realizar las reacciones de PCR específicas, el ADN extraído fue evaluado utilizando una reacción de PCR “multiplex” que incluyó, en la misma reacción, *primers* para los genes constitutivos de copia simple *GAPDH*, β -globina y β -actina (amplicones de 450, 300 y 180 pb, respectivamente) (Stefanoff, Hassan, and Gonzalez, 2003). Los *primers* y condiciones de la reacción se encuentran descritos en la Tabla A1 (Anexo I). Los productos se evaluaron por electroforesis en geles de agarosa 2% coloreados con bromuro de etidio (0,5 μ g/ml).

3.6.2 Análisis de clonalidad en linfoproliferaciones reactivas

Las muestras de HR incluidas en este estudio fueron enviadas al laboratorio de Biología Molecular para diagnóstico diferencial con linfoproliferaciones malignas. Para esto, fueron sometidas a investigación molecular de clonalidad, que es considerada, en términos generales, una característica de las neoplasias linfoides. En términos generales, se espera que las hiperplasias reactivas presenten un patrón policlonal.

La poli o monoclonalidad de una muestra fue determinada por reacciones de PCR específicas para amplificar los rearrreglos de la región variable del gen de la cadena

pesada de la inmunoglobulina (IGH, clonalidad B) y del receptor de células T gamma (TCR γ , clonalidad T) (Stefanoff, Hassan, and Gonzalez, 2003). Los *primers* y condiciones de las reacciones se encuentran descritos en la Tabla A1 (Anexo I). Los productos fueron evaluados por electroforesis en geles de poliacrilamida 8% coloreados con nitrato de plata.

3.6.3 Detección y tipificación del virus EBV por PCR

La presencia del EBV en muestras de ADN de alto peso molecular o de parafina, se determinó por PCR convencional, con el uso de iniciadores para segmentos específicos del gen *EBER1* y del fragmento BamHW (Tabla A2 - Anexo I). Las reacciones fueron establecidas para 50 μ l de volumen final, 2,5 mM de MgCl₂, coadyuvante gelatina 0,01%, 0,4 μ M de cada primer y 1U de *Taq* DNA polimerasa Platinum®. El perfil térmico consistió de 35 ciclos de 94°C por 45 segundos; 52°C por 60 segundos y 72°C por 45 segundos. Los métodos de PCR para amplificar estas 2 regiones fueron optimizados utilizando las mismas condiciones térmicas y de reacción, para permitir detección y confirmación del virus en ensayos paralelos.

La determinación del tipo viral 1 o 2 (tipificación) se basó en la amplificación diferencial de regiones virales del gen *EBNA2* utilizando un método optimizado en el laboratorio de Biología Molecular, en relación a los resultados de la técnica patrón, ISH (Sambrook and Russell, 2001) (Tabla A2 - Anexo I). El método de tipificación consistió en una reacción de PCR-nested en la cual la primera etapa incluyó *primers* para una región del gen *EBNA2* común a los tipos 1 y 2 (EBNA2-F y EBNA2-I). La segunda etapa fue diseñada para amplificar la región que discrimina ambos tipos, en reacciones separadas (EBNA2-C

y G para el tipo 1 y EBNA2-C y B para el tipo 2) (Figura 3.1). El ADN fue amplificado en reacciones de 50 µl de volumen final, utilizando 1,5 mM MgCl₂ y 1U de *Taq* DNA polimerasa Platinum (Invitrogen). El perfil térmico de la primera etapa consistió de 35 ciclos de 94°C por 1 minuto; 52°C por 90 segundos y 72°C por 4 minutos y de la segunda etapa consistió de 35 ciclos de 94°C por 30 segundos; 52°C por 60 segundos y 72°C por 2 minutos. En cada reacción se incluyeron los siguientes controles: EBV tipo 1 (línea celular BC2), EBV tipo 2 (línea celular BC1), control negativo (línea celular Ramos) y control de PCR (sin ADN).

Los productos de PCR fueron revelados en geles de agarosa 2% con bromuro de etidio, y marcador de peso molecular de 100 pb (100 bp ladder, Invitrogen).

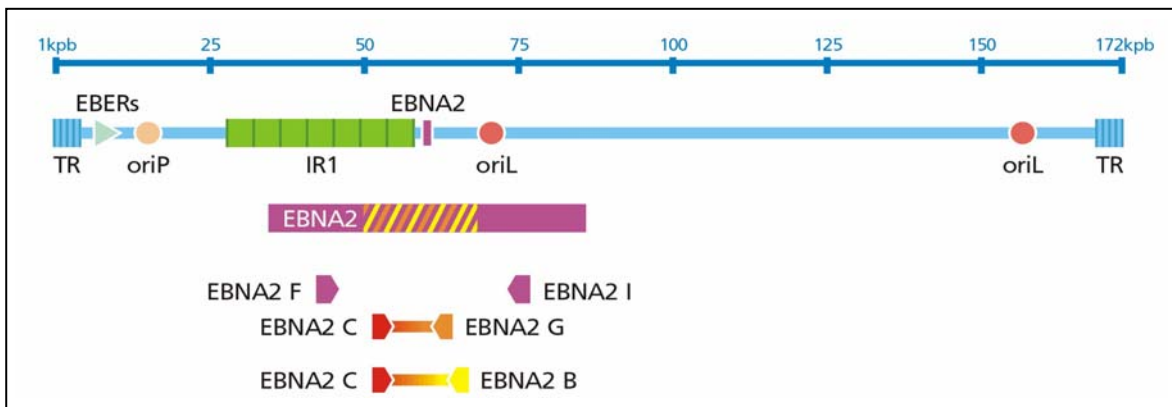


Figura 3.1: Esquema de la estrategia de amplificación del gen *EBNA2* para la detección y tipificación del EBV. En escala, el diagrama del genoma viral, incluyendo las repeticiones terminales (TR), los orígenes de replicación para el ciclo de latencia (OriP) y el ciclo lítico (OriL), la localización de los genes *EBERs* y del gen *EBNA2* (blanco de la detección molecular). *Primers* de la primera etapa: EBNA2-F y EBNA2-I; *primers* de la segunda etapa para el tipo 1: EBNA2-C y EBNA2-G, *primers* de la segunda etapa para el tipo 2: EBNA2-C y EBNA2-B.

3.6.4 Amplificación de regiones polimórficas del gen que codifica la proteína latente de membrana 1 (LMP1)

En este trabajo, fueron diseñadas reacciones de PCR para amplificar diferentes marcadores polimórficos del gen *LMP1*, como esquematizado en la Figura 3.2. En la región C-ter fueron amplificadas la del30 y la región de repeticiones de 33 pb. Un segmento mayor de la región C-ter fue también amplificado con el objetivo de ser secuenciado. Un segmento proximal del promotor, así como la región N-ter conteniendo el sitio de restricción *XhoI* fueron amplificados con reacciones específicas.

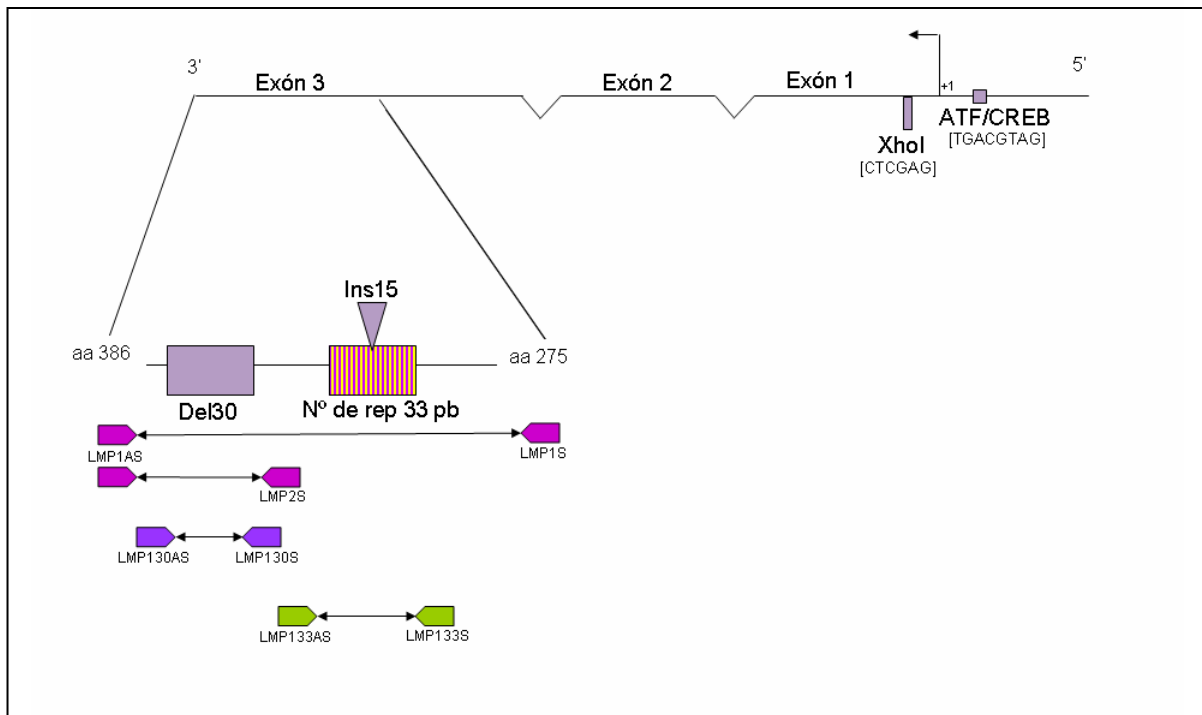


Figura 3.2: Esquema del gen *LMP1* representando las regiones de variabilidad en los dominios C-ter. Del30, delección de 30 pb, N° de rep 33 pb; número de repeticiones en tándem de 33 pb; Ins15, inserción de 15 pb. Las flechas indican la localización de los *primers* y las estrategias de amplificación utilizadas.

3.6.4.1 PCR para la región C-ter del gen *LMP1*

Fue optimizada una reacción de PCR para amplificar una región de 440 pb que incluyó la mayor parte del exón 3 (aminoácidos 275 a 386), en reacciones de 50 µl de volumen final, 2,5 mM de MgSO₄, coadyuvante Triton X-100 0,01%, 0,2 µM de *primers* específicos y 1,5 U de la enzima *Taq* DNA polimerasa High Fidelity Platinum (Invitrogen). Para la amplificación, fue establecido un perfil térmico *touch-down* que incluyó temperaturas de *annealing* descendientes en un grado por cada 2 ciclos (de 63°C a 56°C), seguido de 15 ciclos a una temperatura de *annealing* de 56°C. Los productos de PCR fueron revelados en geles de agarosa 2% con bromuro de etidio, y marcador de peso molecular de 100 pb (100 bp ladder, Invitrogen).

3.6.4.2 Detección de la del30 en la región C-ter del gen *LMP1*

Para la detección de del30 se realizaron dos abordajes. El primero consistió en una reacción de PCR en una etapa, con 50 µl de volumen final, 2,5 mM de MgCl₂, 1U de la enzima *Taq* DNA polimerasa Platinum (Invitrogen), 0,5 µM de los *primers* LMP1-30S y LMP1-30AS (Tabla A2- Anexo I). El perfil térmico consistió de 35 ciclos de 93°C por 60 segundos; 63°C por 60 segundos y 72°C por 2 minutos, mientras que la segunda etapa se realizó en 25 ciclos de 93°C por 60 segundos, 60°C por 50 segundos y 72°C por 90 segundos (Zhou et al., 1994)

Un segundo método fue puesto a punto para resolver resultados negativos en el primer abordaje. Consistió en una reacción de PCR “semi-nested”, donde se utilizaron en la primera etapa los mismos *primers* empleados para la amplificación de la región C-ter completa, y la segunda etapa incluyó el *primer* “anti-sentido” de esta primera etapa

(LMP1-AS) y el *primer* “sentido” LMP1-2S (de posición más externa que el primer LMP1-S) (Guidoboni et al., 2005). La segunda etapa fue optimizada para reacciones de 50 µl, con 2,5 mM de MgCl₂, coadyuvante Triton X-100 0,01%, 0,2 µM de los *primers* específicos y 1,5 U de la enzima *Taq* DNA polimerasa Platinum (Invitrogen) (Tabla A2- Anexo I). El perfil térmico fue el mismo que para la amplificación de la región C-ter (sección 3.6.4.1).

Los productos de PCR para ambas metodologías fueron revelados en geles de poliacrilamida 12%, con electroforesis de temperatura controlada (15°C) a 600V en un aparato GenePhor (Amersham), con marcador de peso molecular de 50 pb (50 bp ladder, Invitrogen).

3.6.4.3 Amplificación de la región repetitiva de 33 pb de la región C-ter del gen *LMP1*

Las reacciones de PCR fueron realizadas con los *primers* específicos LMP33-S y LMP33-AS que flanquean la región de repeticiones de 33 pb en tándem, en el exón 3 del gen *LMP1* (Khanim et al., 1996) (Tabla A2- Anexo I). Las reacciones fueron optimizadas para 50 µl de volumen final, 2,5 mM de MgCl₂, Triton X-100 0,01%, 0,4 µM de cada *primers*, 1 U de *Taq* DNA polimerasa Platinum (Invitrogen). El perfil térmico consistió de 38 ciclos de 94°C por 45 segundos; 52°C por 45 segundos y 72°C por 90 segundos. Los productos de PCR fueron revelados en geles de agarosa 3% con bromuro de etidio, con marcador de peso molecular de 50 pb (50 bp ladder Invitrogen).

3.6.4.4 Amplificación de la región promotora

Un segmento del promotor (-217 a +1) fue amplificado por PCR con *primers* específicos, en reacciones de 50 µl de volumen final, 2,5 mM de MgSO₄, solución “*Enhancer*” para segmentos ricos en GC (Invitrogen), 0,6 µM de los *primers* PRO1 Y PRO2, 2 U de la enzima *Taq* Polymerase High Fidelity Platinum® (Invitrogen) (ver Tabla A2 – Anexo I) y Figura 3.2). El perfil térmico incluyó una estrategia “*touch-down*”, que consistió en 5 ciclos de 94°C por 90 segundos, 65°C por 45 segundos y 68°C por 45 segundos; seguidos por 20 ciclos de 94°C por 90 segundos, 60°C por 45 segundos y 68°C por 45 segundos; seguidos por 10 ciclos de 94°C por 60 segundos, 57°C por 45 segundos y 68°C por 45 segundos.

Los productos de PCR fueron evaluados en geles de agarosa 2%, marcador de peso molecular de 100 pb, aislados y posteriormente secuenciados directamente.

3.6.4.5 Análisis del sitio de restricción *XhoI* en el exón 1 por RFLP-PCR

El método RFLP-PCR fue diseñado para determinar la retención o pérdida de un sitio natural de restricción reconocido por la enzima *XhoI*. Este sitio (CTCGAG) está ubicado en las posiciones 168428-168423 (número de acceso V01555) en el exón 1 del gen *LMP1*.

Una vez amplificado el segmento conteniendo la secuencia de interés (segmento del promotor, sección 3.6.4.4), el producto de PCR (6 µl) fue digerido con 10 U de la enzima *XhoI* (Invitrogen), diluida en el tampón React 2™, por 16 hs a 37°C. El resultado fue evaluado en geles de agarosa 3%. El análisis de la pérdida o retención del sitio de restricción se basó en el tamaño de los fragmentos resultantes de la digestión (Retención

del sitio *XhoI*: fragmentos digeridos de 305 pb y 48 pb; pérdida del sitio *XhoI*: fragmento no digerido de 353 pb) (Tabla A2- Anexo I).

3.7 Estudio por RT-PCR de la expresión de los genes *EBER1* y *LMP1*

3.7.1 Retrotranscripción

Las reacciones de retrotranscripción fueron realizadas a partir de 1-2 µg de ARN total en volúmenes de reacción de 30 µl. En primer lugar fue realizada una mezcla del ARN con iniciadores hexaméricos randómicos (Randon Hexamer Primers, Invitrogen), a la concentración de 5 µM, en un volumen de reacción de 12 µl, y se procedió a una incubación por 10 minutos a 65°C.

Posteriormente se realizó una mezcla conteniendo tampón (concentración final 5 mM KCl; 1 mM Tris H-Cl pH 8,3), 5 mM de MgCl₂, 10 mM de Di-tio-treitol (DTT), 1 mM de cada uno de los dNTPs y H₂O-DEPC hasta completar el volumen. Se adicionó 16 µl de esta mezcla a la mezcla inicial de ARN y *primers* randómicos y se incubó por 5 minutos a 42°C. Después de la adición de 1 µl de la enzima transcriptasa reversa Superscript II® (Invitrogen) (200U/µl) y 1 µl del inhibidor de ARNasa RNAGuard (Invitrogen) (1 U/µl) se realizó una incubación por 40 minutos a 42°C. Al término de la retrotranscripción, los tubos fueron colocados a 65°C por 5 minutos, para desactivar la enzima. El ADNc fue utilizado como sustrato de reacciones de PCR específicas.

3.7.2 Expresión de los genes *GAPDH*, *EBER1* y *LMP1* por RT-PCR

La amplificación de transcriptos del gen constitutivo *GAPDH* se utilizó como control endógeno del ARNm celular. La amplificación de los transcriptos *EBER1* y *LMP1* se

utilizó como confirmación de la infección por el EBV y como evidencia de la integridad y amplificabilidad del ARN viral, utilizando *primers* exónicos específicos previamente publicados (Tao et al., 1998) Las reacciones fueron optimizadas para 50 µl de volumen final, 2,5 mM de MgCl₂, Triton X-100 0,01%, 0,4 µM de cada *primer*, 1U de *Taq* DNA polimerasa Platinum (Invitrogen). El perfil térmico consistió de 38 ciclos de 94°C por 45 segundos; 52°C por 45 segundos y 72°C por 90 segundos. Los productos de PCR fueron revelados en geles de agarosa 3% con bromuro de etidio, con marcador de peso molecular de 100 pb (100 bp ladder Invitrogen).

3.8 Procedimientos post-PCR

3.8.1 Visualización de los productos de PCR

3.8.1.1 Geles de agarosa

Los productos de amplificación obtenidos por las distintas reacciones de PCR fueron evaluados en geles de agarosa 0,8 - 3%, con concentraciones adecuadas al tamaño de los fragmentos amplificados. Los geles fueron preparados con tampón TAE conteniendo 0,5 µg/ml de bromuro de etidio. Para la aplicación de los productos fue utilizado un tampón de carga constituido por una solución acuosa 0,25% p/v de azul de bromofenol (Sigma), 0,25% p/v de xileno-cianol FF (Sigma) y 30% v/v de glicerol (Merck). Los geles fueron sometidos a electroforesis a 80 V por aproximadamente 45 minutos en cubas de electroforesis tipo Horizon 20,25 (20 cm x 25 cm) con fuente de corriente continua Life Tech Model 250 (Gibco).

3.8.1.2 Geles de poliacrilamida

Para la evaluación de productos de PCR con tamaños menores a 200 pb o para discriminación alélica basada en tamaño, fueron utilizados geles de poliacrilamida 8% no desnaturalizantes, preparados con una solución de acrilamida:bisacrilamida (29:1) (Gibco), persulfato de amonio (PSA) (Gibco) 0,001% (v/v) y TEMED (N,N,N',N'-tetrametilenodiamina) (Gibco) 0,067% (v/v), en tampón Tris-EDTA-Acetato (TAE). La mezcla de poliacrilamida fue cuidadosamente transferida a dispositivos constituidos por dos placas de vidrio 20 cm x 16 cm, espaciadores y un peine para modelar los sitios de aplicación. Se utilizaron dispositivos de electroforesis vertical, modelo V16 con fuente de corriente continua Lifetech Model 250 (Gibco, Life Technologies Inc.), con tiempos y voltajes de corrida específicos para cada fragmento.

Después de la electroforesis los geles fueron fijados por 10 minutos en una solución acuosa conteniendo 10% v/v metanol (Merck) y 0,5% v/v ácido acético glacial (Merck). Luego fueron sumergidos por 10 minutos en una solución acuosa conteniendo 3% v/v metanol, 0,15% v/v ácido acético glacial y 0,7% p/v de nitrato de plata (Vetec). Los productos fueron finalmente revelados hasta la aparición nítida de las bandas con solución acuosa de 30% v/v NaOH (Vetec) 0,3% v/v formaldehído (Merck), fijados por segunda vez y montados para el análisis y obtención de imágenes.

3.8.2 Purificación de bandas

Los fragmentos de ADN amplificados fueron aislados a partir de geles de agarosa 1,5 % y purificados mediante el sistema GFX™ PCR and gel Band Purification (Amersham Biotech) según recomendaciones del fabricante. Los productos purificados fueron

evaluados cualitativa y cuantitativamente por electroforesis utilizando como patrón el marcador de masa “Low mass ladder” (Invitrogen). Los productos purificados fueron sometidos a secuenciación directa o, alternativamente, en casos seleccionados, a secuenciación luego de subclonaje en plásmidos específicos.

3.8.3 Subclonado en plásmidos pCR®4-TOPO

En los casos en que una secuencia nítida no pudo ser observada por secuenciación directa, los productos de PCR fueron sub-clonados con el sistema Zero Blunt® TOPO® PCR Cloning (Invitrogen). La ligación de fragmentos fue realizada adicionando 2-4 µl de producto de PCR debidamente purificado y 1 µl del vector pCR®4-TOPO, seguido de una incubación durante 20 minutos a TA. Luego se adicionó 5 µl de cada reacción de ligación a una alícuota de células *E. coli* TOP10F' (Invitrogen) competentes químicamente.

La transformación bacteriana se realizó incubando las células en un baño térmico a 42°C por 30 segundos exactos, seguido de una posterior incubación durante 2 minutos en hielo. Después de adicionar 250 µl de medio SOC a cada vial de células, se realizó una incubación a 37°C durante 1 hora en agitación orbital a 200 rpm. Posteriormente, en condiciones de esterilidad, las bacterias fueron expandidas en placas de Petri conteniendo medio de cultivo LB-agar con 50 µg/ml de kanamicina. Un control positivo fue realizado utilizando 10 pg de ADN del vector pUC19 en placas de LB-agar con 50 µg/ml de ampicilina. A cada placa fue agregado 5-bromo-4-cloro-3-indolil b-D-galactopiranosido (X-gal) a una concentración de 40 µg/ml. La incubación fue realizada por 16 hs a 37°C. Posteriormente se realizó la expansión de las colonias de interés en 1 ml de LB líquido

con antibiótico, en placas de cultivo de 96 pocillos. La placa fue incubada a 37°C con agitación orbital a 200 rpm durante 22 horas.

3.8.3.1 Aislamiento del ADN del plásmido por miniprecipitación y lisis alcalina

La microplaca fue centrifugada a 4000 rpm por 6 minutos, se descartó el sobrenadante y se adicionó 240 µl de solución P1 (ver lista de soluciones y reactivos, viii) en cada pozo. La placa fue nuevamente centrifugada por 10 minutos, se descartó el sobrenadante, se adicionó 80 µl de la solución P2 (ver lista de soluciones y reactivos, viii) y se incubó por 10 minutos a TA, seguido por la adición de 80 µl de la solución P3 (ver lista de soluciones y reactivos, viii). La placa fue incubada en estufa a 90°C durante 30 minutos exactos y fue centrifugada a 4000 rpm por 10 minutos a 4°C. El sobrenadante fue filtrado en placa Millipore MAGV N22 con diámetro de poro de 0,45µ, seguido de centrifugación a 4000 rpm por 10 minutos a 4°C.

La precipitación del plásmido se realizó con isopropanol (Merck) a 4°C, seguido de centrifugación a 4000 rpm por 45 minutos. Luego de descartar el sobrenadante, se adicionó 200 µl de etanol 70% (Merck) a 4°C y se centrifugó durante 5 minutos. La placa se dejó secar a TA y luego el ADN plasmidial fue solubilizado en 40 µl de agua MilliQ estéril por 16 hs a TA. La placa conteniendo el ADN purificado fue mantenida a -20°C.

3.8.3.2 Identificación de los clones de interés

Con el objetivo de identificar los clones portadores del fragmento de interés fue realizada una digestión con la enzima de restricción *EcoRI*, que reconoce la secuencia palindrómica 5'-G/AATTC-3', utilizando 2 µl de ADN plasmidial, 10 U de la enzima y tampón NEBuffer *EcoRI* (Biolabs). La mezcla fue incubada a 37°C por de 3 horas. El producto

de digestión fue analizado mediante electroforesis en un gel de agarosa 1,5%. Los clones portando el inserto de interés fueron seleccionados y estocados a -20°C hasta su posterior secuenciación.

3.8.4 Secuenciación

La secuenciación se realizó por el método cíclico DYEnamic™ ET Dye Terminator Cycle Sequencing kit (Amersham), con química basada en la marcación fluorescente de los terminadores (ddNTPs) (“dye terminator labelling”). En reacciones de volumen final de 10 μl en placas de 96 pocillos, conteniendo una concentración final de ADN de 60-90 ng/ μl , se adicionó 1 μl del primer específico (2 pmol/ μl) y 4 μl de la mezcla ya preparada conteniendo el tampón de secuenciación, la enzima Thermo Sequenase™ II DNA polymerase, los dNTPs y los ddNTPs marcados fluorescentemente. Como sustrato de la reacción, fue utilizado ADN producido en las reacciones de PCR (secuenciación directa) o, alternativamente, ADN sub-clonado en plásmidos, previamente purificado. El perfil de la reacción de secuenciación consistió en 30 ciclos de 95°C por 20 segundos, 50°C por 15 segundos y 60°C por 1 minuto.

Para la secuenciación directa, los *primers* utilizados fueron los mismos de la reacción original de PCR (concentración final 0,2 μM), mientras que para la secuenciación de productos subclonados, se utilizaron los *primers* específicos M13F y M13R (0,2 μM) para secuencias del plásmido. La precipitación y eliminación de los colorantes fluorescentes fue realizada por la adición de 27,5 μL (2,5 volúmenes) de etanol absoluto (Merck), se agitó por 5 segundos y se incubó por 20 minutos en baño de hielo; luego se realizó una centrifugación a máxima velocidad por 30 minutos a 4°C . El sobrenadante fue

descartado totalmente y se adicionó 150 ml de etanol 70% a 4°C. Se centrifugó a máxima velocidad por 10 minutos a 4°C y nuevamente el sobrenadante fue descartado. Posteriormente la placa se dejó secar por 20 minutos a TA.

El producto precipitado fue resuspendido en 10 µl de tampón (EDTA 1mM pH 8,0, formamida 70%), sometido a agitación mecánica (vórtex) y transferido inmediatamente a hielo. La electroforesis fue realizada en un secuenciador automático capilar MegaBace™1000 Sequence System (Amersham Biosciences) de corriente continua de 30V (40 amp) por 3 horas. El programa “Sequence DNA Analysis System MegaBace1000” fue usado para coleccionar los datos y el programa ‘Sequence Navigator’, fue utilizado para el análisis preliminar de las secuencias.

3.8.5 Análisis de secuencias

Las secuencias fueron analizadas utilizando el algoritmo Blast (Blastn; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) y comparadas con secuencias compiladas en una base de datos propia, utilizando los programas de análisis de secuencias MacVector 7.2.3 (Accelrys Inc.) y BioEdit version 7.0.5.1 (Hall, 1999). La identificación de los diferentes segmentos génicos: promotor y región C-ter, fueron identificados según los criterios de (Sandvej, Gratama, and Munch, 1997) (Walling, Shebib, and Weaver, 1999). Las secuencias del gen *LMPI* fueron comparadas y analizadas de acuerdo al prototipo B95.8 (Número de Acceso GenBank V05555) y a los grupos europeos A-D y del sudeste asiático (Sandvej, Gratama, and Munch, 1997).

3.9 Análisis filogenético

Para determinar las relaciones filogenéticas entre las secuencias de las regiones estudiadas, las secuencias fueron alineadas utilizando el comando de alineamientos múltiples del programa Clustal W, las matrices de distancia fueron calculadas usando el modelo de 2 parámetros (Kimura) y los árboles filogenéticos fueron inferidos a partir de las distancias calculadas, por el método de “Neighbor joining” utilizando el programa Mega 3.1 (<http://www.megasoftware.net/>). Los análisis incluyeron el prototipo B95.8, los grupos europeos A-D, las variantes CAO (Fielding et al., 2001) CG1 y CG2 (Zhou et al., 2001), así como Raji (linfoma de Burkitt africano y CEMO-3 (linfoma de Burkitt de Brasil) (Stefanoff et al., 2003).

3.10 Análisis estadístico

La existencia de asociación entre variables categóricas fue realizada utilizando el test de χ^2 o el test exacto de Fisher, de acuerdo al tamaño de las muestras. Las comparaciones de distribución entre variables continuas se realizaron a través de métodos no paramétricos. Todos los ensayos fueron de dos colas y un valor de $p < 0,05$ fue indicativo de significación estadística. Para estos análisis se utilizó el programa SPSS versión 10.0 (SPSS Inc., EUA).

4. RESULTADOS

4.1 Caracterización de los grupos de pacientes estudiados

En este estudio fueron incluidos 71 pacientes con diagnóstico de LH. De estos, 12 fueron pacientes pediátricos (rango de edad: 4-15 años; mediana, 11,5 años) y 59 adultos (rango de edad: 17-82 años; mediana, 32 años). En la tabla A3 (Anexo I), son descriptas las características generales del grupo de estudio incluyendo los casos EBV+ y EBV-.

La distribución de edades al diagnóstico de los LH fue agrupada en clases de 5 años para fines descriptivos y en cinco grandes grupos de edad (<10, 11-15, 16-39, 40-54 y >55 años) consistentes con los patrones de incidencia del LH descriptos en la literatura (Flavell and Murray, 2000) (Glaser et al., 1997).

La distribución etaria, así como la variación de la proporción de sexos por clases de edad, son mostradas en la tabla 4.1 y en la figura 3.1. En el grupo estudiado, fueron más frecuentes los adultos jóvenes (16-39 años, 54,9%), siendo que los niños representaron 16,9% de los casos y los adultos de más edad, el 28,2%. La clase de edad de 21 a 25 años fue la mas frecuente, siendo que el 50% de la población de estudio se encontró en el rango de 4 a 30 años. La proporción de sexos (Masculino: Femenino) del grupo de niños con LH fue de 3:1 (9M:3F) y la de adultos, 1,46:1 (35M:24F). A pesar de detectarse una mayor frecuencia de afectados masculinos, tanto entre los niños (75%) como en los adultos (59%), esta asociación no fue estadísticamente significativa (Test de Fisher, $p = 0.35$), ni fue demostrada una asociación preferencial entre clases de edades y sexo (χ^2 : 3,96, gl: 4, $p = 0,4$).

Tabla 4.1: Distribución de edades y variación de la proporción de sexos por clases de edad en los linfomas de Hodgkin estudiados.

Clases de edad (años)	N	Frecuencia acumulada (%)	Frecuencia relativa (%)	M:F (SR)
<10	4	5,6	5,6	4:0
11a15	8	16,9	11,3	5:3 (1,66)
16-39	39	71,8	54,9	25:14 (1,78)
40-54	9	84,5	12,7	5:4 (1,25)
>55	11	100	15,5	5:6 (0,83)

(M:F) número de individuos de sexo masculino y femenino. SR: proporción de sexos

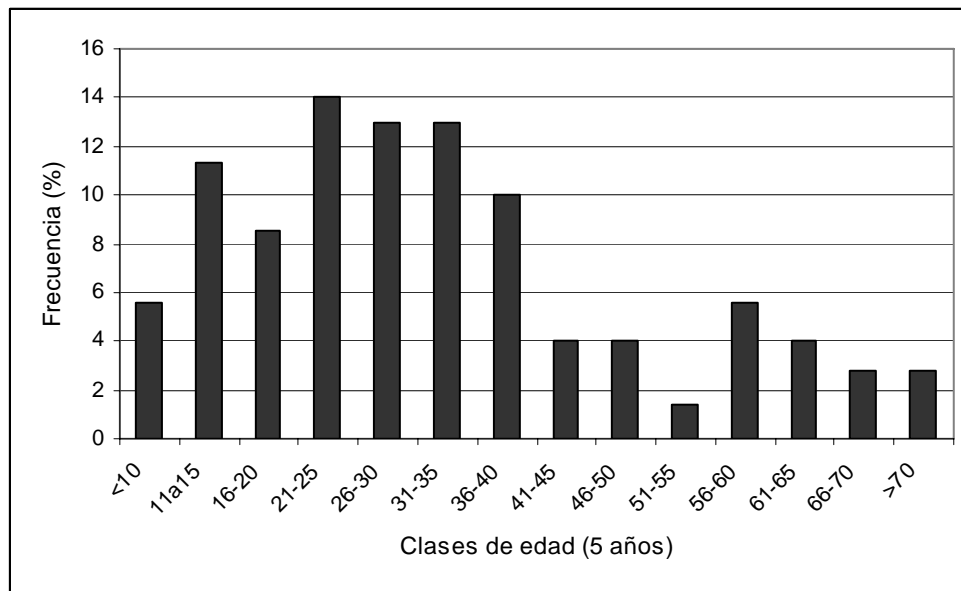


Figura 4.1: Distribución de frecuencias de las diferentes clases de edad (5 años) en los pacientes con linfoma de Hodgkin.

En relación a los casos de HR, 11 fueron niños (rango de edad: 3-15 años, mediana: 12 años) y 29 adultos (rango de edad: 17-83 años, mediana: 37 años). La tabla A4 (Anexo I), describe las características generales de los pacientes con hiperplasia reactiva EBV+ y EBV- incluidos en este estudio. La distribución etaria y la proporción de sexos por clases de edad es mostrada en la tabla 4.2. Los niños representaron el 27,5% de los casos

estudiados. La proporción de sexos (M:F) en el grupo de niños con HR fue de 4,5:1 (9M:2F) y la de adultos 1,2:1 (16M:13F).

Tabla 4.2: Rango de edades y variación de la proporción de sexos por clases de edad en las hiperplasias reactivas estudiadas

Clases de edad (años)	N	Frecuencia acumulada (%)	Frecuencia relativa (%)	M:F (SR)
<10	4	10	10	3:1 (3)
11-15	7	27,5	17,5	6:1 (6)
16-39	16	67,5	40	8:8 (1)
40-54	8	87,5	35	4:4 (1)
>55	5	100	12,5	4:1 (4)

(M:F), número de los individuos de sexo masculino y femenino. SR: proporción de sexos.

4.2 Clasificación histopatológica

La clasificación se realizó según criterios morfológicos e inmunohistoquímicos de la OMS (Jaffe et al., 2001). De los 71 casos con linfoma de Hodgkin, 68 (95,8%) correspondieron al LH clásico, representado por los subtipos histológicos EN (65%), CM (22,5%) y DL (2,5%). El subtipo RL no fue identificado en los casos estudiados. Solo 3 pacientes adultos (4,2%) presentaron el subtipo PLN, considerado como una entidad diferente desde 1980, debido a los tipos y proporciones relativas de células reactivas en el entorno tumoral, la presencia de fibrosis y la detección de varias morfologías en las células H-RS.

El subtipo EN fue el más frecuentemente encontrado tanto en niños (58%) como en adultos (66%). La distribución de subtipos histológicos estuvo significativamente influenciada por la edad al diagnóstico (Test de Fisher, $p = 0,03$), observándose una mayor frecuencia de CM en los niños y en los adultos mayores de 55 años, a la vez que

una prevalencia de EN en los adultos jóvenes, en relación a los valores esperados (Tabla 4.3).

Tabla 4.3: Frecuencia de los subtipos histológicos en los niños y adultos con LH

Clases de edad (años)	Subtipos histológicos					
	N	EN (%)	CM (%)	DL (%)	PLN (%)	NC (%)
0 a 15	12	7 (58)	5 (42)	-	-	-
16-39	39	29 (74)	5 (13)	2 (5)	2 (5)	1 (3)
40-54	9	6 (67)	1 (11)	-	1 (11)	1 (11)
> a 55	11	4 (37)	5 (45)	-	-	2 (18)
Total adultos	59	39 (66)	11 (19)	2 (3)	3 (5)	4 (7)
Total general	71	46 (65)	16 (22,5)	2 (2,5)	3 (4)	4 (6)

N: número de casos, EN: esclerosis nodular, CM: celularidad mixta, DL: depleción linfocítica, PLN: predominio linfocítico nodular, NC: no clasificado.

4.3 Detección del virus Epstein-Barr

4.3.1 Métodos de PCR

En el transcurso de este trabajo se pusieron a punto dos técnicas de PCR desarrolladas para la detección del EBV, utilizando *primers* específicos para el gen *EBER1* y el fragmento BamHW, mediante reacciones de PCR de una etapa. Los dos métodos de PCR presentaron sensibilidades diferentes, siendo el dirigido a la amplificación del segmento BamHW el más sensible, debido a que el fragmento amplificado incluye una región repetitiva. Las técnicas permitieron obtener y confirmar los resultados en simultáneo, minimizando los riesgos de contaminación cruzada, tanto en las muestras con ADN de alto peso molecular como en las FIP. Resultados de estas reacciones de PCR son mostradas en la figura 4.2.

El EBV fue detectado por PCR en 36/71 LH (51%), en un caso de LH con EBV en los linfocitos reactivos pero no en las células tumorales (L29), en 8/40 HR (20%) y en 2/15 muestras de epitelio orofaríngeo de individuos (portadores sanos (PS), 13,3%).

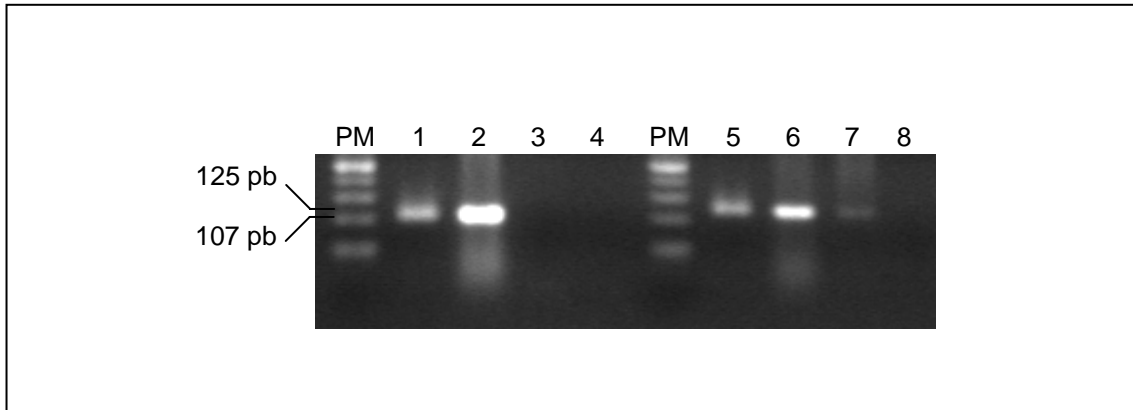


Figura 4.2: Detección del virus Epstein-Barr por PCR para los genes *EBER1* y BamHW. Calles 1-4: PCR EBER; 1: paciente con LH EBV+ (107 pb); 2: control positivo para el gen *EBER1* (línea celular BC2); 3: paciente HR18 que resultó negativo en esta técnica; 4: control negativo (ADN de donador no infectado). Calles 5 – 8: PCR BamHW; 5: paciente con LH-EBV+ (125 pb); 6: control positivo para el fragmento BamHW (línea celular BC2); 7: paciente HR18 con resultado positivo por esta técnica; 8: control de PCR (agua). PM: Marcador de peso molecular 50 pb. Agarosa 2%.

4.3.2 Hibridización in situ e inmunohistoquímica

Las muestras de LH en que el genoma del EBV pudo ser detectado por PCRs específicas para el gen *EBER1* y el fragmento BamHW, fueron posteriormente sometidas a las técnicas de ISH e IHQ para confirmar la expresión de los ARNs virales EBERs y la proteína LMP1, respectivamente, en las células H-RS. Diez casos en que los resultados de PCR fueron negativos para la detección del genoma viral, fueron también analizados por la técnica de ISH para EBER, para determinar la especificidad del método de PCR y descartar falsos negativos. La detección del EBV por los diferentes métodos empleados, en 46 casos analizados, mostró coincidencia, con excepción del caso L29 (Tabla 4.6). En

este caso el EBV fue detectado en linfocitos reactivos del microambiente tumoral pero no en las células tumorales. Por este motivo este caso fue incluido en el grupo de los CNN.

En el grupo de CNN, la detección del EBV por los métodos de PCR descriptos fue considerada evidencia de infección viral, dado que este trabajo no tuvo el objetivo de analizar los tipos celulares infectados por el EBV en los procesos no neoplásicos.

En la figura 4.3 se muestra un caso de LH EBV+ en que la expresión de los ARNs virales EBERs es demostrada en los núcleos de las células H-RS mediante la técnica de ISH.

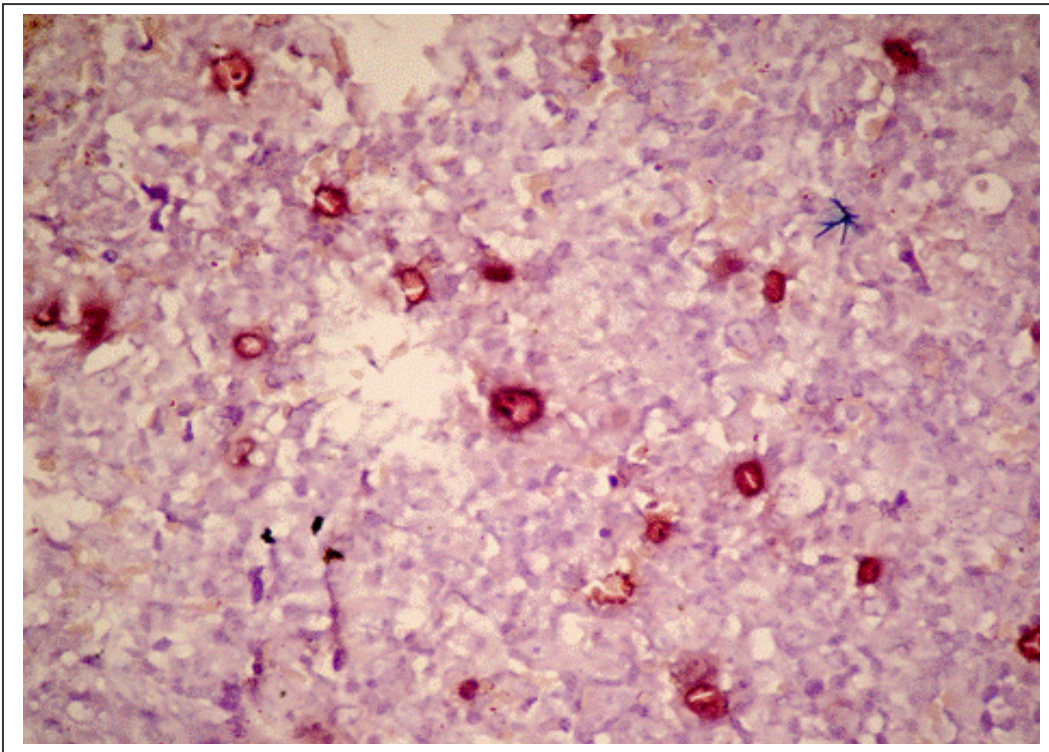


Figura 4.3: Detección de la expresión de los transcritos virales EBERs en el núcleo de las células H-RS en un linfoma de Hodgkin del subtipo esclerosis nodular, mediante la técnica de hibridación in-situ.

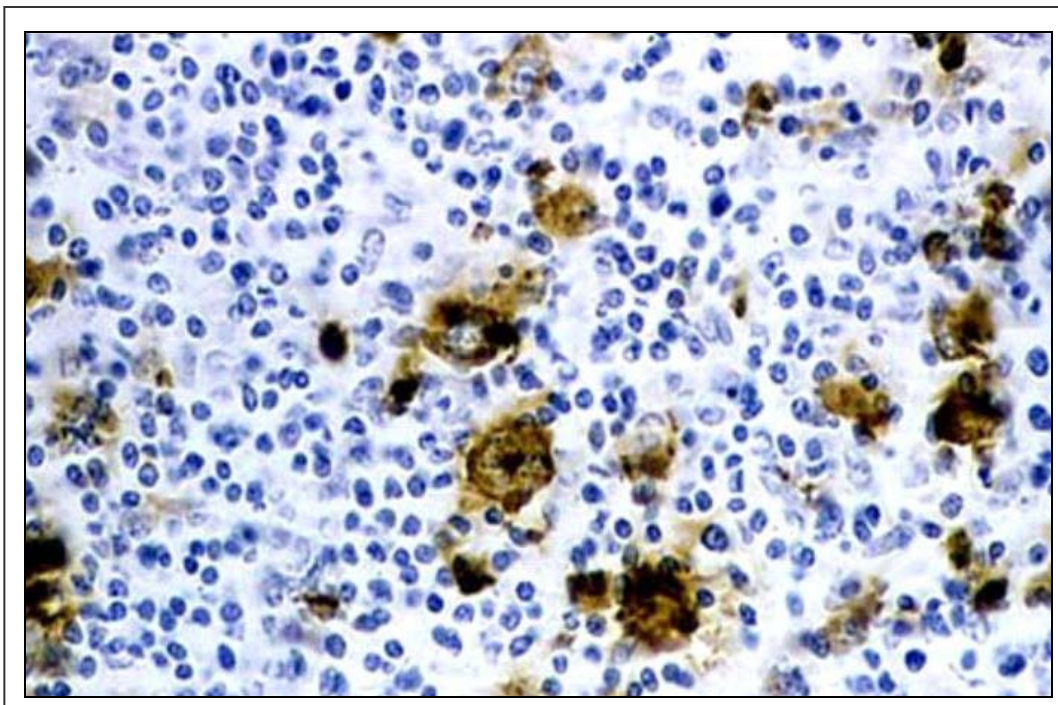


Figura 4.4: Detección de la expresión de la proteína LMP1 en la membrana plasmática de las células H-RS en un linfoma de Hodgkin mediante la técnica de inmunohistoquímica

En la figura 4.4 se muestra un caso de LH EBV+ en que la expresión de la proteína LMP1 es demostrada en las membranas plasmáticas y citoplasma de las células H-RS mediante la técnica de IHQ.

4.3.3 Detección de la expresión de *LMP1* por RT-PCR

En 12 casos EBV+ con material adecuado, la presencia de ARNm del gen LMP1 fue determinado por reacciones de PCR específicas previa retrotranscripción de ARN total (Figura 4.5). Todos los casos mostraron expresión de LMP1, en niveles coincidentes a la expresión de los ARNs EBERS, utilizados como controles virales endógenos, con alta expresión en células infectadas latentemente con EBV. De esta manera, fue posible verificar que todos los casos tumorales estudiados expresaron niveles detectables de LMP1.

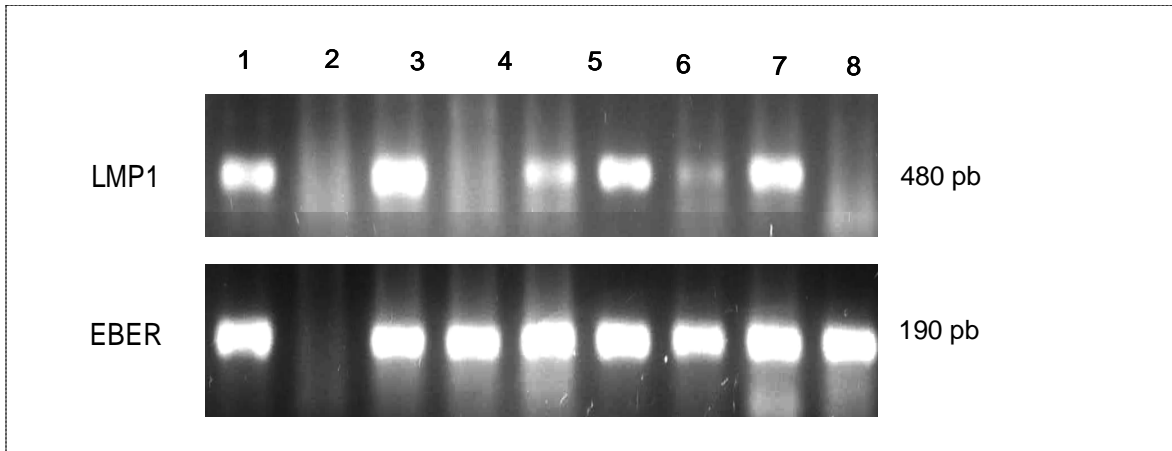


Figura 4.5: Detección de la expresión del ARNm de LMP1 y EBER por RT-PCR. 1: Control positivo línea celular Raji; 2: Control EBV negativo, línea celular Ramos; 3,5-8: Casos de linfoma de Hodgkin EBV+, LMP1+ (latencia II); 4: Control de especificidad, caso de linfoma de Burkitt EBV+ LMP1 negativo (latencia I). Agarosa 2%.

4.4 Tipificación viral

En todas las muestras de LH y CNN con infección previamente confirmada, se realizó la tipificación viral por PCR-nested mediante el análisis del gen *EBNA2* (Figura 4.6).

El EBV-1 fue el tipo más frecuente, tanto en las muestras de linfomas como en los procesos no neoplásicos asociados al EBV. De los 35 LH (EBV/ISH+), 30 presentaron el EBV-1 (86%), 4 el EBV-2 (11%) y 1/35 LH EBV+ (3%) fue coinfectado por ambas cepas virales (tipos 1 y 2). De los 11 CNN, el caso L29, al igual que las 2 muestras de epitelio orofaríngeo de PS y 6 HR fueron EBV-1 (9/11, 81,8%) y sólo una muestra HR fue del tipo EBV-2 (1/11, 9,1%). Dentro del grupo de CNN, 1/11 (9,1%) presentó coinfección por los tipos EBV-1 y EBV-2. Este último caso (HR13) fue asociado al HIV y presentó infección con el virus de la Hepatitis C y el Herpesvirus humano tipo 8 (datos no mostrados).

Cuando comparados las neoplasias y los casos no malignos, no se observó asociación estadísticamente significativa entre condición patológica y tipo viral (Test de Fisher, $p = 0,76$).

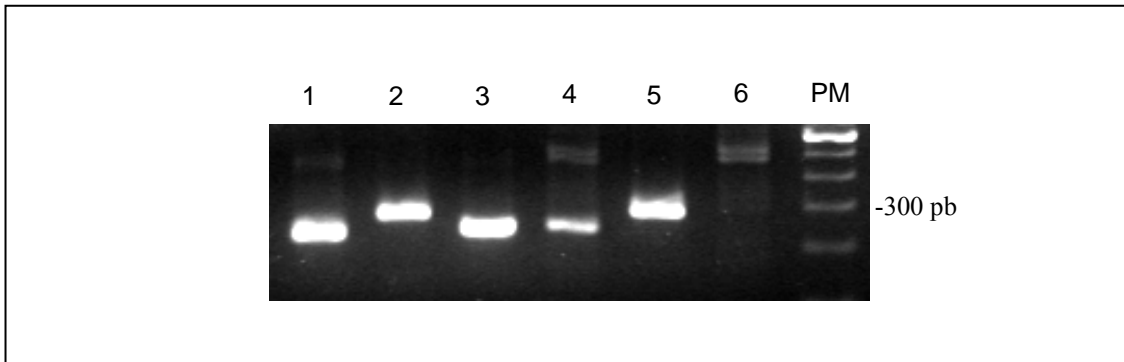


Figura 4.6: Tipificación del EBV por PCR para el gen *EBNA2*. 1 y 3: pacientes con EBV tipo 1 (250 pb); 2: paciente con EBV tipo 2 (300 pb); 4: control positivo para Tipo 1, línea celular BC2; control positivo para tipo 2, línea celular BC1; 6: control negativo (ADN de donador no infectado). PM: Marcador de peso molecular 100 pb. Agarosa 2%.

4.4.1 Características de los linfomas de Hodgkin asociados al EBV

El EBV mostró una tendencia a la asociación preferencial con clases de edades particulares, especialmente con edades menores de 10 años y mayores de 55 ($p = 0,086$).

La tabla 4.4 y la figura 4.7A muestran la frecuencia relativa de asociación con el EBV en los grupos etarios de importancia epidemiológica (Glaser et al., 1997).

Tabla 4.4: Proporción de pacientes EBV positivos y negativos por clases de edad en los linfomas de Hodgkin estudiados

Clases de edad (años)	N	EBV+ (%)	EBV- (%)
<10	4	4 (100)	0 (0)
11a15	8	3 (37,5)	5 (62,5)
16-39	38	15 (39,5)	23 (60,5)
40-54	9	5 (55,5)	4 (45,5)
>55	11	8 (72,7)	3 (27,3)

χ^2 : 8,57, gl: 4, $p = 0,073$

Un análisis más detallado de la asociación del LH con el EBV en los diferentes grupos de edad (Figura 4.7B) muestra que el virus presenta su asociación más alta en los niños menores de 10 años (100%, 4/4) y en los adultos más viejos. La asociación más baja fue observada en el grupo de 16 a 20 años (17%), seguido por un incremento abrupto a aproximadamente 50% en los jóvenes de 21 a 30 años. Desde los 50 años en adelante, parece haber un incremento gradual en la asociación con el EBV.

A modo de comparación, cabe mencionar que la asociación con el EBV en niños y adultos pertenecientes al grupo CNN fue de 9% (1/11) y 31,25% (10/32), respectivamente.

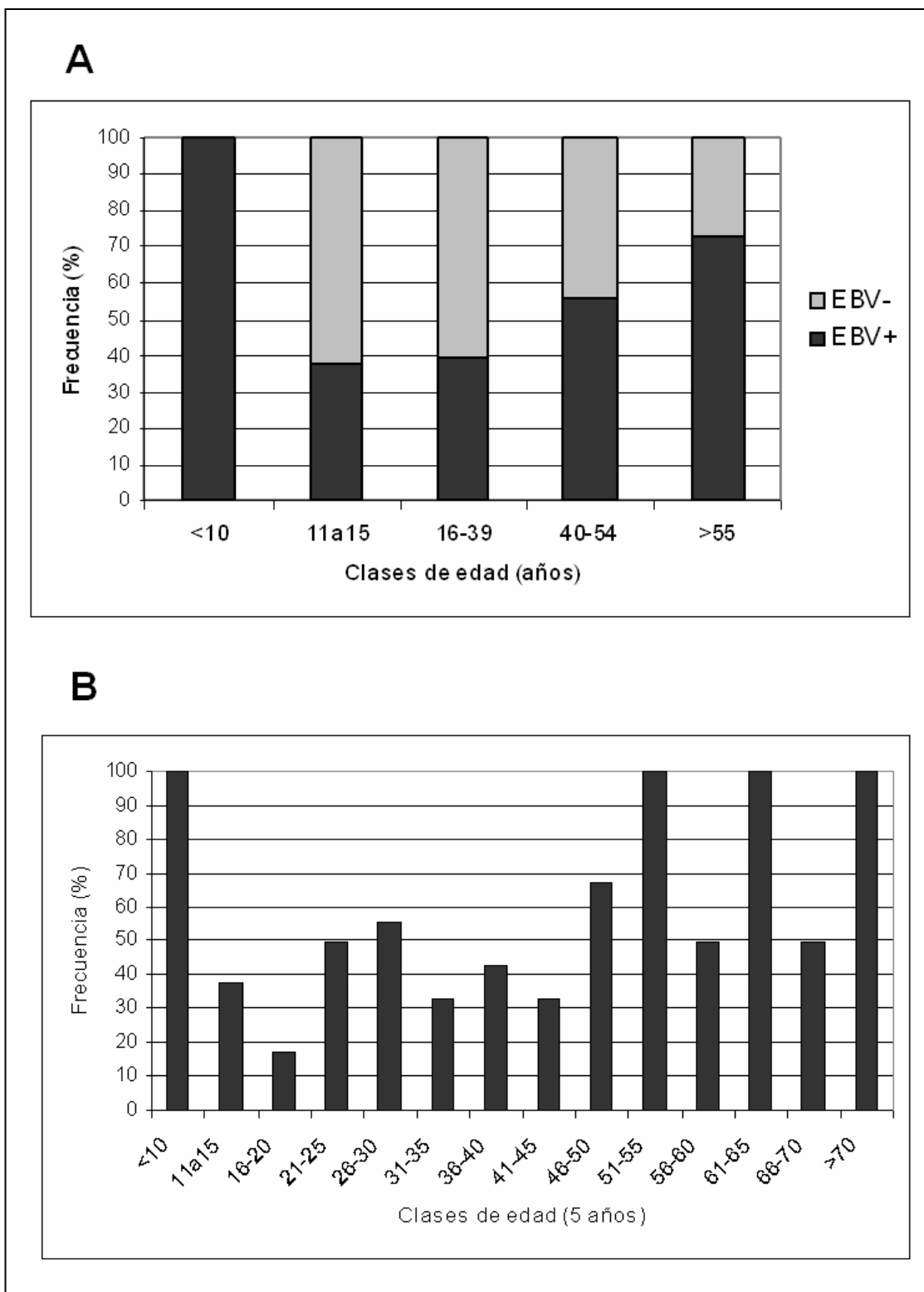


Figura 4.7: Asociación del EBV con los diferentes rangos etarios analizados en el linfoma de Hodgkin. **A.** Frecuencia de casos EBV+ y EBV- por grupos etarios epidemiológicos. **B.** Frecuencia de casos EBV+ en las clases de edades de 5 años.

Los pacientes con LH EBV+ presentaron un rango de edad de 4 a 82 años (mediana 31 años) y los LH-EBV negativos, un rango de 11 a 68 años (mediana 26 años). En el caso de los niños, fue observado un rango de edad de 4 a 14 (mediana 10 años) en los LH-EBV+ *versus* un rango de 11 a 15 años (mediana 14 años) en los LH-EBV negativos. Los adultos analizados por separado mostraron un rango de edad de 19 a 82 años (mediana 38 años) en los casos EBV+ y de 17 a 68 (mediana 31 años) en los EBV negativos.

Cuando se analizó la asociación preferencial del EBV con el sexo de los afectados, se observó una tendencia de asociación con el sexo masculino (26/44 LH EBV+ de sexo masculino vs. 9/26 de sexo femenino, χ^2 : 3; gl: 1; $p = 0,08$). De hecho, de los 35 casos de LH-EBV+, 26 (74,3%) pertenecían al sexo masculino y 9 (25,7%) al sexo femenino.

4.4.2 Subtipos histológicos en relación a la infección por EBV

Cuando analizada la infección por el EBV en relación a la clasificación histológica fue encontrado que el virus estuvo asociado solamente al LH clásico. Coincidente con la alta frecuencia de EN, de los 35 casos LH-EBV+, 22 fueron EN (63%) y 11 (31%), CM; el resto correspondiendo a otros subtipos.

Considerando la frecuencia por tipo histológico, el EBV fue más asociado al subtipo CM (11/16, 69%), pero, como mencionado, también fue detectado en una alta proporción de los casos EN (22/46, 48%) (Tabla 4.5).

En relación a las diferentes clases de edad, fue observada una tendencia a que el subtipo de CM esté más representado en niños y adultos >55 años EBV+, a la vez que menos representado en los adultos jóvenes, donde el subtipo EN fue prevalente (80% de los casos EBV+ en la clase de 16 a 39 años). La comparación no fue estadísticamente

significativa, probablemente debido al pequeño número de muestras (EN vs CM, gl 3, Test de Fisher, $p = 0,16$), sugiriendo, sin embargo, que la asociación del EBV con el subtipo histológico del LH está influenciado por la edad (Tabla 4.5 y Figura 4.8).

Tabla 4.5: Asociación del EBV con los subtipos histológicos de los linfomas de Hodgkin, de acuerdo a la edad.

Subtipos	EBV+ / Total (%)	Casos EBV+ por clase de edad (%)				
		<10 (%)	11-15 (%)	16-39 (%)	40-54 (%)	>55 (%)
LH EN	22/46 (48)	2 (50)	1 (33)	12 (80)	3 (60)	4 (50)
LH CM	11/16 (69)	2 (50)	2 (66)	2 (13)	1 (20)	4 (50)
LH DL	1/2	-	-	1 (6)	-	-
LH PLN	0/3	-	-	-	-	-
NC	1/4	-	-	-	1 (20)	-
Total	35/71 (49)	4	3	15	5	8

LH, linfoma de Hodgkin; EN, esclerosis nodular; CM, celularidad mixta; DL, depleción linfocítica; PLN, predominio linfocítico nodular; NC, no clasificado.

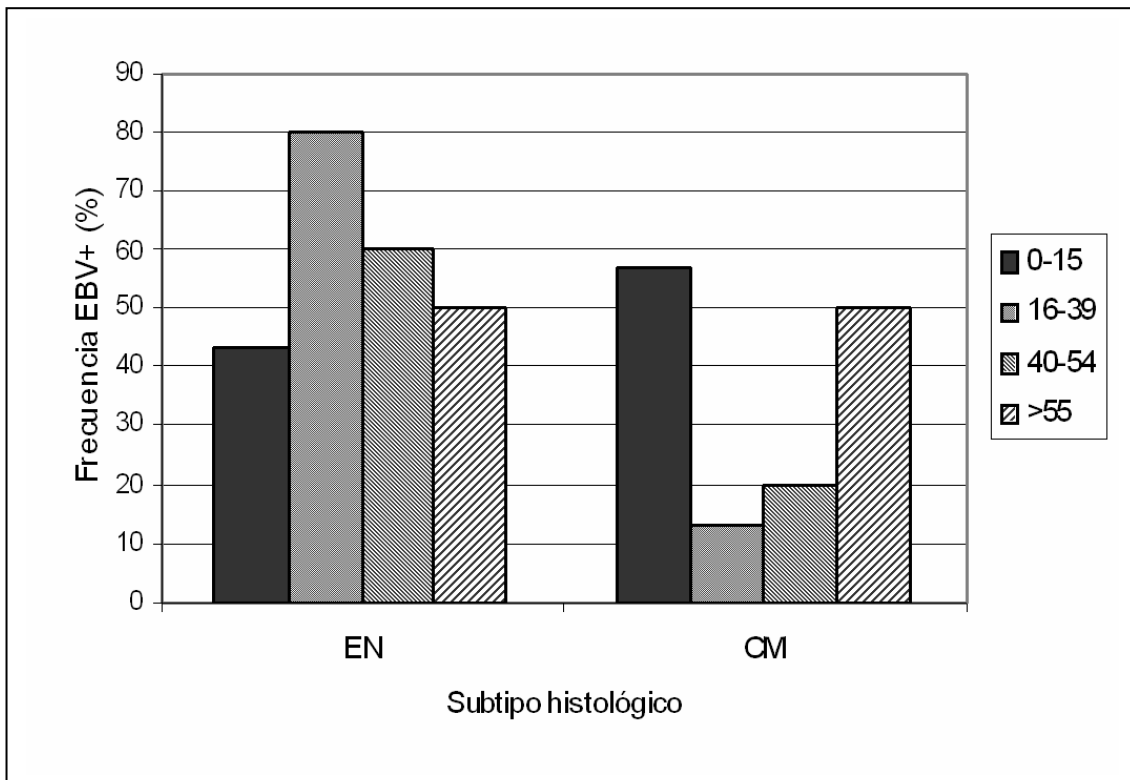


Figura 4.8: Frecuencia de los subtipos esclerosis nodular (EN) y celularidad mixta (CM) en los casos EBV+ por clase de edad.

4.5 Heterogeneidad molecular

En las tablas 4.6 y 4.7 son descritas las características clínicas y moleculares de los pacientes con linfoma de Hodgkin e hiperplasia reactiva asociados al virus EBV, respectivamente.

Tabla 4.6: Características clínicas y moleculares de los linfomas de Hodgkin asociados al virus Epstein-Barr.

Muestra	Sexo /Edad	Tipo Histológico	BamW/ Eber	Tipificación determinada por EBNA2	ISH	IHQ	Delección de 30 pb	Nº de repeticiones de 33 pb	Retención o pérdida del sitio <i>XhoI</i>
L1	M/10	LH C.M.	Pos	1	Pos	Pos	Wt	4	NA
L2	M/14	LH C.M.	Pos	1	Pos	Pos	Wt	4,5	R
L3	M/11	LH C.M.	Pos	1	Pos	Pos	Δ	5	R
L4	M/8	LH C.M.	Pos	1	Pos	Pos	Wt	4	R
L6	M/10	LH E.N.	Pos	1	Pos	Pos	Δ	5	R/ P
L7	M/12	LH E.N.	Pos	1	Pos	Pos	Wt	6,5	R
L8	M/4	LH E.N.	Pos	2	Pos	Pos	Wt	4,5	R
L13	M/67	LH E.N.	Pos	1	Pos	Pos	Δ	3	R
L14	M/27	LH E.N.	Pos	1	Pos	Pos	Δ	5,5	NA
L15	M/54	LH E.N.	Pos	1	Pos	Pos	Δ	5,5	NA
L16	M/59	LH E.N.	Pos	1	Pos	Pos	Δ	5,5	R
L17	M/37	LH E.N.	Pos	1	Pos	Pos	Wt	3	NA
L18	F/64	LH E.N.	Pos	1	Pos	Pos	Wt	4,5	R/P
L19	M/26	LH E.N.	Pos	1	Pos	Pos	Δ	5	NA
L20	F/23	LH E.N.	Pos	1	Pos	Pos	Wt	4	NA
L21	F/49	LH E.N.	Pos	1	Pos	Pos	Δ	5,5	R
L22	M/21	LH E.N.	Pos	1	Pos	Pos	Wt	4,5	R
L23	M/26	LH E.N.	Pos	1	Pos	Pos	Δ	5,5	R
L24	M/26	LH E.N.	Pos	1-2	Pos	Pos	Wt	4,5	R/P
L25	F/40	LH. E.N.	Pos	1	Pos	Pos	Δ	4	NA
L26	M/31	LH E.N.	Pos	1	Pos	Pos	Δ	7	R
L27	F/23	LH E.N.	Pos	1	Pos	Pos	Δ	4,5	NA

Tabla 4.6: Características clínicas y moleculares de los linfomas de Hodgkin asociados al virus Epstein-Barr (continuación)

Muestra	Sexo /Edad	Tipo Histológico	BamW/Eber	Tipificación determinada por EBNA2	ISH	IHQ	Delección de 30 pb	Nº de repeticiones de 33 pb	Retención o pérdida del sitio <i>XhoI</i>
L28	M/19	LH E.N.	Pos	1	Pos	Pos	Wt/Δ	5,5	SM
L29	F/24	LH E.N.	Pos	1	Pos*	Pos	Wt	4	NA
L30	M/39	LH E.N.	Pos	2	Pos	Pos	Δ	6,5	R/P
L31	M/31	LH E.N.	Pos	1	Pos	Pos	Wt	4	R/P
L32	F/59	LH E.N.	Pos	2	Pos	Pos	Δ	6,5	R/P
L52	F/79	LH C.M.	Pos	1	Pos	Pos	Δ	4	NA
L53	M/33	LH C.M.	Pos	1	Pos	Pos	Δ	4,5	R
L54	M/62	LH C.M.	Pos	1	Pos	Pos	Δ	6	NA
L55	F/42	LH C.M.	Pos	1	Pos	Pos	Wt	4,5	NA
L56	M/62	LH C.M.	Pos	1	Pos	Pos	Δ	5	R/P
L57	M/82	LH C.M.	Pos	1	Pos	Pos	Wt	4,5	NA
L58	M/27	LH C.M.	Pos	2	Pos	Pos	Δ	5	NA
L67	F/23	LH D.L.	Pos	1	Pos	Pos	Δ	5	R
L68	M/49	LH	Pos	1	Pos	Pos	Wt	4,5	R

L, Linfoma de Hodgkin; M, masculino; F, femenino; Wt, alelo *LMP1* salvaje; Δ, alelo *LMP1* delecionado; R, retención de *XhoI*; P, pérdida de *XhoI*; NA, sin amplificación; SM, sin material; *, LH-EBV+ en los linfocitos reactivos y EBV negativo en las células tumorales; Pos, positivo; Neg, negativo.

Tabla 4.7: Características generales y moleculares de las muestras no tumorales asociadas el virus Epstein-Barr

Muestra	Sexo/Edad	BamW/EBER	Tipificación determinada por EBNA2	Delección de 30 pb	Nº de repeticiones de 33 pb	Retención y/o pérdida del sitio <i>XhoI</i>
HR1	M/13	Pos	1	Wt	4	NA
HR12*	F/37	Pos	1	Wt	4	NA
HR13	M/34	Pos	1-2	Wt	4	NA
HR14	M/37	Pos	1	Δ	5,5	NA
HR15	F/47	Pos	1	Wt	4	NA
HR16*	F/38	Pos	1	Wt/Δ	4	R/P
HR17	M/45	Pos	1	Wt	NA	NA
HR18	M/83	Pos	2	Δ	5	NA
PS a	M/35	Pos	1	Wt	NA	NA
PS b	M/29	Pos	1	Δ	5	NA

*, asociado al virus de la inmunodeficiencia humana HIV; HR, Hiperplasia reactiva; M, masculino; F, femenino; Wt, alelo *LMP1* salvaje; Δ, alelo *LMP1* delecionado; R, retención de *XhoI*; R/P, retención y pérdida de *XhoI*; NA, sin amplificación; PS, portador sano.

4.5.1 Detección de la delección de 30 pb en el gen *LMP1*

En los 35 casos con LH EBV+ y en los 11 CNN EBV+ (8 HR, 2 PS y 1 LH con EBV no tumoral) fue investigada por PCR la presencia de la variante del30, situada entre los nucleótidos 168294 y 168265, correspondiente a la región C-ter.

Para esto se aplicaron dos metodologías de amplificación, utilizando pares de *primers* diferentes: un método de PCR de única etapa y otro método de PCR-nested. Los patrones moleculares obtenidos después de resolver electroforéticamente los productos de los dos métodos de PCR son mostrados en la figura 4.9.

Con el método de PCR en una etapa fueron caracterizados 28 de los 35 LH EBV+ y 8 de los casos reactivos, siendo que los 7 LH restantes, los 2 PS y el caso L29 fueron amplificados con éxito por la PCR-nested. Mediante la utilización conjunta de los dos métodos, fue posible caracterizar la presencia de la variante del30 en todos los casos EBV+.

En 20/35 casos de LH (57%) y 3/11 CNN (27,3%) los resultados de PCR indicaron la presencia de la variante del30 y en 14/35 LH (40%) y 7/11 (63,7%) CNN (5 HR, L29 y PSa) fue detectada la presencia del alelo salvaje (wt). Un caso de LH y una hiperplasia reactiva-HIV+ mostraron la presencia de ambos alelos del30/wt. Este último caso se encontraba asociado al virus HIV.

En el análisis general, la presencia de la variante del30 mostró una tendencia a estar más asociada a los casos neoplásicos, mostrando un aumento de frecuencia en las edades mayores (Test de Fisher, $p = 0,15$). Cuando comparados los pacientes pediátricos y adultos con LH, no fueron observadas diferencias significativas en relación a la presencia

de la variante del30. Los adultos, sin embargo, presentaron mayor frecuencia de la variante del30 que los casos no tumorales (Test de Fisher, $p = 0,06$) (Figura 4.10).

La variante del30 se encontró asociada tanto al EBV-1 como al EBV-2 y, a pesar de que 3/4 casos con tipo 2 presentaron la delección, el estudio de asociación de tipos virales y variantes de LMP1 se vio impedida por el escaso número de casos infectados por el EBV-

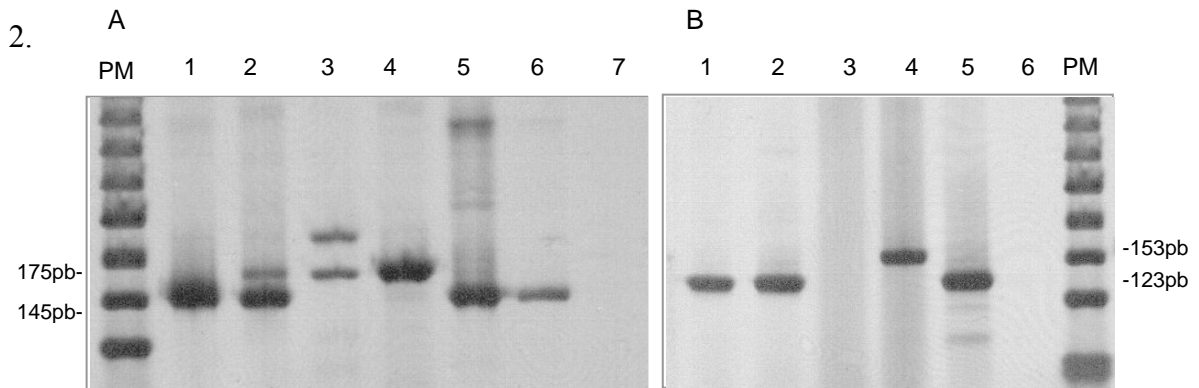


Figura 4.9: Amplificación de la delección de 30 pb en la región C-ter del gen *LMP1*. **A:** PCR nested, alelo salvaje (wt) 175 pb y alelo deleccionado (del30) 145 pb. Casos con linfoma de Hodgkin e hiperplasias reativas; 1: del30; 2: co-existencia wt/del30; 3: wt/alelo duplicado; 4: wt; 5 y 6: del30pb; 7: Control de PCR. **B:** PCR simple, alelo salvaje (wt) 153 pb y del30, 123 pb. 1 y 2: del30; 3: Caso EBV-negativo; 4: Línea celular BC2, control positivo alelo wt; 5: Línea celular BC1, control positivo alelo del30, 6: Control de PCR. PM: Marcador de peso molecular 50 pb. Gel de poliacrilamida 12%, tinción de plata.

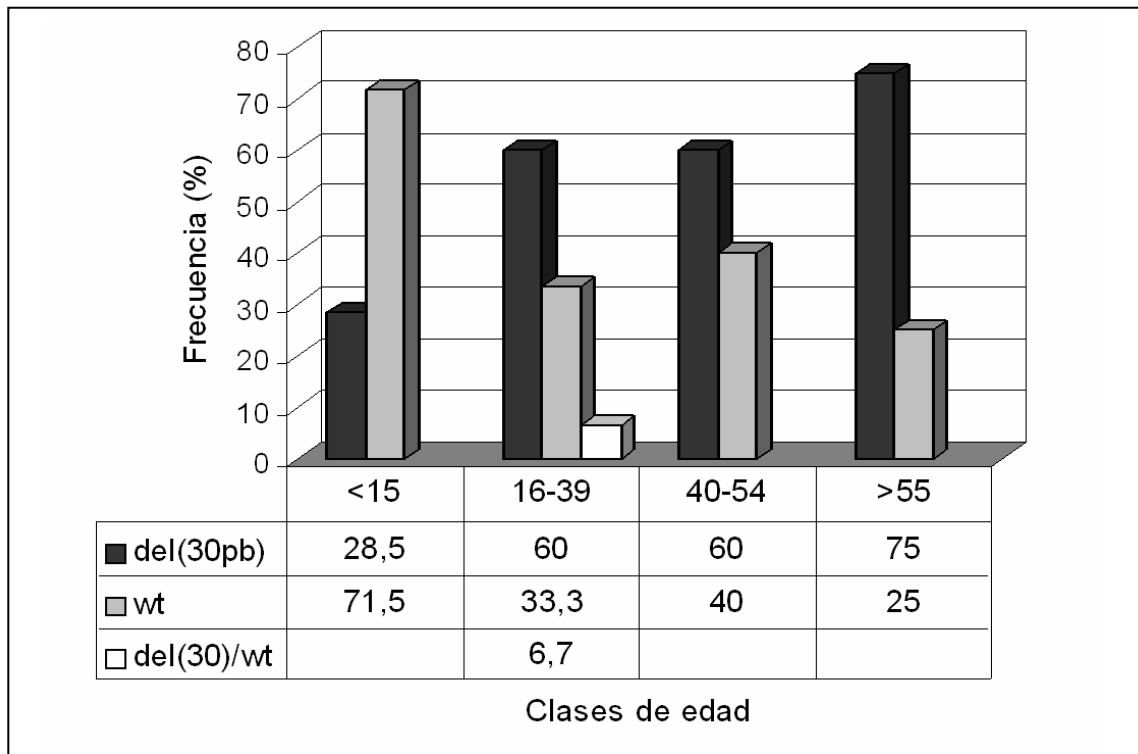


Figura 4.10: Proporciones de las variantes deleccionadas (del30) y salvajes (wt) en los linfomas de Hodgkin EBV+ por clases de edad.

4.5.2 Detección de las repeticiones de 33 pb en el gen *LMP1*

Las variaciones en el número de repeticiones de 33 pb localizadas en el exón 3 del gen *LMP1* fueron analizadas en 35 LH y en 11 CNN (8 HR, 1 PS y L29) (ver Tabla 4.6 y 4.7) por un método de PCR en una etapa con *primers* que reconocen secuencias que flanquean el conjunto de repeticiones en tándem en la región C-ter (Figura 4.11). En 2 casos del grupo CNN (HR17 y PSa) fueron no amplificables (Tabla 4.7).

El número de repeticiones observadas abarcó un rango de 3 a 7 repeticiones. La mediana del número de repeticiones de los linfomas (niños y adultos) fue de 4,5 y la de los controles fue de 4. Estas medianas representaron también el número de repeticiones más frecuente, seguida por 5 repeticiones. En los linfomas, 1 y 3 casos mostraron 7 y 6,5 repeticiones respectivamente, y sólo un caso del total de los estudiados presentó 6 unidades repetitivas (Figura 4.12).

El análisis de la asociación entre el número de repeticiones y la presencia de la variante del30 mostró que en el LH, 93,7% de los casos que presentaron la variante del30 mostraban también un número mayor de repeticiones (5-7), mientras que la presencia del alelo salvaje estuvo más asociada a un número menor de repeticiones (3-4,5) (72,3%). En los CNN se observó un fenómeno similar, en que todos los casos con la variante delecionada presentaron un número mayor de repeticiones y *viceversa*. La asociación entre número alto de repeticiones y presencia de la variante del30 fue estadísticamente significativa ($p < 0,01$) (Tabla 4.8 y Figura 4.13). En el análisis estadístico el caso neoplásico Wt/Del30 (L28) no fue incluido (Tabla 4.8).

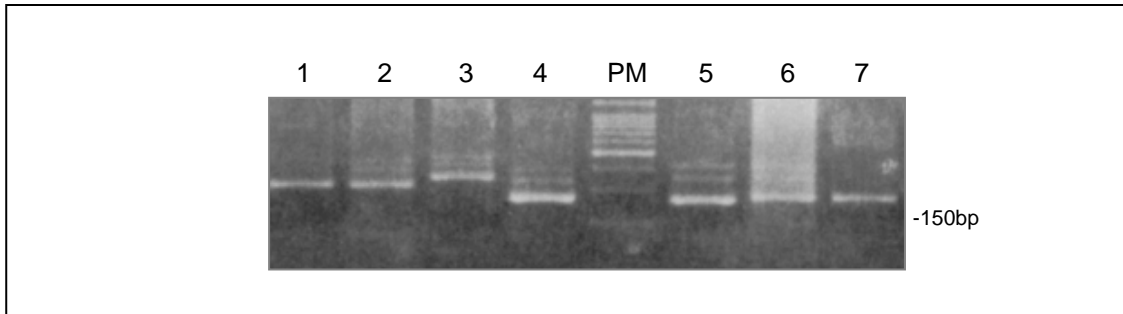


Figura 4.11: Análisis de las unidades repetitivas de 33 pb. 1-2: Linfomas de Hodgkin (LH) con 4 unidades repetitivas; 3: Prototipo B95.8 presentando 4,5 repeticiones; 4: LH con 3 unidades repetitivas; 5: LH mostrando fragmentos repetitivos con diferente número de unidades (entre 3 y 6 repeticiones); 6 y 7: casos no neoplásicos con 3 unidades repetitivas. PM, Marcador de peso molecular de 50 pb. Agarosa 3%.

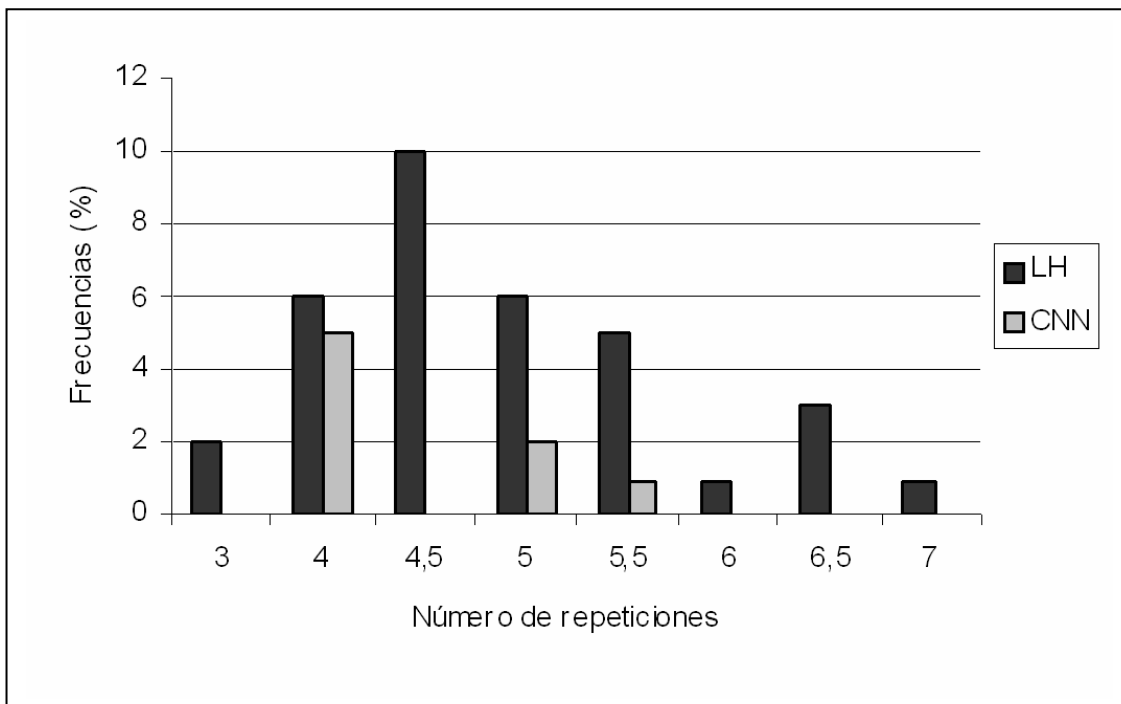


Figura 4.12: Frecuencias del número de repeticiones de 33pb en los linfomas de Hodgkin y controles no neoplásicos EBV+.

Tabla 4.8: Asociación entre el número de repeticiones de 33 pb y la presencia de la variante del30 en la región C-ter del gen *LMPI* en los casos estudiados

	Número de repeticiones		P
	3 - 4,5	5 - 7	
Linfoma de Hodgkin (N=34^a)			
Del30 pb	5	15	$P < 0,001$
Wt	13	1	
No neoplásico (N=8)			
Del30 pb	0	3	^b
Wt	5 ^c	0	
Total (N=42)			
Del30 pb	5	18	$P < 0,0001$
Wt	18	1	

3-4,5 / 5-7: rango de las repeticiones. ^a El caso neoplásico Wt/Del (L28) no fue considerado en el análisis estadístico. ^b No fue realizado test estadístico por haber 2 celdas con valor 0. ^c El caso neoplásico (L29) fue incluido en el grupo de los controles no neoplásicos (CNN).

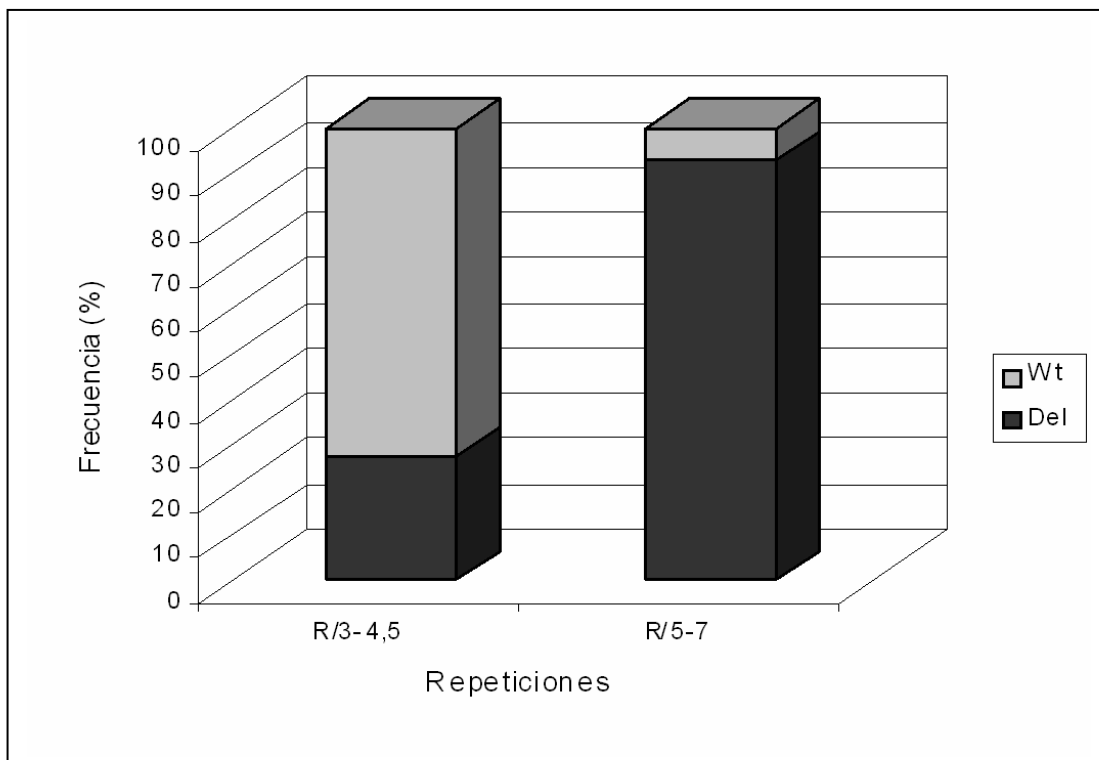


Figura 4.13: Asociación entre el número de repeticiones de 33 pb y la presencia de la del30 en la región C-ter del gen *LMPI* de los linfomas de Hodgkin.

4.5.3 Status (pérdida o retención) del sitio de restricción *XhoI*

La pérdida y/o retención del sitio de reconocimiento de la enzima de restricción *XhoI*, localizado en el exón 1 del gen *LMP1* entre las posiciones 169428-423 (región N-ter) fue determinada mediante el método RFLP-PCR en 22 pacientes, de los cuales 21 fueron LH (15 adultos y 6 niños) y 1 CNN. En los 24 casos restantes, no se observó amplificación satisfactoria, probablemente debido a la dificultad de amplificar el segmento con abundancia de CG, característico de regiones promotoras.

Dentro del grupo de LH de adultos, 9/15 retuvieron el sitio (60%) y en 6/15 (40%), el patrón de digestión puso en evidencia la co-existencia de alelos con pérdida y retención del sitio. En los niños con LH, 5/6 pacientes retuvieron el sitio (83%) y 1/6 (17%), presentó un patrón digerido/no digerido (retención y pérdida del sitio). En los CNN, solo un caso 1/6 (17%), presentó un patrón digerido/no digerido (retención y pérdida del sitio), correspondiente a un caso con infección concomitante por el virus HIV y que también presentó la co-existencia de las variantes LMP1 del30/wt (HR16). La figura 4.14 muestra el producto de amplificación antes y después de la digestión enzimática, en casos con retención y/o pérdida del sitio *XhoI*, así como co-existencia de ambas situaciones.

La pérdida o retención del sitio *XhoI*, o la existencia de un patrón doble no demostro asociación significativa con los tipos EBV-1 o -2, la presencia de la variante del30 o el número de repeticiones de 33 pb del gen *LMP1*.

Es importante remarcar que los 7 casos en que fue verificada la coexistencia de productos digeridos y no digeridos, con la misma intensidad, la posibilidad de digestión parcial fue excluida por la repetición de los experimentos de amplificación/digestión, obteniéndose los mismos resultados. Este resultado sugiere co-infección o variación intratípica en los

casos con el patrón doble, con una frecuencia mayor que la estimada a partir de la coexistencia de los tipos EBV-1/EBV-2 o del30/wt (1/35 LH y 1/11 CNN; 4,3%; en cada una de las situaciones descriptas).

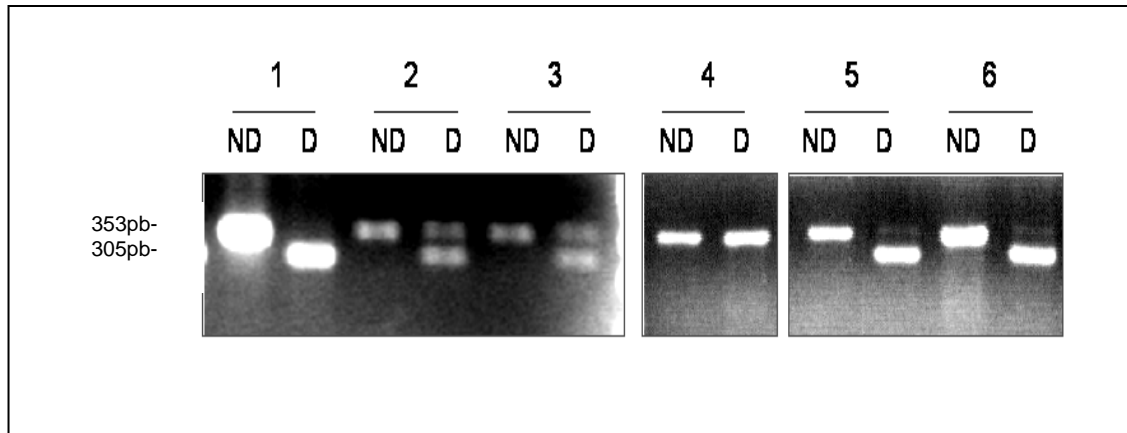


Figura 4.14: Método de RFLP-PCR para un segmento N-ter conteniendo el sitio de restricción *XhoI*. Casos con linfoma de Hodgkin e hiperplasias reactivas, 1: Control de digestión; 2 y 3: Fragmentos con un patrón de retención / pérdida del sitio de restricción; 4: Pérdida del sitio de restricción, control LH tipo D/CAO (Argentina); 5 y 6: Retención del sitio de restricción. ND y D: Producto de PCR no digerido y digerido con la enzima *XhoI*, respectivamente. Agarosa 3%.

4.5.4 Análisis de las secuencias de la región C-ter del gen *LMP1*

El fragmento correspondiente a la región C-ter fue amplificado exitosamente en 30/35 y en 9/11 casos neoplásicos y no tumorales, respectivamente (Figura 4.15).

En total, 25 LH y 8 CNN fueron secuenciados con éxito. En 6 casos fue necesario subclonar los productos de PCR para obtener una secuencia analizable. Los resultados de la secuenciación permitieron confirmar los resultados de amplificación de los alelos *LMP1* wt y/o deletado y el número de repeticiones de 33 pb obtenidos por PCR.

El análisis de secuencias de la región C-ter-*LMP1* de 20 casos no deletados y 13 con la variante del30 (LH+CNN) es mostrado en la figura 4.16. La tabla 4.9 muestra las

principales características moleculares de las secuencias de la región C-ter de los pacientes analizados.

Tabla 4.9: Características de los casos estudiados y las secuencias de la región C-ter de LMP1

Paciente	Sexo/ Edad	Subtipo histológico	Tipo Viral	del30 LMP1 (aa 343-352)	Nº de repeticiones de 33 bp (aa 250-298)	1/2 repetición de 15 bp [motivo Box 1a-JAK3 (aa 276-280)]	Mutaciones C-ter
<i>Linfomas de Hodgkin</i>							
LH01	M/4	LH EN	2	Wt	4.5	si	B95.8
LH02	F/64	LH EN	1	Wt	4.5	si	328E>Q
LH03	M/82	LH CM	1	Wt	4.5	si	328E>Q
LH04	M/49	LH	1	Wt	4,5	si	328E>Q
LH05	M/21	LH EN	1	Wt	4.5	si	309S>N, 353G>D
LH06	M/14	LH CM	1	Wt	4.5	si	273N>S, 309S>N; 353G>D
LH07	F/42	LH CM	1	Wt	4.5	si	273N>S, 309S>N, 352H>P,
LH08	M/8	LH CM	1	Wt	4	no	252G>A, 282D>G, 293D>G, 309S>N, 322Q>E, 334Q>R, 338L>S
LH09	M/10	LH CM	1	Wt	4	no	309S>N, 322Q>E, 334Q>R, 338L>S
LH10	F/23	LH EN	1	Wt	4	no	252G>A, 282D>G, 293D>G, 309S>N, 322Q>E, 334Q>R, 338L>S
LH11	M/31	LH EN	1	Wt	4	no	233D>N, 252G>A, 293D>G, 309S>N, 322Q>E, 334Q>R, 338L>S, 352H>R
LH12	M/12	LH EN	1	Wt	6.5	si	309S>N, 322Q>E, 334Q>R, 338L>S
LH13	M/26	LH EN	1/2	Wt	4.5	si	309S>N, 322Q>N, 332G>S, 334Q>R, 338L>S
LH14	F/79	LH CM	1	del30	4	no	282D>G, 293D>G, 309S>N, 322Q, 334Q>R, 338L>S
LH15	M/27	LH CM	2	del30	5	no	322Q>K, 334Q>R, 338L>S
LH16	F/23	LH EN	1	del30	4.5	si	309S>N, 322Q>N, 334Q>R, 338L>S
LH17	M/33	LH CM	1	del30	4.5	si	309S>N, 322Q>N, 334Q>R, 338L>S
LH18	M/27	LH EN	1	del30	5.5	si	309S>N, 322Q>N, 334Q>R, 338L>S
LH19	M/54	LH EN	1	del30	5.5	si	309S>N, 322Q>N, 334Q>R, 338L>S
LH20	M/59	LH EN	1	del30	5.5	si	309S>N, 322Q>N, 334Q>R, 338L>S

Tabla 4.9: Características de los casos estudiados y las secuencias de la región C-ter de LMP1

Paciente	Sexo/ Edad	Subtipo histológico	Tipo Viral	del30 LMP1 (aa 343-352)	Nº de repeticiones de 33 bp (aa 250-298)	1/2 repetición de 15 bp [motivo Box 1a-JAK3 (aa 276-280)]	Mutaciones C-ter
LH21	F/49	LH EN	1	del30	5.5	si	309S>N, 322Q>N, 334Q>R, 338L>S
LH22	M/26	LH EN	1	del30	5.5	si	309S>N, 322Q>N, 334Q>R, 338L>S
LH23	M/19	LH EN	1	del30/Wt Ω	5.5	si	309S>N, 322Q>N, 334Q>R, 338L>S
LH24	M/39	LH EN	2	del30	6.5	si	309S>N, 322Q>N, 334Q>R, 338L>S
LH25	F/59	LH EN	2	del30	6.5	si	309S>N, 322Q>N, 334Q>R, 338L>S
<i>Controles no neoplásicos</i>							
CNN01	M/13	HR	1	Wt	4	no	252G>A, 293D>G, 309S>N, 322Q, 334Q>R, 338L>S
CNN02	M/34	HR	1/2	Wt	4	no	252G>A, 309S>N, 322Q, 334Q>R, 338L>S
CNN03	F/37	HR	1	Wt	4	no	252G>A, 282D>G, 293D>G, 309S>N, 322Q>E, 334Q>R, 338L>S
CNN04	F/47	HR	1	Wt	4	no	252G>A, 282D>G, 293D>G, 309S>N, 322Q>E, 334Q>R, 338L>S
CNN05	F/38	HR	1	del30/Wt#	4	no	252G>A, 282D>G, 293D>G, 309S>N, 322Q>E, 334Q>R, 338L>S
CNN06	M/30	PS	1	del30/Wt#	5	no	252G>A, 282D>G, 293D>G, 309S>N, 322Q>D, 334Q>R, 338L>S
CNN07	M/83	HR	2	del30	5	no	309S>N, 322Q; 334Q>R, 338L>S
CNN08*	F/24	LH EN*	1	Wt	4	no	252G>A, 282D>G, 293D>G, 309S>N, 322Q>E, 334Q>R, 338L>S

M, masculino; F, femenino; LH, linfoma de Hodgkin; CNN, controles no neoplásicos; CM, celularidad mixta; EN, esclerosis nodular; del30, delección de 30 pb *LMP1*; wt, alelo *LMP1* salvaje; * Caso de LH con EBV solo en los linfocitos reactivos. Ω Solo secuencias del30pb fueron obtenidas # Solo secuencias wt fueron obtenidas.

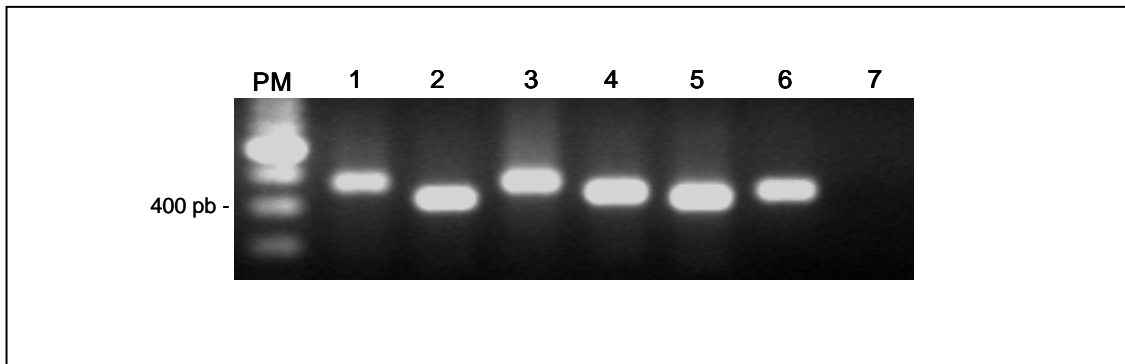


Figura 4.15: Amplificación de la región C-ter, mostrando variabilidad de tamaño debido a la presencia de deleciones y repeticiones. 1-6: casos con linfoma de Hodgkin, 7: Control de PCR. PM: Marcador de peso molecular 100 pb. Agarosa 2%.

4.5.4.1 Variantes con alelo salvaje (wt)

Cuatro patrones moleculares fueron identificados en los 20 casos que presentaron el alelo salvaje (13 LH y 7 CNN). Tres de esos patrones comprendieron secuencias filogenéticamente asociadas al prototipo B95.8, Grupo A en la clasificación Europea (Sandvej, Gratama, and Munch, 1997) y “patrón 1” (Walling, Shebib, and Weaver, 1999). Este grupo representó 35% (7/20) de las secuencias wt. El cuarto patrón se caracterizó por presentar “hotspots” informativos en las posiciones Q322, Q334, L338 y H352, e incluyeron 12/20 (60%) secuencias no relacionadas a B95.8. Un caso fue considerado inclasificable.

Un caso neoplásico mostró una secuencia C-ter idéntica al prototipo B95.8 y 3 resultaron similares al prototipo B95.8, excepto por la presencia de la mutación 328 E>Q, no observada en otras secuencias. Esta mutación permitió clasificarlos como secuencias relacionadas al prototipo B95.8, grupo A en la clasificación de los 4 grupos europeos (Sandvej, Gratama, and Munch, 1997).

Dieciseis secuencias (9 LH y 7 CNN) fueron caracterizadas por la mutación 309 S>N, de las cuales 3 secuencias (LH05, 06 y 07) fueron clasificadas como

filogenéticamente relacionadas a B95.8, “patrón 1” del sistema clasificatorio de 22 secuencias (Walling, Shebib, and Weaver, 1999), debido a la presencia de una mutación 353 G>D adicional en dos de los tres casos.

Las 13 secuencias restantes (6 LH y 7 CNN) fueron caracterizadas por los siguientes *hotspots* informativos: 322Q, 334Q, 338L y 352H.

En 9 casos fue verificada la mutación 322Q>E (5 LH y 4 CNN), en un caso 322Q>N (LH13) y la posición 322Q resultó no mutada en 2 casos. La mutación observada más frecuentemente, 322 Q>E fue descrita previamente por Walling et al. (1999) como “patrón 3”, mientras que la mutación 322 Q>D, descrita en el grupo B de la clasificación Europea, se observó solamente en un caso (CNN06).

Las dos secuencias con 322Q no mutado (CNN 01 y 02), pudieron ser clasificadas como secuencias de “patrón 4” y del Grupo B, respectivamente.

La única secuencia *LMP1* no delecionada (LH13) que presentó la mutación 322 Q>N (típica de las secuencias del30), como también 332 G>S, 334 Q>R, 338 L>S, fue considerada inclasificable (debido a la presencia de 322 Q>N). Coincidentemente, en este caso fue verificada la co-infección con EBV-1 y -2.

Las mutaciones 334 Q>R y 338 L>S fueron observadas en todos los casos, mientras que 352 H>R estuvo presente solo en un caso (LH11).

En el patrón Q>E (patrón 3 de Walling) las mutaciones 252G>A, 282D>G y 293D>G en la unidad repetitiva de 33 pb fueron recurrentes, todas ellas descritas previamente como grupo B en la clasificación Europea (Sandvej, Gratama, and Munch, 1997).

El dominio de la región repetitiva carboxilo-terminal (aminoácidos 250-298) del gen *LMP1* del prototipo B95.8 comprende 4,5 unidades repetitivas, las cuales consisten en 3 repeticiones perfectas de 33 pb cada una y la mitad de otra unidad de repetición conteniendo una inserción de 15 pb (ins15). Esta inserción, ubicada en la tercera

repetición de 33 pb, corresponde a un motivo de señalización de la proteína JAK3 (JAK3-Box1a; HDPLP, aminoácidos 276-280) en la región activadora CTAR-3 (Figura 4.17). La ins15 es característica de las secuencias relacionadas a B95.8, como el grupo A europeo y el “patrón 1” (Sandvej, Gratama, and Munch, 1997; Walling, Shebib, and Weaver, 1999) (Miller et al., 1994b) Todos los casos relacionados a B95.8 analizados en este trabajo mantuvieron este patrón (7/20, 35%).

El grupo de secuencias no deletionadas caracterizadas por las mutaciones 309S>N y 322Q, 334Q, 338L y 352H mostró una media de 4 repeticiones (rango de 4-6,5). La mayoría de estas secuencias (excepto LH12 y LH13) mostraron ausencia de la ins15, como esperado en las secuencias no relacionadas al grupo B95.8.

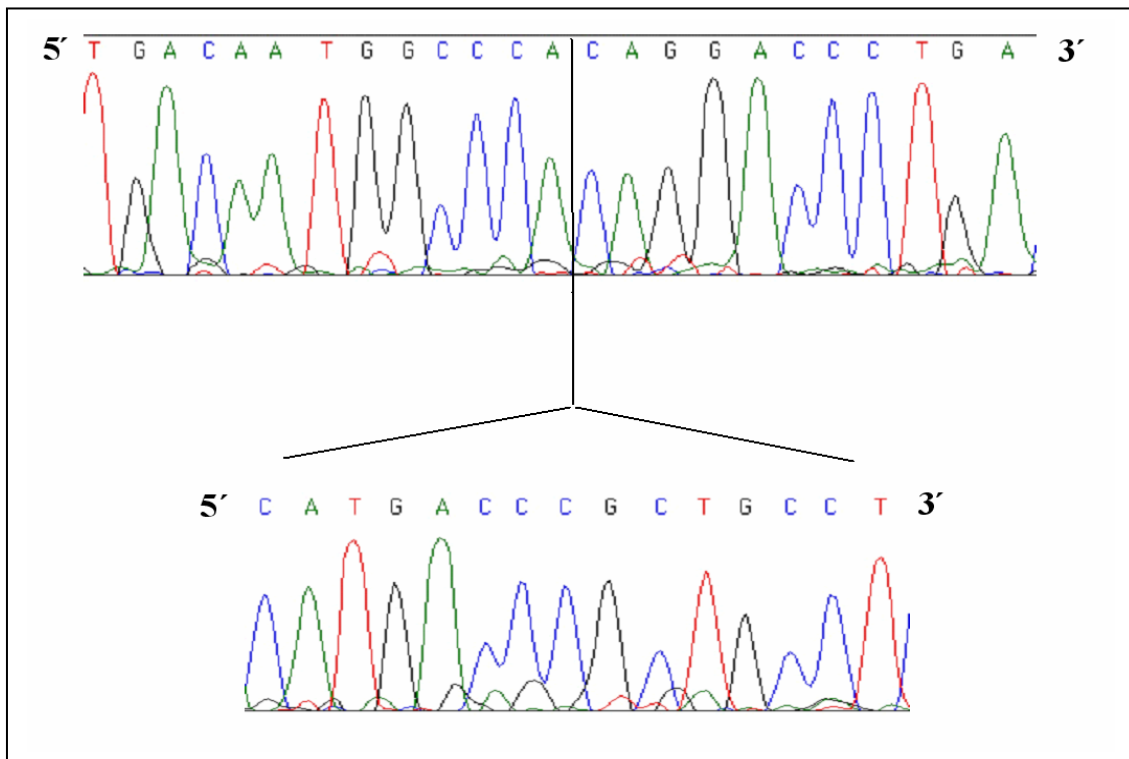


Figura 4.17: Esferograma representando la reacción de secuenciación por el método cíclico DYEnamic™ ET Dye Terminator Cycle Sequencing kit (Amersham), con química basada en la marcación fluorescente de los terminadores (ddNTPs) (“dye terminator labelling”). La figura muestra la localización de la inserción de 15 pb (169493-479) ubicada en la tercera unidad repetitiva de 33 pb en la región C-ter del gen *LMP1* (prototipo B95.8).

4.5.4.2 Variantes delecionadas (del30)

Las 13 secuencias delecionadas (12 LH y 1 CNN) mostraron menos mutaciones en la región C-ter. Esta región fue caracterizada por las substituciones 309 S>N, 322 Q>N/K, 334 Q>R, 338 L>S. 322Q fue mutado a N en 10 LH y a K en un caso (LH15). En los 2 casos restantes (LH14 y CNN07) la posición 322Q no fue mutada.

La mutación más frecuente en la posición 322Q>N es informativa para el grupo C europeo (Sandvej, Gratama, and Munch, 1997) y el “patrón 2a” (Walling, Shebib, and Weaver, 1999), mientras que la mutación 322 Q>K fue descrita como parte del “patrón 2b” (Walling, Shebib, and Weaver, 1999).

La mayoría de los casos mostraron una o dos repeticiones más que las variantes salvajes (mediana 5,5; rango 4 - 6,5), localizadas antes de la unidad repetitiva que contiene la ins15. A diferencia de los casos no delecionados, en las secuencias del30, no se encontraron mutaciones recurrentes en la región repetitiva.

Notablemente, 10 de las 13 secuencias con del30 presentaron la ins15, típica de secuencias relacionadas a B95.8. Debido a que la presencia de esta inserción no era esperada, de acuerdo a las relaciones filogenéticas previamente determinadas para estas secuencias (Walling, Shebib, and Weaver, 1999), las características moleculares de este grupo de secuencias fueron inspeccionadas. Fue observado que la frecuencia de la ins15 en las variantes del30, fue estadísticamente significativa cuando comparada con la presencia de esta inserción en las regiones C-ter de secuencias no delecionadas [3/13 wt vs 10/13 del30; $\chi^2 = 5,54$, $p = 0,01$].

Ins15
[Motivo JAK3-Box1a]

	232	298
//.....//.....//	
B95.8	GDGPPPLCSQNLGAPCGGPDNGPQDPDNTDDNGPQDPDNTD-----DNGPHDPLRQDPDNTDDNGPQDPDNTD-----	
LH01	-----	-----
LH02	-----	-----
LH03	-----	-----
LH04	-----X-----+-----	-----
LH05	-----H-----	-----
LH06	-----X-----X-----	-----S-----
LH07	-----	-----S-----
LH08	-----A-----	-----R-----G-----G-----
CNN08	-----A-----	-----R-----G-----G-----
CNN03	-----A-----	-----R-----G-----G-----
LH10	-----R-----	-----R-----G-----G-----
CNN04	-----A-----	-----R-----G-----G-----
CNN05	-----DV-----A-----	-----Y-----R-----GH-----N-----G-----
LH12	-----DNGPQDPDNTDDNGPQDPDNTD-----	-----
LH09	-----X-----	-----R-----
LH11	-----N-----A-----	-----R-----G-----
CNN06	-----VN-----A-----DNGPQDPDNTD-----	-----R-----G-----G-----
CNN01	-----A-----	-----R-----G-----
CNN02	-----A-----	-----R-----
LH13	-----	-----V-----
LH14	-----G-----G-----	-----R-----G-----G-----
CNN07	-----A-----DNGPQDPDNTD-----	-----R-----H-----
LH15	-----DNGPQDPDNTD-----	-----R-----
LH18	-----DNGPQDPDNTD-----	-----
LH24	-----DNGPQDPDNTD-----	-----DNGPQDPDNTD-----
LH25	-----DNGPHDPLRQDPDNTDDNGPQDPDNTD-----	-----
LH23	-----DNGPQDPDNTD-----	-----
LH20	-----DNGPQDPDNTD-----	-----
LH17	-----	-----
LH16	-----	-----
LH22	-----DNGPQDPDNTD-----	-----
LH21	-----G-----DNGPQDPDNTD-----	-----
LH19	-----DNGPQDPDNTD-----	-----

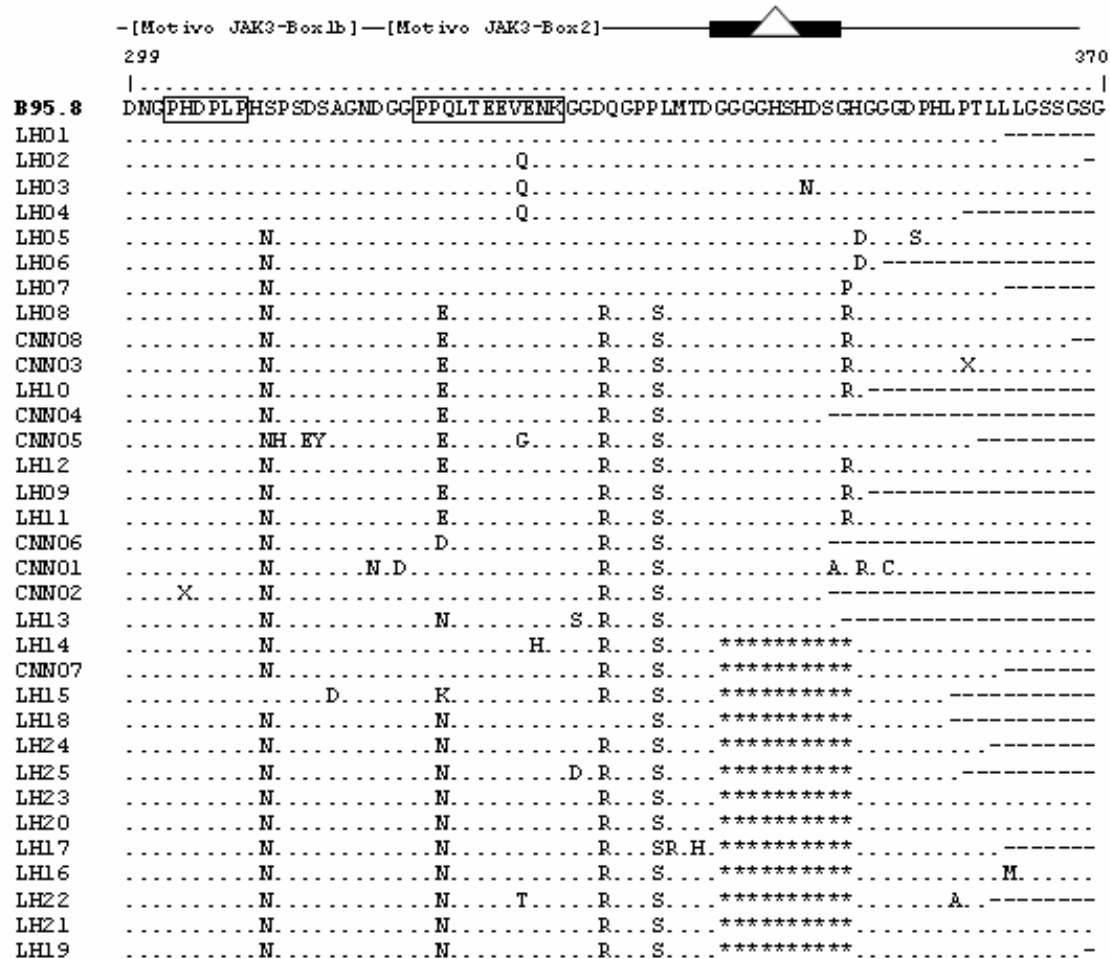


Figure 4.16: Alineamiento de las secuencias aminoacídicas de la región C-ter de la proteína LMP1 (aa 232 a 370) en los casos EBV+ comparados con el prototipo B95.8 (GenBank Accession Number W015555). La región C-ter completa del patrón B95.8 es mostrada. Solo las sustituciones aminoacídicas respecto a B95.8 son mostrados en los casos analizados. Los puntos indican conservación de los residuos en relación a B95.8 Los rectángulos rellenos indican las unidades repetitivas de 33 pb; las áreas recuadradas sobre la secuencia B95.8 señalan sitios de reconocimiento por factores de transcripción; (□), Ins15, inserción de 15 pb; (*), delección aminoacídica (correspondiente a la delección de 30 pb).

4.5.5 Análisis de la región promotora del gen *LMP1*

Un segmento del promotor (nt -217 a +1) y de la región N-ter (nt 1-137) fue amplificado con éxito, seguido por secuenciación directa en 17 casos neoplásicos (5 niños y 12 adultos). Las secuencias fueron comparadas con el prototipo B95.8 y otras secuencias descriptas en la literatura, correspondientes a las variantes europeas LMP1 A-C y D (Sandvej, Gratama, and Munch, 1997), CAO del sur asiático (Hu et al., 1991) CG1 y CG2 identificadas en China (Zhou et al., 2001). Adicionalmente, fueron generadas para este trabajo secuencias de la región promotora de la línea celular Raji (LB africano) y CEMO-3 (LB brasilero).

Todos los casos presentaron una mutación en la posición -158 C>T, excepto 2 casos (LH22 no mutado y LH32 C>G).

En la figura 4.18 se muestra el alineamiento de secuencia de la región promotora del gen *LMP1* de los casos neoplásicos analizados relativos al prototipo B95.8.

En 7 casos, el promotor no presentó mutaciones recurrentes (LH 01, 04, 05, 08, 12, 20 y 32), similar a lo descrito en los promotores de los grupos Europeos A-C. Los restantes 10 casos mostraron 16 mutaciones recurrentes similares a las ya descriptas en los grupos D/CAO y la variante Raji. La mutación -158 C>T fue característica de la gran mayoría de las secuencias analizadas, independientemente de la presencia y tipo de otras mutaciones en el promotor.

Fueron observadas 5 mutaciones similares a D-CAO en las posiciones nucleotídicas -207 C>T (2 secuencias), -199 C>T (2 secuencias), -163 C>T (3 secuencias), -37 C>G (2 secuencias) y -34 C>G (2 secuencias).

Las posiciones mutadas en Raji fueron también encontradas recurrentemente en los aislamientos estudiados: -184 A>T (6 secuencias), -172 T>C (7 secuencias), -50 T>A (8 secuencias), -39 A>C (7 secuencias), -12 G>A (10 secuencias) y +17 T>G (11

secuencias). La posición -39 A>C se encontró mutada en Raji y CEMO-3, así como en la variante China CG2. De manera recurrente, también se observaron mutaciones similares a D-CAO y Raji en las posiciones -158 C>T (15 secuencias), -114 T>C (9 secuencias), -113 A>G (3 secuencias), -63 A>C (10 secuencias), -44 G>C (10 secuencias) y +40 G>C (11 secuencias).

Los aislamientos secuenciados en este trabajo presentaron algunas posiciones con mutaciones recurrentes, no observadas en las variantes utilizadas como referencia, compartidas por un número pequeño en cada caso. Estas posiciones fueron -173 T>G (3 secuencias), -167 T>G (2 secuencias), -160 T>G (2 secuencias), -135 C>A (2 secuencias), -120 A>G (2 secuencias), -116 T>C (2 secuencias), -74 G>C (3 secuencias) y -11 (C>G) (2 secuencias).

169732
-217

169633
-118

	LBF3		LBF4						
	LBF5/6	LBF2	LBF4		LBF4				
	JK.	LBF7.	PU-1.	OCT-1.					
B95.8	AGCTT	GCCCCCGG	GGACC CGCTTTTCTAACACAAACACACGCTTTC	TA	CTTCCCTTT	CTAC GCTT	TACATGCACACA	CACACCGCCGCTTT	CGGGAAAT
GRUPO-AC									
GRUPO-D		T.		G.		T.	T.		T.
PRO-CA0		T.	T.			T.	TA.	GC.	TCTA.C
RAJI				T.		C.	T.		
PRO-CG1						T.	TA.		C
PRO-CG2						T.	TA.		
CEMO-3				T.		C.	T.		
LH-04				G.			T.		
LH-08							T.		
LH-12							T.		
LH-05							T.		
LH-01							T.		
LH-20		G.					T.		
LH-26		T.	T.			T.	TA.		TA.
LH-17		T.	T.			T.	T.		TA.
LH-28				T.		GC.	T.		
LH-21				T.		C.	G.	T.	G.
LH-27				T.		C.	T.		
LH-22				T.		G.	G.	G.	
LH-31			G.	T.		C.	T.		
LH-25						C.	T.		
LH-33						C.	T.		G.
LH-24			A.	T.		C.	G.		S.
LH-32						G.	G.	G.	

B95.8

- GRUPO-AC
- GRUPO-D
- PRO-CA0
- RAJI
- PRO-CG1
- PRO-CG2
- CEMO-3
- LH-04
- LH-08
- LH-12
- LH-05
- LH-01
- LH-20
- LH-26
- LH-17
- LH-28
- LH-21
- LH-27
- LH-22
- LH-31
- LH-25
- LH-33
- LH-24
- LH-32

.....ATF/CREB.....TATA.....|
 CT-GTACCCGTACTGCCTCCGGCAGACCCCGCAAATCCCCCGGGGCCTACATCCCAAGAAACACGGGTTACTCTGACGTAGCCGCCCTACATAAGCCTCT
 ..-.....
 ..-CG..A.....C.....C.....A.....CT...G..G.....
 .C-.CG....C.AT.....C.....C.....CT...G..G.....C.....
 ..-C.....C.....A.....C...C.....
 .C-.CG.....C.....C.....CT...G..G.....
 ..-CG.....CC.....C.....CT...CAG..GA.....C.....
 ..-C.....C.....A.....C...C.....
 ..-.....
 ..-.....
 ..-.....
 ..-.....C.....
 ..-.....G.....
 ..-.....G.....C.....
 .G-.CG.....C.....C.....CT...G..G.....
 .G-.CG.....C.....C.....CT...G..G.....
 ..-CG.....C.....C.....A.....C...C.....
 ..-C.....C.....C.....A.....C...C.....
 ..-C.....C.....C.....A.....C...C.....C.....
 ..-C.....C.....C.....A.....C...C.....
 ..-C.....C.....C.....A.....C...C.....
 ..-.....T.....G..C.....T..A.....C...G.G.....C.C.....
 ..-C.....C.....Y..A.....C...C.....
 ..-.....

B95.8

GRUPO-AC
GRUPO-D
PRO-CAO
RAJI
PRO-CG1
PRO-CG2
CEMO-3
LH-04
LH-08
LH-12
LH-05
LH-01
LH-20
LH-26
LH-17
LH-28
LH-21
LH-27
LH-22
LH-31
LH-25
LH-33
LH-24
LH-32

```

.....+1.....+41.....|
CACACTGCTCTGCC CCCTTCTTTCTCAACTGCCCTTGCTCCTGACACACTGCCCTGAGGATGGAACACGACCTTGAGAGGGGCCCACCGGGCCC GCGACG
.....|
.T.....T.AG.....GT.....C.....A.....C.....A...
GT.....T.AG.....GT.....C.....A.....CC.....G.....G.....C...
.....A.....G.....C.....C.TG.....
GT.....T.AG.....GT.....C.....A.....CC.....G.....C...
.T.....T.AG.....GG.....C.....A.....C.....G.....C...
.....A.....G.....C.....C.TG.....G.....
.....
.....
.....
.....
.....
.....G.....C.....C.TG.....
.....A.....G.....C.....C.TG.....
.....A.....G.....C.....C.TG.....
.....A.....G.....C.....C.TG.....
.....A.....G.....C.....C.TG.....
.....A.....G.....C.....C.TG.....
.....A.....G.....C.....C.TG.....
.....A.....G.....C.....C.TG.....
.....AG.....G.....G.....G.....C.....C.TG.....C.....G.....G...
S.....AG.....S.....G.....C.....C.TG.....M.....G.....S...
.....AA.....G.....

```

```

169379
+137
.....XhoI.....|
B95.8 GCCCCCTCGAGGACCCCCCTCTCCTCTTCCCTAGGCCTTGCTCTCCTTCTCCTC
GRUPO-AC .....
GRUPO-D .....T.C.....A.TCT.....
PRO-CA0 .....T.....A.....G
RAJI .....TA.....
PRO-CG1 .....T.....A.....G
PRO-CG2 .....T.....A.G.....G
CEMO-3 .....TA.....
LH-04 .....
LH-08 .....
LH-12 .....
LH-05 .....
LH-01 .....G
LH-20 .....A.....
LH-26 .....M.....
LH-17 .....A.....G
LH-28 .....G.....A.....
LH-21 .....A.....
LH-27 .....A.....GT.....
LH-22 .....
LH-31 .....A.....
LH-25 .....A.....G
LH-33 .....
LH-24 .....M.....A.....
LH-32 .....TAA.....GG.....

```

Figure 4.18: Alineamiento de secuencia de la región promotora del gen *LMPI* desde la posición -217 a +137, con respecto al sitio de comienzo de la transcripción. La secuencia completa del prototipo B95.8 es mostrada (GenBank Accession Number V015555). En las secuencias promotoras del grupo A-C, D, CAO, CG1, CG2, Raji, CEMO-3 y de los 17 casos con linfoma de Hodgkin analizados (LH), solo se indican los nucleótidos mutados comparados con el patrón B95.8. Los recuadros denotan los sitios de unión de los factores de transcripción ATF/CREB, factor de transcripción que responde a AMPc; XhoI, sitio de reconocimiento de la enzima de restricción XhoI.

4.5.6 Análisis filogenético

A partir de la matriz de distancias generada con las secuencias del promotor, fue inferido un árbol filogenético no enraizado, por el método de “Neighbor joining”. Este mostró dos ramas principales, con los mayores valores de “bootstrapping” (Figura 4.19). Una de las ramas agrupó las secuencias correspondientes a los tipos del sudeste asiático CAO, CG1 y CG2, junto con la variante D Europea. Las secuencias de los casos estudiados en este trabajo agruparon todas en la otra rama, junto con el prototipo B95.8, las variantes asociadas A-C Europeas y la variante africana Raji. Dentro de esta rama, fue posible verificar la existencia de 2 grupos bien diferenciados. En una de las sub-ramas agruparon dos secuencias (LH17 y LH26), basado en las características particulares de estas secuencias (*vide* descripción en ítem 4.5.5). En la otra, agruparon todas las otras secuencias, ya sea en torno de B95.8 o de Raji. Cabe mencionar que la secuencia de CEMO-3 agrupó con Raji.

Para verificar las relaciones inferidas a partir del análisis filogenético de las secuencias del promotor, incluyendo los aislamientos estudiados y las variantes descritas en la literatura, fue realizado un análisis filogenético incluyendo las secuencias de la región C-ter de los aislamientos con promotor de *LMP1* secuenciado. El árbol filogenético inferido a partir de la matriz de distancias de las secuencias de la región C-ter de los aislamientos LH 01, 04, 05, 08, 12, 17, 20, 21, 24 y 25 (casos con secuencias de promotor y C-ter), también separó las secuencias en dos grupos, uno compuesto por las secuencias de los tipos D/CG2, y otro, integrado por el resto de las secuencias, incluyendo las variantes Europeas A-C, las variantes asiáticas CAO, CG1 y CG3 y los casos brasileros (Figura 4.20). Dentro de esta rama, las secuencias se agruparon formando dos grandes grupos, uno en torno de B95.8, A y Raji; y el otro

agrupando las variantes delecionadas similares a C, así como las variantes salvajes similares a B.

Cuando comparados ambos árboles, se observa que el árbol inferido a partir de las secuencias C-ter fue menos informativo que el del promotor, en relación a los valores de “bootstrapping” y en su capacidad de discriminación de variantes, reflejando algunas características, tanto de las secuencias como de los métodos de análisis empleados. Por un lado, como ya relatado en otros trabajos, al tratarse de variantes intraespecíficas, el grado de divergencia es bajo. Por otra parte, los métodos utilizados podrían estar subestimando la variabilidad existente. Por ejemplo, una limitación de este árbol es que con los programas utilizados, las deleciones e inserciones no pueden ser codificadas como caracteres, de esta manera, estas regiones son consideradas “no informativas” y el árbol fue inferido solamente en relación a las mutaciones de punto.

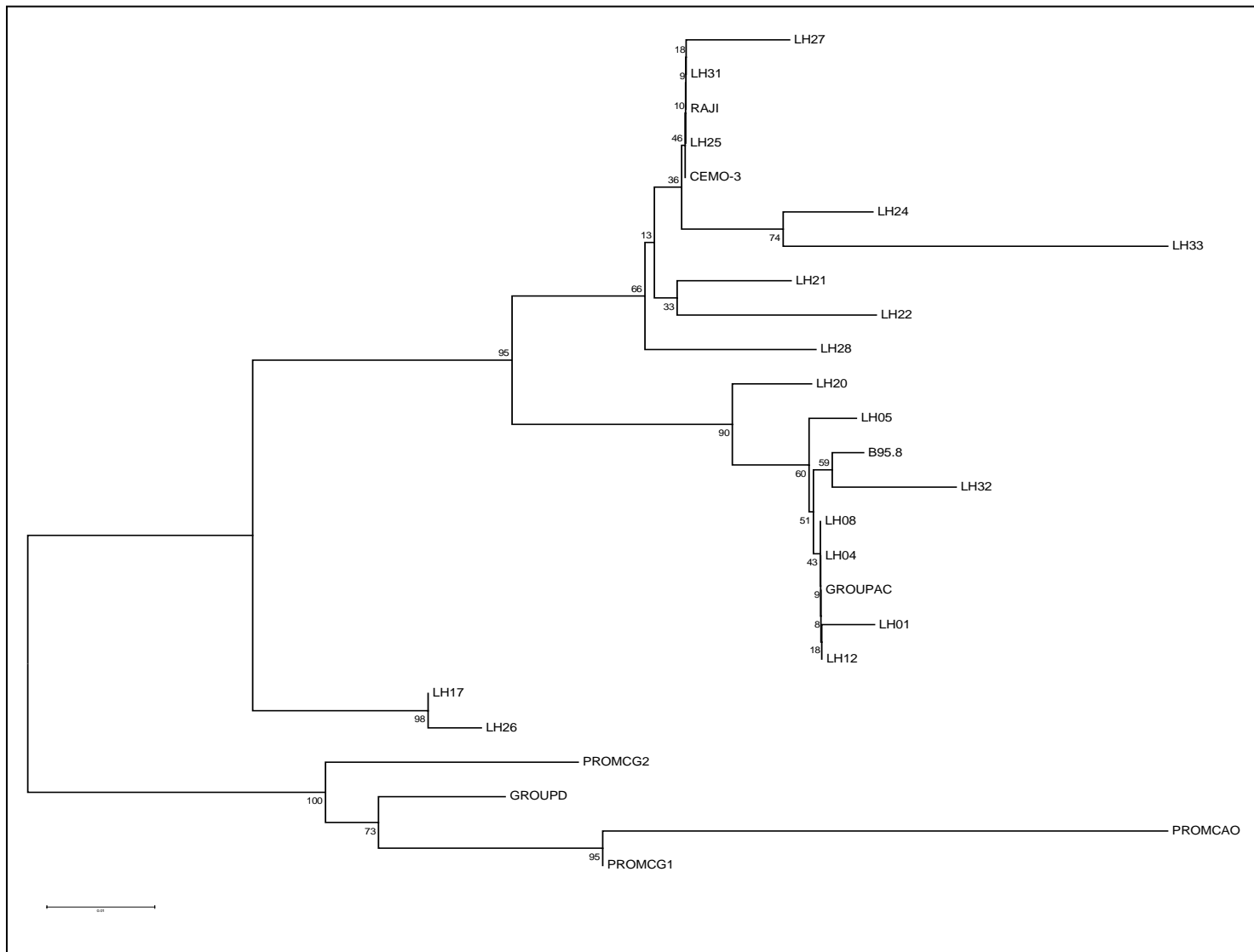


Figura 4.19: Análisis filogenético de las secuencias del promotor *LMPI*. El árbol filogenético fue inferido a partir de las distancias calculadas, por el método de “Neighbor joining” utilizando el programa Mega 3.1 (<http://www.megasoftware.net/>). En escala, las ramas horizontales representan sustituciones nucleotídicas (divergencia). El árbol filogenético no enraizado incluyó el prototipo B95.8, los grupos europeos A-D, las variantes CAO (Fielding et al., 2001), CG1 y CG2 (Zhou et al., 2001), así como Raji (linfoma de Burkitt africano y CEMO-3 (linfoma de Burkitt de Brasil) (Stefanoff et al., 2003); LH, linfoma de Hodgkin.

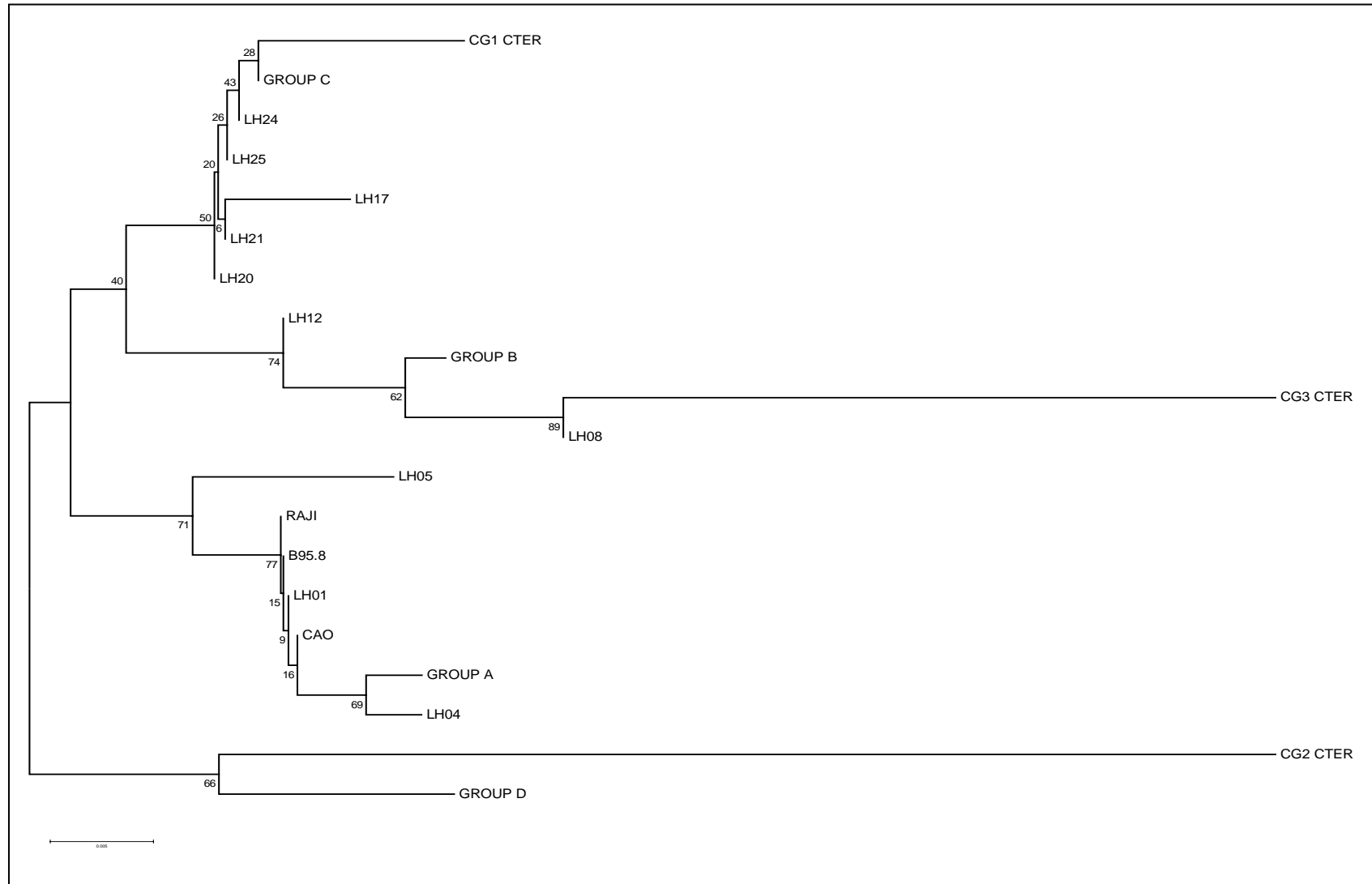


Figura 4.20: Análisis filogenético de las secuencias de la región C-ter del gen *LMP1*. El árbol filogenético fue inferido a partir de la matriz de distancias de las secuencias correspondientes a los aislamientos LH 01, 04, 05, 08, 12, 17, 20, 21, 24 y 25, calculadas por el método de “Neighbor joining” utilizando el programa Mega 3.1 (<http://www.megasoftware.net/>). En escala, las ramas horizontales representan sustituciones nucleotídicas (divergencia). El árbol filogenético no enraizado incluyó el prototipo B95.8, los grupos europeos A-D, las variantes CAO (Fielding et al., 2001), CG1 y CG2 (Zhou et al., 2001), así como Raji (linfoma de Burkitt africano y CEMO-3 (linfoma de Burkitt de Brasil) (Stefanoff et al., 2003); LH, linfoma de Hodgkin.

4.5.7 Agrupamiento de las secuencias

El análisis conjunto de las regiones promotoras (N=17) y C-ter (N=10) del gen *LMP1* permitió agrupar las secuencias estudiadas en tres grupos:

(I) Promotor sin mutaciones (excepto por -158 C>T), asociado a regiones C-ter de tipo B95.8/A y B (no deletados). Los casos correspondientes a este grupo (LH 01, 04, 05, 08, 12, 20 y 32) representaron 41% (7/17) del total analizado y agruparon juntos en torno de B95.8, en el árbol filogenético. Los casos LH20 y 32 mostraron características particulares ya que fueron las únicas secuencias en este grupo que presentaron una región C-ter con del30. En LH32, el único cambio nucleotídico observado fue en la posición -158, pero en lugar de C>T fue de C>G. LH20 presentó la mutación +18 T>G, propia de la variante africana Raji.

(II) Los casos pertenecientes a este grupo (LH 17 y 26), (2/17, 12%) presentaron los cambios nucleotídicos -12 G>A y +17 T>G característicos de la variante Raji, por los cuales fueron agrupados dentro de la rama B95.8 /Raji (Figura 4.19). Sin embargo, las mutaciones -207 C>T, -199 C>T y -163 C>T (similares a D, CAO y/o CG1) determinaron una distancia mayor, que separó este grupo de secuencias del resto de los aislamientos analizados. Ambos aislamientos mostraron la secuencia del promotor anteriormente descrita, asociada a una región C-ter deletada.

(III) promotor similar a la variante Raji. Los casos incluidos en este grupo (LH21, 22, 24, 25, 27, 28, 31 y 33) presentaron las mutaciones -184 A>T, -172 T>C, -50 T>A, -39 A>C, -12 G>A y +17 T>G. Este grupo de secuencias estuvo asociado a una región C-ter deletada y fue el más frecuente (8/17, 47%). Solo un caso (LH22) no presentó la mutación -158 C>T. Cabe mencionar que el aislamiento de LB brasileño (CEMO-3) coincidió totalmente con la variante Raji, en cuanto a la secuencia del promotor.

El análisis filogenético de las secuencias del promotor apoya el agrupamiento propuesto, y consigue distinguir estas 3 variantes, aunque con valores relativamente bajos de “bootstrapping” dentro de una de las ramas.

La comparación entre los diferentes grupos de promotores identificados (I, II y III) y las variantes C-ter estudiadas en cada caso, no pudo ser analizada estadísticamente, debido al tamaño muestral. Sin embargo, es posible identificar una tendencia de asociación entre el grupo de promotor III y la variante C-ter delecionada.

Dos características importantes y únicas fueron observadas en las secuencias de los aislamientos brasileños:

1) La mayoría de las secuencias de *LMP1* presenta una región C-ter con la deleción de 30 pb, pero el promotor no es homólogo al descrito en la literatura para las variantes *LMP1* del30 estudiadas hasta el momento (variante C Europea y CG1).

2) La mayoría de las secuencias del promotor es homóloga a la secuencia de la variante africana Raji, sin embargo la región C-ter, como fue descrito, no es homóloga a Raji, que presenta C-ter salvaje, relacionada filogenéticamente con el prototipo B95.8.

4.5.8 Análisis de la región N-ter

Respecto al sitio de restricción *XhoI*, CTCGAG, presente en el prototipo viral B95.8, en general, se observó la retención del mismo. Solo dos casos, correspondientes a los grupos II (LH26) y III (LH24) mostraron pérdida parcial del sitio debido a una mutación puntual en el sitio *XhoI*, en la posición nucleotídica 169424 (CTCGMG). En estos casos, la posición de ambigüedad M (A>A/C) podría ser interpretada como la existencia de dos cepas o clones, con uno de ellos portando la mutación y el otro, con la posición no mutada. Coincidentemente, ambas secuencias promotoras presentaron

un patrón digerido/no digerido (retención y pérdida del sitio) en la técnica de RFLP-PCR. En ningún caso neoplásico analizado se observó la mutación G>T (posición 169425) presente en las variantes de los grupos D, CAO, CG1 y CG2. La mutación G>T (169425) afecta la secuencia aminoacídica de la proteína LMP1 (+17 R>L), en tanto la mutación presente en los dos aislamientos de LH brasileño es una mutación silente (no sinónima).

En la figura 4.21 se muestra el alineamiento de las secuencias de la región N-ter analizada (aa 1 a 32). En términos generales, esta región presentó 2 patrones:

1) Seis de los 7 casos correspondientes al grupo I, definido por las secuencias de promotor/C-ter, fueron caracterizados por una secuencia no mutada similar al prototipo B95.8.

2) En todos los casos de los grupos II y III, fueron observados cambios aminoacídicos potenciales en las posiciones 2 E>D y 3 H>L, similar a lo encontrado en la variante Raji, así como en CEMO-3. La mutación 25 L>I, característica de las variantes D/CAO, CG1 y Raji, fue observada en 5 secuencias analizables del grupo III, una secuencia del grupo I (LH20) y una secuencia analizable del grupo II (LH17). Todas las secuencias que presentaron las mutaciones DLI en las posiciones 2, 3 y 25, tuvieron también la región C-ter delecionada, inclusive el caso LH20, clasificado en el grupo I.

	1		32
		
B95.8	MEH	DLERGP PGPRR PPRGP PLSSS	IGLALLLL
Grupo-AC
Grupo-D	Q. LR.	IL.....
Nter-CA0	.R.P. L.	I.....
Nter-RAJI	.DL	I.....
Nter-CG1	.R.P. L.	I.....
Nter-CG2	.R.P. L.	M.....
Nter-CEMO-3	.DLA.....T
Nter-08
Nter-01
Nter-12
Nter-04
Nter-05
Nter-32	K. A.
Nter-27	.DLK. A.	T. C.....
Nter-31	.DL	I.....
Nter-17	.DL	I.....
Nter-28	.DL	I.....
Nter-26	.DL
Nter-20	.DL	I.....
Nter-21	.DL	I.....
Nter-25	.DL	I.....
Nter-33	.DL	A. A. G..
Nter-22	.DLQ.....
Nter-24	.DLT. AP.....	I.....

Figura 4.21: Alineamiento de las secuencias aminoacídicas de la región N-ter de la proteína latente de membrana 1[(LMP1) (aa 1 a 32)]. Solo se indican los cambios aminoacídicos de las secuencias estudiadas en comparación con el prototipo B95.8. Las sustituciones aminoacídicas mas frecuentes son esquematizadas dentro de recuadros. N-ter, amino terminal. La secuencia de CA0 corresponde a la versión corregida depositada en bajo el número de acceso AF30442.

4.5.9 Características de importancia funcional de los promotores analizados

En el promotor, el sitio TGACGTAG, ubicado en las posiciones 169560-553 (número de acceso V01555) correspondiente al motivo de reconocimiento ATF/CREB (-45 a -38), no se encontró mutado en ningún caso del grupo I. Contrariamente, todos los casos de los grupos II y III (59% del total de promotores analizados) presentaron mutaciones en este sitio. La mutación -44 G>C, característica del promotor de los grupos D/CAO y de los grupos chinos CG1 y CG2, fue fijada en todos los casos del grupo II y III. Otras dos mutaciones resultaron fijadas, -43 A>T y -39 A>C, en los grupos II y III respectivamente. Las mutaciones en las posiciones -44 y -39 son características de la variante Raji.

El sitio de reconocimiento de la ARN polimerasa II, caja TATA (-30 a -23) se encontró conservado, coincidente con la expresión de *LMPI* observada en todos los casos analizados.

5. DISCUSION

Este trabajo permitió estudiar la asociación entre el virus Epstein-Barr y el linfoma de Hodgkin, así como realizar un análisis molecular sistemático de regiones polimórficas del gen *LMP1* en aislamientos tumorales y controles no neoplásicos en el Sudeste de Brasil.

Detección del EBV y asociación con el linfoma de Hodgkin

En el grupo estudiado, mediante la aplicación de un abordaje integrado, incluyendo hibridización in situ (EBER-ISH), inmunomarcación y PCR, fue determinado que 50% de los LH y 20% de los controles no neoplásicos estuvieron asociados al EBV.

La técnica EBER-ISH es aceptada como '*gold estándar*' para la detección de la infección latente por el EBV. Fue la primera técnica en demostrar la presencia del EBV en las células H-RS (Wu et al., 1990) y su valor principal radica en su capacidad de localizar el virus dentro del núcleo de las células neoplásicas con alta sensibilidad, descartando resultados falsos-positivos debidos a la detección de genomas virales en células reactivas que infiltran el tejido neoplásico. En este estudio, esto se tornó evidente en un caso de LH (L29), positivo en la detección viral mediante las técnicas de PCR utilizadas, sin embargo, el método de ISH determinó la presencia de los ARNs EBERs en los linfocitos reactivos y no en las células tumorales H-RS. Otra ventaja de la técnica es que permite trabajar en material parafinado, permitiendo estudios retrospectivos.

En relación a los métodos moleculares, fueron desarrolladas dos técnicas para la detección del EBV, utilizando blancos moleculares distintos (*EBER* y *BamHW*). Un abordaje rápido y seguro permitió obtener y confirmar los resultados en simultáneo, garantizando mínimos riesgos de contaminación cruzada. La técnica fue realizada en

una sola etapa y con sensibilidades diferentes. Con la excepción del caso mencionado (L29), hubo una concordancia general entre los métodos utilizados para el diagnóstico de asociación entre el EBV y el LH.

El método de IHQ fue utilizado para inmunolocalizar la proteína LMP1 en la membrana plasmática de las células tumorales. Esto tuvo el doble objetivo de confirmar el diagnóstico y de asegurar que, en el análisis de las posibles implicaciones patogénicas de los polimorfismos del gen LMP1, estaríamos partiendo de la base de que la proteína esta siendo expresada por la célula, y por lo tanto, potencialmente sujeta a selección. En este mismo sentido, la expresión de LMP1 fue confirmada a nivel de ARNm en algunos casos, de esta manera, todos los casos estudiados a nivel molecular fueron también caracterizados en relación a la expresión del gen.

El LH es una enfermedad compleja, tanto desde el punto de vista de la presentación anátomo-patológica, como de los padrones epidemiológicos en las diferentes regiones geográficas. La heterogeneidad epidemiológica incluye diferentes picos de incidencia por edad, prevalencia de los subtipos histológicos CM o EN y asociación con el EBV. Tres patrones han sido descritos, relacionados a situaciones socio-económicas diferentes (Harris, 1998) En el patrón I, observado en países subdesarrollados, el LH muestra un pico de incidencia en la infancia temprana, y el subtipo predominante es la CM. El patrón II, observado en países en vías de desarrollo, es definido por un pico en la infancia y un segundo pico en la segunda década de vida, con frecuencias similares de los subtipos CM y EN; y el patrón III, en países industrializados, donde el LH muestra un patrón de distribución bimodal con un pico de asociación en adultos jóvenes (tercera década) y otro en adultos mayores a los 50 años, con predominio del subtipo EN. En estas regiones, raramente se observan casos con LH en la niñez (Thomas, Re, and Zander, 2002). En el grupo aquí estudiado, correspondiente a la

región sudeste de Brasil, fue verificado un pico menor, más significativo de LH en la infancia, mientras que el mayor pico de frecuencia fue verificado en los adultos jóvenes (16-39 años, 55%), siendo la clase de edad de 21 a 25 años fue la más frecuente (14%). En relación a los subtipos histológicos, el subtipo EN estuvo más representado en el grupo entero, tanto en niños (58%) como en adultos (66%). Sin embargo, la distribución de subtipos histológicos estuvo significativamente asociada a la edad, observándose una mayor frecuencia de CM en los niños (42%) y en los adultos mayores de 55 años (45%), a la vez que un exceso de EN (74%) en los adultos jóvenes, en relación a los valores esperados ($p = 0,03$). La situación observada en el grupo de estudio parece coincidir con otro estudio realizado con pacientes de Río de Janeiro (Loureriro, Morais, and Milito, 2004), así como, cuanto a la frecuencia de subtipos en la infancia y adolescencia, con un estudio reciente realizado en nuestro laboratorio, incluyendo 65 pacientes con LH (Barros, 2007) [(Chabay et al., 2007) Aceptado]. En términos generales, podría compararse con un patrón intermedio entre II y III, de acuerdo a lo descrito por (Harris, 1998). Otro estudio en el nordeste de Brasil obtuvo resultados totalmente diferentes, con mayoría de niños de baja edad, y predominio del subtipo CM (patrón I). Por otra parte, en un estudio realizado en Argentina fue observado un patrón de tipo II, con el subtipo CM distribuido principalmente en el LH infantil y EN en los adultos jóvenes (De Matteo, Vijnovich, and Chabay, 2003). Esto pone de manifiesto la diversidad de situaciones epidemiológicas en el continente sudamericano, así como la necesidad de estudios que permitan conocer los factores involucrados en esta diversidad.

Por otra parte, el hecho de que han sido descritas excepciones a los patrones epidemiológicos establecidos, especialmente en LH pediátricos, describiendo una predominancia del subtipo EN en países en vías de desarrollo (ej: Kenya, Costa Rica)

o viceversa, CM en países del primer mundo (ej: Francia y Japón) (Brousset, Rochoaix, and Chittal, 1993; Kusuda, Toriyama, and Kamidigo, 1998), indica la necesidad de refinar las categorías epidemiológicas actualmente consideradas.

Este trabajo presenta limitaciones en relación al número de casos estudiados y al muestreo, que no fue en todos los casos secuencial, ya que algunos linfomas diagnosticados en el INCA no fueron enviados para estudio molecular. Por esto, y por tratarse de un grupo diagnosticado solamente en un centro, no es posible elaborar conclusiones epidemiológicas. Sin embargo, la descripción y comparación de nuestro grupo de estudio con otros de similar naturaleza, podría contribuir al conocimiento de esta enfermedad en la región geográfica estudiada.

En relación a la asociación con el EBV por clase de edad, Armstrong et al. (1998) propuso un modelo sugiriendo que el LH comprendía tres entidades distintas: LH en niños (EBV positivos, con predominio del subtipo CM), LH en adultos jóvenes (EBV negativo, con predominio del subtipo EN) y LH en adultos de mayor edad (EBV positivos subtipo CM).

En este trabajo, el EBV fue más frecuente en el subtipo EN (63%), coincidente con la alta frecuencia de este subtipo. Sin embargo, cuando analizados los subtipos por separado, se observó una asociación predominante del EBV con el LH CM, ya que 69% de estos casos fueron EBV+ versus 48% de EN. Esto está de acuerdo con lo publicado previamente, inclusive en un grupo exclusivamente pediátrico de esta región, en que el subtipo EN es predominante, sin embargo, el EBV se encuentra asociado al LH CM (Barros, 2007) [(Chabay et al., 2007) Aceptado]. En concordancia con Armstrong et al, los resultados de este trabajo muestran un mayor número de casos infectados por el EBV en el subtipo CM en niños y adultos >55 años. En general, aunque la comparación no fue estadísticamente significativa, los resultados

sugieren que, en esta región, la asociación del EBV con el subtipo histológico del LH está influenciada por la edad.

Variabilidad molecular del EBV en la región sudeste de Brasil

En esta parte del estudio, fueron utilizados métodos moleculares basados en PCR y secuenciamento de ADN, para analizar la frecuencia y tipo de marcadores polimórficos con posible influencia biológica, en aislamientos de EBV derivados de células tumorales y de CNN.

La presencia de variantes virales con diferencias en la capacidad oncogénica es una de las características principales de los cánceres asociados a virus (Fielding et al., 2001). En los cánceres asociados a EBV, la búsqueda de marcadores oncogénicos es un objetivo vigente, dificultado por la gran complejidad del virus, así como por sus múltiples interacciones con el entorno celular y extracelular (Crawford, 2001).

El EBV presenta regiones con alto grado de variabilidad molecular, que coinciden con los principales genes de latencia: EBNA1, 2, 3 y LMP1 (McGeoch and Gatherer, 2007). Divergencias en las secuencias de los genes EBNA2 y 3 determinan la existencia de dos tipos virales, EBV-1 y EBV-2 (Sample et al., 1990). Entre los genes del EBV, *LMP1* es el que presenta mayor la variabilidad genética, que puede ser clasificada en hasta 7 cepas o variantes biológicas diferentes.

Los tipos EBV-1 y EBV-2, presentan diferencias en sus capacidades transformantes, siendo el tipo 2 el de menor poder de transformación, tanto *in vitro* como *in vivo* (Rickinson and Kieff, 2001). Esto explicaría la mayor prevalencia del EBV-2 en inmunodeficiencias congénitas o adquiridas (Hsu and Glaser, 2000), así como en poblaciones normales con grados variables de inmunosupresión debido a factores sanitarios y/o socio-económicos desfavorables, como en el caso del África ecuatorial (Thé, 1995) (Hsu and Glaser, 2000). Sin embargo, esta variación de secuencia y poder

transformador no parecen reflejarse en una mayor capacidad oncogénica del EBV-1, y un gran número de estudios muestra que las frecuencias de estos tipos virales en los tumores asociados al EBV reflejan, en términos generales, sus frecuencias en las poblaciones sanas de la misma región geográfica.

De acuerdo con esto, las frecuencias de los tipos EBV-1 y 2 no fueron diferentes en los casos de LH y CNN analizados en este trabajo. El tipo viral EBV-1 fue el más frecuente en ambas condiciones, representado por un 86% y 82% en LH y CNN respectivamente. Un estudio con mayor número de portadores sanos realizado en Argentina muestra que la frecuencia del EBV-1 en esta población es de aproximadamente 80% (Correa et al., 2004)

El gen *LMP1*, que codifica la principal oncoproteína viral, es activamente expresado en las células tumorales de la mayoría de las neoplasias asociadas al EBV, con excepción del linfoma de Burkitt, que presenta una latencia viral restringida. Debido a su papel biológico y a la alta heterogeneidad de secuencias, mucha atención ha sido dirigida a la búsqueda de variaciones de secuencias tumor-específicas dentro de este gen. En este trabajo, la caracterización de las variantes moleculares del gen *LMP1* fue basada en el análisis de tres regiones génicas: región promotora (nt -217 a +1), región N-ter (nt 1 a 137) y región C-ter (aa 232 a 370).

La región C-ter fue la más variable del gen. Dos metodologías fueron optimizadas y aplicadas con el objetivo de detectar la variante del30 presente en el tercer exón del gen *LMP1*, con resultados altamente concordantes. Esta delección se encontró asociada tanto al EBV-1 como al EBV-2, no mostrando, por tanto, ligamiento con las variantes de tipo EBV analizadas. Todos los casos infectados por el EBV-2 presentaron la variante del30, aunque el escaso número de casos infectados por el tipo 2 impidió clarificar la existencia de asociación preferencial.

Región C-ter de LMP1: variabilidad estructural y de secuencias

Los aislamientos de EBV provenientes de material tumoral analizados en este estudio presentaron una alta frecuencia de la variante del30 (57%), cuando comparados a lo descrito para Europa (20%) (Khanim et al., 1996; Sandvej et al., 1997). Un estudio previo de la variante del30 en el LH brasileño mostró también una alta frecuencia, aunque fue estudiado un número menor de casos (Hayashi et al., 1997). En Argentina, Chabay et al. (2004) describieron una frecuencia alta de esta variante en tumores no-Hodgkin, LH y CNF pediátricos, mientras que un estudio de portadores sanos, también en Argentina, mostró una baja frecuencia de variante del30 (Correa et al., 2004).

En nuestro trabajo, la comparación de condición neoplásica vs. no neoplásica, mostró una frecuencia mayor de variantes del30 en los LH (57%) que en CNN (27%) ($p = 0,15$). Esta asociación no obtuvo significación estadística muy probablemente debido al bajo número de casos, ya que un análisis conjunto de nuestro casos y los del el Laboratorio de Biología Molecular del Hospital de Niños “Ricardo Gutierrez”, Buenos Aires, permitió confirmar esta tendencia, con alta significación estadística [(Guiretti et al., 2007) Aceptado].

En la literatura, esta asociación es considerada evidencia de un papel del EBV en la patogénesis del LH. Knecht et al. (1993), en su trabajo original, sugirieron que aislamientos de EBV portando la variante del30, estarían preferencialmente asociados al desarrollo del LH en casos europeos, lo cual ha sido confirmado en trabajos mas recientes (Khanim et al., 1996; Knecht et al., 1995).

En este trabajo, aunque la presencia de la variante del30 mostró mayor relación con la condición maligna, no se encontró ninguna asociación entre el subtipo histológico de

LH y la presencia de la variante del30, confirmando otros trabajos previos (Hayashi et al., 1997).

Adicionalmente, un alto número de unidades repetitivas de 33 pb fue característico de la variante del30-LMP1 tanto en los LH como en los CNN. La asociación entre el número de repeticiones y la presencia de la variante del30 mostró que 94% de los LH que presentaban variante del30 mostraban también un número mayor de repeticiones (5 a 7), mientras que un número menor de repeticiones (3 a 4,5) estuvo más asociada al alelo salvaje (72%).

Estudios previos han dedicado atención a las repeticiones de 33 pb en la región C-ter del gen *LMP1*, sin encontrar asociaciones significativas entre el número de repeticiones de 33 pb y otras características moleculares de los aislamientos de EBV (Khanim et al., 1996; Sandvej et al., 1997). Estos datos fueron obtenidos a partir de diversas regiones geográficas y situaciones clínicas, por lo que no es claro si la asociación entre el alto número de repeticiones de 33 pb y la variante del30 es también observada en linfomas expresando LMP1, en otras regiones con alta prevalencia de variantes del30, o si, alternativamente, representa un “ordenamiento” genómico local establecido en la región sudeste de Brasil.

Tres tipos de mecanismos genéticos contribuyen a la variabilidad del gen *LMP1*, (i) mutación puntual, (ii) deleción y duplicación, y (iii) recombinación homóloga intra/intercepa (Walling, Shebib, and Weaver, 1999):

i) las mutaciones puntuales son responsables por la mayoría de la variabilidad de secuencia nucleotídica de las variantes o cepas del EBV y pueden ocurrir *de novo* durante la replicación viral productiva. Además, una presión de selección, positiva o negativa, asociada a un ambiente determinado puede ser responsable de las

frecuencias relativas de variantes moleculares LMP1 en las diferentes regiones geográficas.

ii) la región comprendida entre los aa 343-352 de la proteína LMP1 puede sufrir delección o duplicación por recombinación intra- o intercepas o variantes, debido a un mal alineamiento de las repeticiones directas de 9 nucleótidos localizadas en las extremidades de esta región durante la replicación del EBV (Sandvej, Gratama, and Munch, 1997).

iii) recombinantes intracepa o variante pueden surgir por recombinación homóloga en la región repetitiva *LMP1*, en tanto que recombinantes inter-cepa pueden ocurrir durante la coinfección y replicación productiva del EBV, y pueden persistir en la población humana como nuevas variantes EBV (McGeoch, 2001; Walling, Shebib, and Weaver, 1999).

En los aislamientos de EBV estudiados, las variantes del30 de la región C-ter presentaron características particulares: Un número significativamente mayor de unidades repetitivas de 33 pb y la presencia de la ins15 codificando para el motivo de señalización JAK3, fue más frecuentemente observado en la región repetitiva de las variantes del30.

Las repeticiones de 33 pb son, reconocidamente, una región inestable, que pueden recombinar llevando a la generación de variantes intracepa con números diferentes de repeticiones (Walling, Shebib, and Weaver, 1999). Estas características pueden ser tomadas como evidencia de una intensa actividad de recombinación en la región C-ter LMP1, de acuerdo con lo descrito anteriormente para esta secuencia (Walling, Shebib, and Weaver, 1999)

La inserción de 15 pb es característicamente encontrada en la tercera unidad repetitiva de 33 pb del prototipo salvaje B95.8 y variantes asociadas (Miller et al., 1994; Walling, Shebib, and Weaver, 1999), y exceptuando estas variantes, únicamente fue descrita en casos de leucoplaquia oral, en escasos recombinantes entre las mencionadas cepas parentales (Walling, Shebib, and Weaver, 1999). Así, la presencia de una ins15 codificando para un motivo JAK3 en secuencias no asociadas a B95.8 puede ser atribuido a eventos de recombinación homóloga inter-cepa. No obstante, aunque un evento de recombinación recurrente no pueda ser excluido, su asociación significativa con la variante del30 puede ser mejor interpretada como resultado de la selección positiva de estos recombinantes, en base a las características de señalización de estas secuencias en el gen *LMPI*, quizás asociadas a un *loop* autoregulatorio positivo JAK-STAT, descrito en células EBV+ en latencia II (Chen, Lee, and Zong, 2001; Goormachtigh, Ouk, and Mougel, 2006). En este contexto, si los diferentes patrones de secuencia están asociados a diferencias funcionales en la proteína, patrones presentando un mayor *fitness* serían seleccionados positivamente y afectarían de manera relevante el *loop* autoregulatorio JAK-STAT mencionado anteriormente.

En relación a la dinámica molecular de las variantes EBV, los modelos descriptos parecen insuficientes para interpretar los aislados EBV de LH, dado que la mayoría de los mecanismos fueron descriptos en hospedadores inmunocomprometidos, donde la co-infección con múltiples cepas y tipos de EBV es frecuentemente observada. Además, en estos casos, la replicación productiva del EBV posibilita el origen de variación genética y disminuye la inmunovigilancia del hospedador, lo que permite, una selección basada en características de replicación del EBV, y no en sus propiedades funcionales (Berger et al., 1999; Walling, Shebib, and Weaver, 1999).

En el LH, sin embargo, las células están infectadas latentemente por el EBV (Rickinson and Kieff, 2001), requiriendo, por tanto, un cuerpo de hipótesis diferentes. En esta línea, evidencias recientes sugieren un rol de las células tumorales en el origen y selección de variantes del30. Un estudio de células H-RS individuales en casos de LH asociados a HIV, (Guidoboni, Ponzoni, and Caggiari, 2005), permitió determinar que las variantes del30 eran selectivamente localizadas en las células H-RS, y aún en los pacientes LH-HIV+ infectados por múltiples variantes de EBV, la variante preferencialmente acumulada dentro de las células tumorales fue la que presentaba la variante del30 sugiriendo que: (i) la deleción podría surgir *in vivo* dentro del hospedador/microambiente tumoral como consecuencia de la dinámica molecular viral, y (ii) linajes virales con la variante del30 podrían sufrir selección positiva en el proceso linfomagénico. En este estudio, el análisis molecular puso en evidencia que variantes delecionadas/wt en el mismo tumor presentaban identidad genética, siendo diferentes solamente en la presencia de la deleción, lo que llevó a la propuesta hipótesis de una derivación de la variante del30 a partir del gen salvaje *LMP1* en casos co-infectados wt/del30. No obstante, el origen y mecanismos moleculares, así como el significado biológico de estas observaciones, son aún controvertidos.

Teniendo en cuenta la asociación estadísticamente significativa entre la variante del30-LMP1 y el alto número de repeticiones de 33 pb observado en los casos neoplásicos de este trabajo, es posible sugerir que las variantes del30 pueden ser, al menos en parte, originadas como una consecuencia de la inestabilidad genómica generada a partir de recombinación intracepa en regiones C-ter *LMP1*, y considerando la latencia estricta del EBV en el LH, es posible sugerir que este fenómeno sería independiente de la replicación productiva del virus.

Como sugerido previamente (Berger et al., 1999; Guidoboni, Ponzoni, and Caggiari, 2005), la generación de variantes *LMP1* delecionadas podría ser favorecida por procesos tales como hipermutación somática (HS) o cambio de clase de la cadena pesada de las inmunoglobulinas (Ig), que involucra rupturas de ADN doble-cadena y son mediadas por procesos de mutación y recombinación asociados a transcripción (TAM/R) (Aguilera, 2002). De hecho, al menos una fracción de los LH albergan mutaciones somáticas inactivantes (*crippling*), consideradas linfomagénicas, en los genes de Ig de las células H-RS (Kanzler et al., 1996). Es conocido que otros genes, activos transcripcionalmente en el estadio de centro germinal, son afectados por la HS (Pasqualucci et al., 2001); así, se podría especular que la variante del30 LMP1 puede ser originada en el microambiente tumoral por procesos TAM/R involucrados en los procesos madurativos de los genes de inmunoglobulina. En este contexto, la alta prevalencia de la variante del30 LMP1 observada en los pacientes con LH analizados, podría deberse a una combinación de producción aumentada de variantes del30 y una posible ventaja selectiva de variantes portando el ordenamiento “del30/ins15”.

De acuerdo con esto, Faumont et al. (2004), en un estudio de “célula única”, comparando cepas EBV en células H-RS y linfocitos B *bystander*, encontró que secuencias *LMP1* tumorales mostraron sitios polimórficos 4 veces más que las cepas de EBV infectando linfocitos B infiltrantes de linfonodos reactivos.

Análisis de mutaciones en la región C-ter

En el análisis de secuencias, la región C-ter-LMP1 mostró un espectro de mutaciones similar al descrito para otras localizaciones geográficas; sin embargo, ninguno de los actuales esquemas de clasificación pudo ser completamente aplicado (Sandvej, Gratama, and Munch, 1997); (Edwards, Seillier-Moiseiwitsch, and Raab-Traub, 1999); (Walling, Shebib, and Weaver, 1999).

El patrón de mutaciones puntuales observado en los aislados de la región sudeste de Brasil podría reflejar un efecto fundador, el efecto de una presión de selección local o ambas. En este sentido, es notable la carencia de representación de aislados EBV de secuencias relacionadas a variantes de alelo salvaje pertenecientes al grupo D europeo, la variante delecionada CAO del sur asiático (Sandvej, Gratama, and Munch, 1997) o los patrones 7-9 (Walling, Shebib, and Weaver, 1999), tanto en los linfomas como en los CNN. En relación a esto, la descripción de variantes de LMP1 en localizaciones geográficas diversas puede aportar pistas en relación a la evolución y distribución de estas variantes. Burrows et al, determinaron, a partir de análisis filogenético del gen LMP1, que el EBV del sudeste asiático evolucionó como un linaje diferente que el EBV de Papúa-Nueva Guinea, Australia y África (Burrows et al., 2004). Un estudio reciente realizado en el Japón, con varias patologías EBV+ encuentra una similitud importante entre las variantes detectadas en Japón y las variantes Chinas, así como una diferencia significativa, respaldada por el análisis filogenético, con las variantes de LMP1 africanas. Esto sugiere que, debido a la tasa rápida de cambio molecular, el gen LMP1 podría ser utilizado para estudiar la evolución del EBV en las diferentes poblaciones humanas y sus migraciones, así como marcadores de importancia epidemiológica. Este tópico será retomado abajo, en la discusión del análisis de las secuencias del promotor de LMP1.

Análisis molecular del promotor de LMP1

En contraste con la región C-ter, la región promotora del gen *LMP1* no ha sido estudiada tan intensamente, existiendo en la literatura solamente descripciones del promotor del prototipo B95.8, de LH y controles normales europeos (Sandvej et al., 2000; Sandvej, Gratama, and Munch, 1997), de la variante CAO, originada en un

carcinoma nasofaríngeo del sudeste asiático, de la línea celular africana Raji (Hu et al., 1991) y de casos de LH y controles normales de China (Zhou et al., 2001). Estos estudios documentaron la existencia de heterogeneidad molecular en el promotor del gen *LMPI*, así como algunas características de significado patogénico potencial. El estudio de las secuencias de promotores es relevante en dos sentidos: por un lado, ofrecen informaciones sobre características capaces de afectar los niveles de expresión génica (Sjoblom, Weiwen, and Palmqvist, 1998). Por otro, las secuencias regulatorias son sometidas a procesos selectivos diferentes de las secuencias codificantes, y así, pueden presentar ritmos de evolución molecular diferentes (heterotaquia), aún dentro de un mismo linaje filogenético o de genomas particulares, pudiendo, por ésto, brindar informaciones diferentes en relación a las secuencias codificantes (Taylor et al., 2006).

Por este motivo, este trabajo también se focalizó en la búsqueda de patrones promotor-específicos que puedan resultar relevantes en la transcripción de este importante oncogen viral, así como servir de base para el desarrollo de marcadores epidemiológicos.

Estos promotores fueron caracterizados por presentar variabilidad, que pudo ser agrupada en patrones, denominados aquí como Grupos I, II y III. Como observado también en los grupos de aislamientos de EBV de las dos regiones geográficas estudiadas (Europa A y China CG3) (Sandvej et al., 2000; Sandvej, Gratama, and Munch, 1997; Zhou et al., 2001), hubo secuencias relacionadas al prototipo B95.8 (grupo I). Estas secuencias, no mutadas o con bajo número de cambios nucleotídicos, en su gran mayoría (aprox. 70%) mostraron correspondencia con una región C-ter salvaje, como descripto en la literatura, indicando la dispersión de esta cepa

tempranamente en la evolución viral. Este grupo representó 41% de las secuencias estudiadas, similar a lo observado entre los casos Europeos (aproximadamente 40%) (Sandvej, Gratama, and Munch, 1997).

Los grupos de promotores II y III presentaron una frecuencia mayor de mutaciones, representando 59% de los casos estudiados. Todos estos promotores se correspondieron con una región C-ter delecionada, discrepando de lo descrito en la literatura.

El grupo III fue el más representado en nuestros casos analizados; sorpresivamente estos casos compartieron un promotor similar a la variante africana Raji. La secuencia de esta variante fue publicada previamente (Hu et al., 1991; Sandvej, Gratama, and Munch, 1997) y fue confirmada a partir de un clon de la línea celular cultivada en nuestro laboratorio. Asimismo, una línea celular establecida localmente a partir de un LB (CEMO-3, (Stefanoff et al., 2003) resumen de congreso) mostró identidad con la variante Raji. Esta homología de un importante número de secuencias de EBV con una variante africana no fue previamente publicada, representando una contribución nueva de este trabajo al estudio de la variabilidad y evolución de las variantes moleculares del EBV.

El análisis filogenético preliminar de estas secuencias del promotor fue informativo, y de manera notoria, agrupó todas las secuencias de LH brasilero juntas, en proximidad con las variantes B95.8, Raji (C-ter salvaje) y C Europea (delecionada), separadas del grupo formado por las variantes asiáticas y D Europea. Los grupos definidos en función del análisis conjunto de las secuencias promotoras y C-ter fueron respaldados por el análisis filogenético, indicando la adecuación potencial de estas secuencias para estudios epidemiológicos.

Sin embargo, una disrupción topológica notoria es observada cuando comparados los agrupamientos generados a partir de las matrices de distancia de las secuencias del promotor y de la región C-ter de LMP1. Esto puede ser explicado por las características únicas observadas en las secuencias de LMP1 de esta región geográfica, en el sentido de que la mayoría de las secuencias del promotor es homóloga a la secuencia de la variante africana Raji, pero muestran una región C-ter deletada no típica de esta variante. La variante Raji se encuentra relacionada filogenéticamente con B95.8, presentando una región C-ter salvaje, así como la inserción de 15 pb en la región repetitiva (Walling, Shebib, and Weaver, 1999).

Es posible hipotetizar que esta variante haya sido generada por un fenómeno de recombinación, como parece haber ocurrido con relativa frecuencia en la evolución del EBV (McGeoch and Gatherer, 2007; Midgley et al., 2000). Esta recombinación puede haber ocurrido entre cepas ancestrales, una de las cuales sería similar a Raji, que podría haberse fijado por algún tipo de efecto fundador, después de la importante migración de individuos africanos al continente americano en el siglo XVI.

Esta hipótesis podría ser verificada de varias maneras. Primero, por el estudio de secuencias del gen entero de las nuevas variantes, a fin de identificar, mediante la aplicación de métodos bioinformáticos adecuados, las regiones moleculares potencialmente involucradas en el evento de recombinación. Por otra parte, el estudio de nuevas secuencias, incluyendo controles no neoplásicos, aislamientos obtenidos a partir de otras neoplasias portando el EBV con diferentes latencias y, de ser posible, aislamientos de EBV de origen africano, (principalmente de EBV en latencia II, LMP1+), cuya variabilidad es pobremente conocida debido fundamentalmente a la falta de infraestructura de investigación en los países africanos. Si, como sugerido por otros estudios (Burrows et al., 2004) (Kanai et al., 2007) y por nuestros propios

resultados, las secuencias de LMP1 fueran adecuadas para el estudio de la co-evolución ser humano/EBV, el estudio específico del promotor de este gen podría adicionar información significativa al respecto.

Independientemente de su origen, la extensión de la distribución de estas variantes podría deberse a la adquisición de ventajas adaptativas favorecidas por el/los eventos de recombinación intra/intercepta entre el promotor y la región C-ter de variantes LMP1 diferentes, lo que permitiría a éstos recombinantes persistir y perpetuarse en esta región, adaptándose favorablemente al ambiente tumoral de la célula H-RS.

Una limitación importante de estas conclusiones es la falta de secuencias de aislamientos de EBV en portadores sanos, lo que impide trazar hipótesis referidas al papel patogénico de las variantes descritas. Estas secuencias no pudieron ser obtenidas, a pesar de sucesivos intentos, probablemente debido a la baja carga viral en estas muestras, sumada a la dificultad de amplificar estas secuencias con alto contenido CG. Estrategias metodológicas adicionales están siendo implementadas para solucionar esta dificultad.

El promotor de *LMP1* contiene diversos sitios de reconocimiento de factores de transcripción, involucrados en la regulación dependiente e independiente de EBNA2 (Chen et al., 2001). Entre ellos, un sitio de reconocimiento de factores activadores de la transcripción y de unión a elementos de respuesta a cAMP (ATF/CREB), ubicado en -45 a -38 (relativo al sitio de iniciación de la transcripción) parece ser uno de los factores limitantes que determina el grado de actividad final del promotor *LMP1* (Sjoblom, Weiwen, and Palmqvist, 1998) siendo considerado como uno de los principales elementos reguladores de la transcripción de LMP1, inducida tanto por EBNA2 como por señales extracelulares. Mutaciones localizadas en este motivo

(GA→ CT; -44 y -45, de acuerdo con el sitio de comienzo de la transcripción) fueron relacionadas con menor eficiencia en la inducción de la transcripción de este gen, caracterizando “promotores débiles” (Sandvej et al., 2000). La importancia funcional de estas mutaciones es desconocida, no obstante, en las secuencias promotoras de las variantes D y CAO se observó una reducción de hasta nueve veces en la actividad promotora (Chen et al., 2001) (Sjoblom et al., 1998). En relación a esto, un estudio de variantes del promotor de LMP1 en aislamientos de LH europeos, mostró una sub-representación de la variante D en los casos tumorales cuando comparado con los portadores sanos, sugiriendo que promotores débiles serían seleccionados negativamente, justificando su baja frecuencia en los casos (Sandvej et al, 2000).

En este estudio, 10/17 promotores (59%) de casos tumorales, incluyendo todas las secuencias de los grupos II y III, presentaron mutaciones en el sitio de reconocimiento ATF/CREB. Estas mutaciones fueron diferentes de las descritas para D/CAO en los 8 casos del grupo III, y solamente los dos casos del grupo II mostraron mutaciones similares a D/CAO. Sin embargo, parece poco probable que las mutaciones fijadas en Raji y en las variantes estudiadas en este trabajo no ocasionen una disminución en la actividad del promotor, como relatado para D/CAO. De cualquier manera, nuestros hallazgos moleculares no apoyan la hipótesis de una selección negativa de promotores mutados en ATF/CREB. También en contra de esta hipótesis se encuentran los patrones de secuencias del promotor descritas en aislamientos de LH de China, variantes CG1 y CG2, presentando mutaciones similares a D/CAO (Zhou et al., 2001).

En nuestro estudio, las secuencias del grupo II fueron representadas en baja frecuencia y solamente a través del análisis de secuencias del promotor de controles no neoplásicos podremos definir si esta baja frecuencia representa un efecto de selección

negativa en los casos tumorales o, alternativamente, esta variante se encuentra poco representada en nuestra región geográfica.

En relación a otros polimorfismos analizados, la pérdida y/o retención del sitio *XhoI*, no demostró asociación significativa con el tipo viral 1 o 2, la presencia de la variante del30 o el número de repeticiones del gen *LMP1*. Resultados similares fueron descritos por (Miller et al., 1994). De la misma manera, aislados EBV europeos no mostraron asociación entre ambos polimorfismos, *XhoI* /del30 (Khanim F, 1996) Esto indica que este polimorfismo, descrito e investigado inicialmente como marcador de fenotipo oncogénico, debido a su asociación con las variantes relacionadas con CAO de carcinoma nasofaríngeo en el sudeste asiático, no es útil como marcador epidemiológico en otras localizaciones geográficas, ya que, como verificado por nuestro estudio y por otros (Sandvej et al., 2000), la variante CAO es altamente restringida desde el punto de vista geográfico. Además, tanto la variante D como las variantes mutadas descritas en este trabajo (Grupos II y III) no presentaron un patrón recurrente de mutaciones en el sitio *XhoI*. Nuevos marcadores para ser detectados por RFLP-PCR podrían ser desarrollados a partir de las secuencias características de esta región, a fin de identificar secuencias patrón-específicas para estudios epidemiológicos a mayor escala, donde la secuenciación es un factor limitante.

Este estudio permitió comparar la variabilidad molecular presente en el gen *LMP1* en casos de LH EBV+ de la región sudeste de Brasil con las variantes LMP1 ya descritas en otras regiones del mundo, siendo esta es la primera descripción de promotores del gen *LMP1* en EBV circulantes de Sudamérica.

Las nuevas variantes moleculares identificadas podrían ser útiles como marcadores epidemiológicos. No obstante, son necesarios estudios futuros, que incluyan un mayor número de secuencias y también controles no neoplásicos, para dilucidar el significado etiopatogénico de estos hallazgos moleculares, así como las diferencias en la actividad biológica y potencial oncogénico de las variantes LMP1 descritas.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Armstrong, A., F E Alexander, F., Cartwright, R., Angus, B., Krajewski, A., Wright, D., Brown, I., Lee, F., Kane, E., and Jarrett, R. (1998). Lymphomas Epstein-Barr virus and Hodgkin's disease: further evidence for the three disease hypothesis. *Leukemia* **12**(8), 1272-1276.
- Barros, M. (2007). "Tesina de Graduação: Linfoma de Hodgkin na Infância e Adolescência: Um estudo das características Histológicas, Clínicas, Epidemiológicas e de Associação com o Vírus Epstein-Barr. Pós-graduação em oncologia. Instituto Nacional de Câncer (INCa-CAPES)."
- Berger, C., van Baarle, D., Kersten, M., Klein, M., Al-Homsi, A., Dunn, B., McQuain, C., van Oers, R., and Knecht, H. (1999). Carboxy terminal variants of Epstein-Barr virus-encoded latent membrane protein 1 during long-term human immunodeficiency virus infection: reliable markers for individual strain identification. *J Infect Dis* . **179**, 240-244.
- Blake, S., Eliopoulos, A., and Dawson, C. (2001). The transmembrane domains of the EBV-encoded latent membrane protein 1 (LMP1) variant CAO regulate enhanced signalling activity. *Virology* **282**, 278-87.
- Bowman, T., Garcia, R., and Turkson, J. (2000). STATs in oncogenesis. *Oncogene* **19**, 2474-2400.
- Brauninger, A., Schmitz, R., and Bechtel, D. (2006). Molecular Biology of Hodgkin's and Reed/Sternberg Cells in Hodgkin's Lymphoma. *Int J Cancer* **118**, 1853-61.
- Brooks, J. M., Croom-Carter, D. S. G., Leese, A. M., Tierney, R. J., Habeshaw, G., and Rickinson, A. B. (2000). Cytotoxic T-Lymphocyte Responses to a Polymorphic Epstein-Barr Virus Epitope Identify Healthy Carriers with Coresident Viral Strains
10.1128/JVI.74.4.1801-1809.2000. *J. Virol.* **74**(4), 1801-1809.
- Brousset, P., Rochaix, P., and Chittal, S. (1993). High incidence of Epstein-Barr Virus detection in the Hodgkin's disease and absence of detection in Anaplastic Large-Cell Lymphoma in Children. *Histopathology* **23**, 189-191.
- Buisson, M., Morand, P., Genoulaz, O., Bourgeat, M.-J., Micoud, M., and Seigneurin, J.-M. (1994). Changes in the dominant Epstein-Barr virus type during human immunodeficiency virus infection. *J Gen Virol* **75**(2), 431-437.
- Burrows, J. M., Bromham, L., Woolfit, M., Piganeau, G., Tellam, J., Connolly, G., Webb, N., Poulsen, L., Cooper, L., Burrows, S. R., Moss, D. J., Haryana, S. M., Ng, M., Nicholls, J. M., and Khanna, R. (2004). Selection Pressure-Driven Evolution of the Epstein-Barr Virus-Encoded Oncogene LMP1 in Virus Isolates from Southeast Asia
10.1128/JVI.78.13.7131-7137.2004. *J. Virol.* **78**(13), 7131-7137.
- Chabay, P., De Matteo, E., Aversa, L., Maglio, S., Grinstein, S., and Preciado, M. (2002). Assessment of Epstein-Barr virus association with pediatric non-hodgkin lymphoma in immunocompetent and in immunocompromised patients in Argentina. *Arch Pathol Lab Med.* **126**(3), 331-5.
- Chabay, P., De Matteo, E. N., Merediz, A., and Preciado, M. V. (2004). High Frequency of Epstein Barr virus Latent Membrane Protein-1 30 bp Deletion in a Series of Pediatric Malignancies in Argentina. *Arch Virol.* **149**, 1515-26.
- Chabay, P. A., Barros, M., Hassan, R., De Matteo, M. D., Zalberg, I., Rey, G., Carrico, M., and Preciado, M. V. (2007). Pediatric Hodgkin Lymphoma in two South American series: a distinctive epidemiological pattern and lack of

- association of Epstein-Barr virus with clinical outcome. *J of Pediatric Haematology and Oncology*.
- Chaganti, S., Bell, A. I., Pastor, N. B., Milner, A. E., Drayson, M., Gordon, J., and Rickinson, A. B. (2005). Epstein-Barr virus infection in vitro can rescue germinal center B cells with inactivated immunoglobulin genes
10.1182/blood-2005-06-2327. *Blood* **106**(13), 4249-4252.
- Chapman, A., and Rickinson, A. (1998). Epstein-Barr virus in Hodgkin's disease. *Annals of Oncology* **9**(0), 5-16.
- Chen, H., Lee, J. M., Zong, Y., Borowitz, M., Ng, M. H., Ambinder, R. F., and Hayward, S. D. (2001). Linkage between STAT Regulation and Epstein-Barr Virus Gene Expression in Tumors. *J. Virol.* **75**(6), 2929-2937.
- Chen, M., Tsai, C., Liang, C., Shu, C., Huang, C., Sulitzeanu, D., Liu, S., and Chang, Y. (1992). Cloning and characterization of the latent membrane protein (LMP) of a specific Epstein-Barr virus variant derived from the nasopharyngeal carcinoma in the Taiwanese population. *Oncogene* **7**(11), 2131-40.
- Chen, W., Chen, Y., Bacchi, M., Bacchi, C., Alvarenga, M., and Weiss, L. (1996). Genotyping of Epstein-Barr virus in Brazilian Burkitt's lymphoma and reactive lymphoid tissue. Type A with a high prevalence of deletions within the latent membrane protein gene. *Am J Pathol.* **148**, 17-23.
- Correa, M., Fellner, D., Alonio, L., Durand, K., Teyssie, A., and Picconi, M. (2004). Epstein-barr virus (EBV) in healthy carriers: Distribution of genotypes and 30 bp deletion in latent membrane protein-1 (LMP-1) oncogene. *J Med Virol* **73**, 583-588.
- Crawford, D. (2001). Biology and disease associations of Epstein-Barr virus. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* **29**(356), 461-73.
- Dalla-Favera, R., and Gaidano, G. (2005). "Molecular pathogenesis of T-cell non-Hodgkin's lymphomas." 7 ed. *Cancer, Principles and Practice of Oncology* (V. T. J. DeVita, H. S., and R. S. A., Eds.) Philadelphia: Lippicott Williams & Wilkins.
- Dambaugh, T., Hennessy, K., Chamnankit, L., and Kieff, E. (1984). U2 Region of Epstein-Barr Virus DNA May Encode Epstein-Barr Nuclear Antigen 2
10.1073/pnas.81.23.7632. *PNAS* **81**(23), 7632-7636.
- De Matteo, E., Vijnovich, A., and Chabay, P. (2003). Comparasion of Epstein Barr Virus presence in Hodgking Lymphoma in Pediatric versus Adult Argentine Patients. *Arch Pathol Lab Med.* **127**, 1325-1329.
- Dirnhofer, S., Angeles-Angeles, A., and Ortiz-Hidalgo, C. (1999). High prevalence of a 30-basepairs deletion in the Epstein-Barr virus (EBV) latent membrane protein 1 gene ando f strain type B EBV in Mexican classical Hodgkin's disease and reactive lymphoid tissue. *Hum Pathol*, **30**, 781-787.
- Edwards, R., Seillier-Moiseiwitsch, F., and Raab-Traub, N. (1999). Signature amino acid changes in latent membrane protein 1 distinguish Epstein-Barr virus strains. *Virology* **261**: 75-79 **261**.
- Ekstrom-Smedby, K. (2006). Epidemiology and etiology of non-Hodgkin lymphoma -a review. *Acta Oncol* **45**, 258-71.
- Eliopoulos, A., and Young, L. (2001). LMP1 structure and signal transduction. *Semin Cancer Biol.* **11**(6), 435-44.
- Epstein, M. A., Achong, B. G., and Barr, Y. M. (1964). Virus Particles in cultured lymphoblasts from Burkitt's Lymphoma. *Lancet* **28**(15), 702-3.

- Fielding, C. A., Sandvej, K., Mehl, A., Brennan, P., Jones, M., and Rowe, M. (2001). Epstein-Barr Virus LMP-1 Natural Sequence Variants Differ in Their Potential To Activate Cellular Signaling Pathways. *J. Virol.* **75**(19), 9129-9141.
- Flavell, K., and Murray, P. (2000). Hodgkin's disease and Epstein-Barr virus. *J Clin Pathol: Mol Pathol.* **53**, 262-269.
- Glaser, S., Lin, R., Stewart, S., Ambinder, R., Jarrett, R., Brousset, P., Pallesen, G., Gulley, M., Khan, G., O'Grady, J., Hummel, M., Preciado, M., Knecht, H., Chan, J., and Claviez, A. (1997). Epstein-Barr virus-associated Hodgkin's disease: Epidemiologic characteristics in international data. *International Journal of Cancer* **70**(4), 375-382.
- Goormachtigh, G., Ouk, T., and Mougel, A. (2006). Autoactivation of the Epstein-Barr virus oncogenic protein LMP1 during type II latency through opposite roles of the NF-kappaB and JNK signaling pathways. *J Virol.* **80**, 7382-7393.
- Grasser, F., Murray, P., Kremmer, E., Klein, K., Remberger, K., Feiden, W., Reynolds, G., Niedobitek, G., Young, L., and Mueller-Lantzsch, N. (1994). Monoclonal antibodies directed against the Epstein-Barr virus-encoded nuclear antigen 1 (EBNA1): immunohistologic detection of EBNA1 in the malignant cells of Hodgkin's disease. *Blood* **84**(11), 3792-3798.
- Guidoboni, M., Ponzoni, M., and Caggiari, L. (2005). Latent Membrane Protein 1 Deletion Mutants Accumulate in Reed-sternberg Cells of Human Immunodeficiency Virus-related Hodgkin's Lymphoma. *J Virol.* **79**, 2643-9.
- Guiretti, D., Chabay, P., Valva, P., Stefanoff, C.G., Barros M.H.M., De Matteo, E., Zalberg Renault, I., Preciado, M.V. and Hassan, R. (2007). Structural variability of the carboxy-terminus of Epstein-Barr virus encoded latent membrane protein 1 gene in Hodgkin lymphomas. *J of Medical Virology.*
- Hall, T. A. (1999). BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl. Acids. Symp. Ser.* **41**, 95-98.
- Harris, N. (1998). The many faces of Hodgkin's disease around the world: what have we learned from its pathology? *Ann Oncol.* **9**, S45-S46.
- Harris, N. (1999). Hodgkin's lymphoma: classification, diagnosis and grading. *Semin Hematol.* **36**, 220-232.
- Hayashi, K., Chen, W., Chen, Y., Bacchi, M., Bacchi, C., Alvarenga, M., Abreu, E., Chang, K., and Weiss, L. (1997). Deletion of Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 gene in United States and Brazilian Hodgkin's disease and reactive lymphoid tissue: high frequency of a 30-bp deletion. *Hum Pathol* **28**, 1408-1414.
- Hsu, J., and Glaser, S. (2000). Epstein-barr virus-associated malignancies: epidemiologic patterns and etiologic implications. *Crit Rev Oncol Hematol.* **34**(1), 27-53.
- Hu, L., Zabarovsky, E., Chen, F., Cao, S., Ernberg, J., Klein, G., and Winberg, G. (1991). Isolation and sequencing of the Epstein-Barr virus BNLF-1 gene (LMP1) from a Chinese nasopharyngeal carcinoma. *J Gen Virol*, **72**, 2399-409.
- Hu, L.-F., Zabarovsky, E. R., Chen, F., Cao, S.-L., Ernberg, I., Klein, G., and Winberg, G. (1991). Isolation and sequencing of the Epstein-Barr virus BNLF-1 gene (LMP1) from a Chinese nasopharyngeal carcinoma. *J Gen Virol* **72**(10), 2399-2409.
- IARC (1997). Epstein-Barr Virus and Kaposi's Sarcoma / Human Herpesvirus 8. *Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans.*

- Jaffe, E., Harris, N., Stein, H., and Vardiman, J. (2001). Pathology and Genetics of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues (W. H. O. W. I. P. I. A. f. R. o. Cancer), Ed.), pp. 115-117.
- Jarrett, A., Armstrong, A., and Alexander, E. (1996). Epidemiology of EBV and Hodgkin's lymphoma. *Ann Oncol.* **7**(4), 5-10.
- Jarrett, R. F., Gallagher, A., Jones, D. B., Alexander, F. E., Krajewski, A. S., Kelsey, A., Adams, J., Angus, B., Gledhill, S., and Wright, D. H. (1991). Detection of Epstein-Barr virus genomes in Hodgkin's disease: relation to age. 10.1136/jcp.44.10.844. *J Clin Pathol* **44**(10), 844-848.
- Jiricny, J. (1996). Genetic Instability in Cancer. *Cancer Surveys* **28**, 47-68.
- Joseph, A. M., Babcock, G. J., and Thorley-Lawson, D. A. (2000). Cells Expressing the Epstein-Barr Virus Growth Program Are Present in and Restricted to the Naive B-Cell Subset of Healthy Tonsils 10.1128/JVI.74.21.9964-9971.2000. *J. Virol.* **74**(21), 9964-9971.
- Kanai, K., Satoh, Y., Saiki, Y., Ohtani, H., and Sairenji, T. (2007). Difference of Epstein-Barr virus isolates from Japanese patients and African Burkitt's lymphoma cell lines based on the sequence of latent membrane protein 1. *Virus genes* **34**, 55-61.
- Kanzler, H., Kuppers, R., Hansmann, M., and Rajewsky, K. (1996). Hodgkin and Reed-Sternberg cells in Hodgkin's disease represent the outgrowth of a dominant tumor clone derived from (crippled) germinal center B cells 10.1084/jem.184.4.1495. *J. Exp. Med.* **184**(4), 1495-1505.
- Khanim, F., Yao, Q., Niedobitek, G., Simritpal, S., Rickinson, A. B., and Young, L. S. (1996). Analysis of Epstein-Barr virus gene polymorphisms in normal donors and in virus-associated tumors from different geographic locations. *Blood* **88**, 3491-501.
- Khanim F, Y. Q., Niedobitek G. et al. (1996). Analysis of Epstein-Barr virus gene polymorphisms in normal donors and in virus-associated tumors from different geographic locations. *Blood* **88**, 3491-501.
- Kieff, E., and Rickinson, A. (2001). Epstein-Barr Virus and Its Replication. 4th ed. In "Fields virology" (D. Knipe, Ed.). Lippincott Williams & Wilkins.
- Klumb, C., Hassan, R., De Oliveira, D., De Resende, L., Carriço, M., De Almeida Dobbin, J., Pombo-De-Oliveira, M., Bacchi, C., and Ciuvalschi Maia, R. (2004). Geographic variation in Epstein-Barr virus-associated Burkitt's lymphoma in children from Brazil. *International Journal of Cancer* **108**(1), 66-70.
- Knecht, H., Berger, C., Rothenberger, S., Odermatt, B., and Brousset, P. (2001). The role of Epstein-Barr virus in neoplastic transformation. *Oncology* **60**, 239-302.
- Knecht, H., Martius, F., Bachmann, E., Hoffmann, T., Zimmerman, D., Rothenberger, S., Sandvej, K., Weqmann, W., Hurwitz, N., and Odermatt, B. (1995). A deletion mutant of the LMP1 oncogene of Epstein-Barr Virus is associated with the evolution of angioimmuno blastic lymphadenopathy into B immunoblastic lymphoma. *Leukemia* **3**, 458-65.
- Knecht. H, Bachmann, E., Brousset, P., Sandvej, K., Nadal, D., Bachmann, F., Odermatt, B., Delsol, G., and Pallesen, G. (1993). Deletions within the LMP1 oncogene of Epstein-Barr virus are clustered in Hodgkin's disease and identical to those observed in nasopharyngeal carcinoma. *Blood* **82**, 2937-2942.
- Kuppers, R. (2003). B cells under influence: transformation of B cells by Epstein-Barr virus. *Nat Rev Immunol.* **3**(10), 801-12.

- Kusuda, M., Toriyama, K., and Kamidigo, N. (1998). A comparison of epidemiologic, histologic and virologic studies on Hodgkin's disease in western Kenya and Nagasaki, Japan. *Am J Trop Med Hyg.* **59**, 801-807.
- Louneriro, M., Morais, J., and Milito, C. (2004). Expression of Epstein-Barr Virus patients with Hodgkin's disease: report of 64 cases from Rio de Janeiro, Brazil. *J Bras Patol Med Lab.* **40**, 37-40.
- Mainou, B., and Raab-Traub, N. (2006). LMP1 strain variants: biological and molecular properties. *J Virol* **80**, 6458-6468.
- Mancao, C., Altmann, M., and Jungnickel, B. (2005). Rescue of "crippled" germinal center B cells from apoptosis by Epstein-Barr virus. *Blood* **106**, 4339-4344.
- McGeoch, D. (2001). Molecular evolution of the gamma-Herpesvirinae. *Philos Trans. R. Soc. B Biol Sci.* **356**(1408), 421-435.
- McGeoch, D., and Gatherer, D. (2007). Lineage structures in the genome sequences of three Epstein-Barr virus strains. *Virology* **359**(1), 1-5.
- Midgley, R. S., Blake, W. N., Yao, Q. Y., Croom-Carter, D., Cheung, S. F., Leung, S. F., Chan, A. T. C., Johnson, P. J., Huang, D., Rickinson, A. B., and Lee, S. P. (2000). Novel Intertypic Recombinants of Epstein-Barr Virus in the Chinese Population. *J Virol.* **74**(3), 1544-1548.
- Miller, W., Edwards, R., Walling, D., and Raab-Traub, N. (1994a). Sequence variation in the Epstein-Barr virus latent membrane protein. *J Gen Virol* **75**, 2729-2740.
- Miller, W. E., Edwards, R. H., Walling, D. M., and Raab-Traub, N. (1994b). Sequence variation in the Epstein-Barr virus latent membrane protein 1. *J Gen Virol* **75**(10), 2729-2740.
- Murray, P., and Young, L. (2001). Epstein-Barr virus infection: basis of malignancy and potential for therapy. *Exp. Rev. Mol. Med.* <http://www.expertreviews.org/01003842h.htm>.
- Pasqualucci, L., Neumeister, P., Goossens, T., Nanjangud, G., Chaganti, R., Küppers, R., and Dalla-Favera, R. (2001). Hypermutation of multiple proto-oncogenes in B-cell diffuse large-cell lymphomas. *Nature* **412**, 341-346.
- Poppema, S. (2005). Immunobiology and Pathophysiology of Hodgkin Lymphomas 10.1182/asheducation-2005.1.231. *Hematology* **2005**(1), 231-238.
- Rickinson, A. B., and Kieff, E. N. (2001). Epstein-Barr virus. In "Fields virology" (B. Fields, P. Howley, D. Griffin, R. Lamb, M. Martin, B. Roizman, S. Straus, and D. Knipe, Eds.), pp. 2501. Lippincott Williams & Wilkins.
- Roizman, B., and Pellett, P. (2001). The Family Herpesviridae: A Brief Introduction. In "Fields virology" (D. Knipe, Ed.), pp. 2501.
- Saiki, R., Gelfand, D., Stoffel, S., Scharf, S., Higuchi, R., Horn, G., Mullis, K., and Erlich, H. (1988). Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* **239**(4839), :487-491.
- Sambrook, J., and Russell, D. (2001). "Molecular Cloning: A Laboratory Manual." 3 ed. (Cold Spring Harbor Laboratory Press; 3rd Labmn edition (January 15, Ed.). 3 vols.
- Sample, J., Young, L., Martin, B., Chatman, T., Kieff, E., Rickinson, A., and Kieff, E. (1990). Epstein-Barr virus types 1 and 2 differ in their EBNA-3A, EBNA-3B, and EBNA-3C genes. *J Virol* **64**, 4084-4092.
- Sandvej, K., Andresen, B. S., Zhou, X.-G., Gregersen, N., and Hamilton-Dutoit, S. (2000). Analysis of the Epstein-Barr virus (EBV) latent membrane protein 1 (LMP-1) gene and promoter in Hodgkin's disease isolates: selection against

- EBV variants with mutations in the LMP-1 promoter ATF-1/CREB-1 binding site
10.1136/mp.53.5.280. *Mol Pathol* **53**(5), 280-288.
- Sandvej, K., Gratama, J. W., Munch, M., Zhou, X.-G., Bolhuis, R. L. H., Storstein Andresen, B., Gregersen, N., and Hamilton-Dutoit, S. (1997). Sequence Analysis of the Epstein-Barr Virus (EBV) Latent Membrane Protein-1 Gene and Promoter Region: Identification of Four Variants Among Wild-Type EBV Isolates. *Blood* **90**(1), 323-330.
- Sjoblom, A., Yang, W., Palmqvist, L., Jansson, A., and Rymo, L. (1998). An ATF/CRE Element Mediates both EBNA2-Dependent and EBNA2-Independent Activation of the Epstein-Barr Virus LMP1 Gene Promoter. *J. Virol.* **72**(2), 1365-1376.
- Stefanoff, C., Hassan, R., and Gonzalez, A. (2003). Laboratory strategies for efficient handling of paraffin-embedded tissues for molecular detection of clonality in Non-Hodgkin lymphomas. *Diagn Molec Pathol.* **12**, 79-87.
- Stefanoff, C., Hassan, R., White, R., Pires, V., Ornellas de Souza, M., Seuánez, H., Tabak, D., and Zalcberg, I. (2003). "Establishment and characterization of EBV-negative (CEMO-2) and EBV-positive (CEMO-3) Burkitt's lymphoma cell lines. "Congresso Brasileiro de Hematologia e Hemoterapia 2003". Bras Hematol Hemoter, 25.
- Stein, H., Delsol, G., and Pileri, S. (2001). Hodgkin lymphoma. In "Classification of Tumors - Pathology & Genetics - Tumours of Hematopoietic and Lymphoid Tissues." (E. Jaffe, N. Harris, H. Stein, and J. Vardiman, Eds.), pp. 237-253.
- Tao, Q., Robertson, K. D., Manns, A., Hildesheim, A., and Ambinder, R. F. (1998). Epstein-Barr Virus (EBV) in Endemic Burkitt's Lymphoma: Molecular Analysis of Primary Tumor Tissue. *Blood* **91**(4), 1373-1381.
- Taylor, M., Kai, C., Kawai, J., Carninci, P., Hayashizaki, Y., and Semple, C. (2006). Heterotachy in mammalian promoter evolution. *PLoS Genet* **2**(e30.).
- The, G. d. (1995). Viruses and human cancers: challenges for preventive strategies. *Environ Health Perspect* **103**(8), 269-273.
- Thomas, R., Re, D., and Zander, A. R. (2002). Epidemiology and Etiology of Hodgkin's Lymphoma. *Ann Oncol.* **13**(4), 147-152.
- Thompson, M. P., and Kurzrock, R. (2004). Epstein-Barr Virus and Cancer. *Clin Cancer Res* **10**(3), 803-821.
- Thorley-Lawson, D. A. (2001). Epstein-Barr virus: Exploiting the Immune System. *Nat Rev Immunol* **1**(1), 75-82.
- Thorley-Lawson, D. A. (2005). EBV the prototypical human tumor virus—just how bad is it? *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, **116** **1**(2), 251-26.
- Thorley-Lawson, D. A., and Gross, A. (2004). Persistence of the Epstein-Barr Virus and the Origins of Associated Lymphomas. *N Engl J Med* **350**(13), 1328-1337.
- Tierney, R. J., Steven, N., Young, L. S., and Rickinson, A. B. (1994). Epstein-Barr virus latency in blood mononuclear cells: analysis of viral gene transcription during primary infection and in the carrier state. *J. Virol.* **68**(11), 7374-7385.
- Van Regenmortel, M. (1990). Virus species, a much overlooked but essential concept in virus classification. *Intervirolgy* **31**, 241-254.
- Walling, D., Shebib, N., Weaver, S., Nichols, M., Flaitz, C.M. and Webster-Cyriaque, J. (1999). The molecular epidemiology and evolution of Epstein-Barr virus: sequence variation and genetic recombination in the latent membrane protein-1 gene. *J Infect Dis.* **179**, 763-74.

- Weber-Nordt, R., Egen, C., and Wehinger, J. (1996). Constitutive activation of STAT proteins in primary lymphoid and myeloid leukemia cells and in Epstein-Barr virus (EBV)-related lymphoma cell lines. *Blood*. **88**(3), 809-816.
- Williams, H., and Crawford, D. H. (2006). Epstein-Barr virus: the impact of scientific advances on clinical practice. *Blood* **107** **2006**, 862-9.
- Wu, T., Mann, R., Charache, P., Hayward, S., Staal, S., Lambe, B., and Ambinder, R. (1990). Detection of EBV gene expression in Reed-Sternberg cells of Hodgkin's disease. *Int J Cancer* **46**, 801-4.
- Young, L., and Rickinson, A. (2004). Epstein-Barr virus: 40 years on. *Nat Rev Cancer* **4**, 757-68.
- Young, L. S., Yao, Q. Y., Rooney, C. M., Sculley, T. B., Moss, D. J., Rupani, H., Laux, G., Bornkamm, G. W., and Rickinson, A. B. (1987). New Type B Isolates of Epstein-Barr Virus from Burkitt's Lymphoma and from Normal Individuals in Endemic Areas. *J Gen Virol* **68**(11), 2853-2862.
- Zhou, X., Sandvej, K., Li, P., Ji, X., Yan, Q., Zhang, X., Da, J., and Hamilton-Dutoit, S. (2001). Epstein-Barr virus gene polymorphisms in Chinese Hodgkin's disease cases and healthy donors: identification of three distinct virus variants. *J Gen Virol*. **82**, 1157-67.
- Zhou, X. G., Hamilton-Dutoit, S. J., Yan, Q. H., and Pallensen, G. (1994). High frequency of Epstein-Barr virus in Chinese peripheral T-cell lymphoma
doi:10.1111/j.1365-2559.1994.tb01289.x. *Histopathology* **24**(2), 115-122.

Tabla A1: *Primers* utilizados para la evaluación de amplificabilidad del ADN y rearrreglos del gen *IgH*

Gen	Primer	Secuencia 5'-3'	Tamaño (pb)	Condiciones de PCR	Referencia		
PCR genes constitutivos							
β GLOBINA	β GLOB-S	TTCTGACACAACCTGTGTTCACTAGC	180	Volumen final 30 µl, 10mM Tris-HCl (pH 9.0), 50mM KCl, 2.25 mM MgCl ₂ , 0.2 mM de cada dNTP, Triton-X 0.001%, 1U de <i>Taq</i> polimerasa (Gibco BRL), 500 ng -1 µg de ADN (5-10 µl extracto crudo o diluciones). Perfil termico:(94°C 3 min), 30 ciclos (94°C- 45 seg / 58°C- 30 seg / 68°C- 1 min) y un ciclo final (72°C -10 min).	Stefanoff, <i>et al</i> (2003)		
	β GLOB-AS	TATTGGTCTCCTTAAACCTGTCTTG					
β ACTINA	β ACT-S	TCACCCACACTGTGCCCATCTACGA	300				
	β ACT-AS	CAGCGGAACCGCTCATTGCCAATGG					
GAPDH	GAPDH-65	GTATCGTGGAAGGACTCATG	450				
	GAPDH-67	ATGCCAGTGAGCTTCCCGTTCAGC					
PCR confirmación de clonalidad							
FR3/JH	FR3	CTGTGACACACGGCCGTGTATTACTG	90-135			Volumen final 50 µl, 10mM Tris-HCl (pH 8.3), 50mM KCl, 2.5 mM MgCl ₂ , 0.2 mM de cada dNTP, gelatina 0.001%, 1U de <i>Taq</i> polimerasa (Gibco BRL), 1 µg de ADN. Perfil Termico:(95°C 3 min), 35 ciclos (94°C- 1 min / 58°C- 1.30 min / 72°C- 2 min) y un ciclo final (72°C -10 min).	Yamada, <i>et al</i> (1989)
	JH	AACTGCAGAGGAGACGGTGACC					
FR2/JH	FR2A ξ	TGGRTCCGMCAGSCYYCNGG	-				
	LJH	TGAGGAGACGGTGACC					
	FR2A ξ	TGGRTCCGMCAGSCYYCNGG					
	VJH	GTGACCAGGGTNCCTTGGCCCCAG					
				Volumen final 25 µl, 10mM Tris-HCl (pH 9.0), 50mM KCl, 2.5 mM MgCl ₂ , 0.2 mM de cada dNTP, gelatina 0.001%, 1U de <i>Taq</i> polimerasa (Gibco BRL), 1 µg de ADN. Perfil Termico:(94°C 4 min), 40 ciclos (94°C- 45 seg / 52°C- 1 min / 72°C- 1 min) y un ciclo final (72°C -5 min).	Ramasamy, <i>et al</i> (1992)		

ξ: Combinación de *primers* utilizada en la 1º y 2º etapa respectivas a la reacción de PCR FR2/JH.

Tabla A2: Combinación de *primers* y condiciones para las reacciones de PCR

Gen	Primer	Secuencia 5'-3'	Coordenada en B95.8	T° annealing	Ciclos	Tamaño (pb)
<i>EBER</i>	EBER-2S	CCCTAGTGGTTTCGGACACA	6969-6988	52	35	107
	EBER-2AS	ACTTGCAAATGCTCTAGGCG	7075-7056			
BamW	BamHW-S	CCAGAGGTAAGTGGACTT	1396-1416	52	35	125
	BamHW-AS	GACCGGTGCCTTCTTAGG	1520-1503			
<i>EBNA2</i>	EBNA-2F	TGGAAACCCGTCCTCTC	48572-89	52	35	Tipo 1: 250 Tipo 2: 300
	EBNA-2I	TAATGGCATCGGTGGAATG	49355-73			
	EBNA-2C	AGGGATGCCTGGACACAAGA	48810-29			
	EBNA-2G	GCCTCGGTTGTGACAGAG	49048-65			
	EBNA-2B	TTGAAGAGTATGTCCTAAGG	#2020-39			
<i>LMP1</i>	LMP1-S	CACCTGCTCGTGAGTGGAGC	168649-628	58	40	440 Δ:145 wt: 175
	LMP1-AS	CCACCGGAACCAGAAGAACCC	168209-230			
	LMP1-2S	TGCTGGAAATGATGGAGGCC	168382-362			
	LMP1-30S	CGTCATCATCTCCACCGGAACCAGAAG	168198-224	63	35	Δ: 123 wt: 153
	LMP1-30AS	CGGAAGAGGTTGCAAACAAAGGAGGTG	168350-324			
	LMP1-33S	GGCGCACCTGGAGGTGGTCC	168594-575	52	35	155-400
	LMP1-33AS	TTTCCAGCAGAGTCGCTAGG	168374-393			
	LMP1-PRO1	CTTTACCACCGCATTCCCAC	169752-33	55	35	353
	LMP1-PRO2	AACAGTAGCGCCAAGAGCAG	169362-81			

Abreviaciones: wt, alelo *LMP1* salvaje; Δ, alelo *LMP1* deleciónado; coordenadas de las secuencias correspondientes a la secuencia B95.8 publicada (Baer et al, 1994)

Tabla A3: Características demográficas e histopatológicas de los Linfomas de Hodgkin estudiados.

Código de muestra	Sexo y edad	Tipo histológico	Asociación con EBV	Código de muestra	Sexo y edad	Tipo histológico	Asociación con EBV
L1	M/10	LH C.M.	Pos	L44	M/40	LH E.N.	Neg
L2	M/14	LH C.M.	Pos	L45	F/17	LH E.N.	Neg
L3	M/11	LH C.M.	Pos	L46	M/21	LH E.N.	Neg
L4	M/8	LH C.M.	Pos	L47	M/33	LH E.N.	Neg
L5	F/11	LH C.M.	Neg	L48	F/32	LH E.N.	Neg
L6	M/10	LH E.N.	Pos	L49	F/24	LH E.N.	Neg
L7	M/12	LH E.N.	Pos	L50	F/32	LH E.N.	Neg
L8	M/4	LH E.N.	Pos	L51	F/21	LH E.N.	Neg
L9	F/13	LH E.N.	Neg	L52	F/79	LH C.M.	Pos
L10	M/15	LH E.N.	Neg	L53	M/33	LH C.M.	Pos
L11	F/14	LH E.N.	Neg	L54	M/62	LH C.M.	Pos
L12	M/14	LH E.N.	Neg	L55	F/42	LH C.M.	Pos
L13	M/67	LH E.N.	Pos	L56	M/62	LH C.M.	Pos
L14	M/27	LH E.N.	Pos	L57	M/82	LH C.M.	Pos
L15	M/54	LH E.N.	Pos	L58	M/27	LH C.M.	Pos
L16	M/59	LH E.N.	Pos	L59	M/38	LH C.M.	Neg
L17	M/37	LH E.N.	Pos	L60	F/57	LH C.M.	Neg
L18	F/64	LH E.N.	Pos	L61	F/36	LH C.M.	Neg
L19	M/26	LH E.N.	Pos	L62	M/19	LH C.M.	Neg
L20	F/23	LH E.N.	Pos	L63	M/19	LH P.L.	Neg
L21	F/49	LH E.N.	Pos	L64	M/43	LH P.L.	Neg
L22	M/21	LH E.N.	Pos	L65	M/26	LH P. L.	Neg
L23	M/26	LH E.N.	Pos	L66	F/31	LH D.L.	Neg
L24	M/26	LH E.N.	Pos	L67	F/23	LH D.L.	Pos
L25	F/40	LH. E.N.	Pos	L68	M/49	LH	Pos
L26	M/31	LH E.N.	Pos	L69	F/59	LH	Neg
L27	F/23	LH E.N.	Pos	L70	F/31	LH	Neg
L28	M/19	LH E.N.	Pos	L71	F/68	LH	Neg
L29*	F/24	LH E.N.	Pos				
L30	M/39	LH E.N.	Pos				
L31	M/31	LH E.N.	Pos				
L32	F/59	LH E.N.	Pos				
L33	M/26	LH E.N.	Neg				
L34	M/23	LH E.N.	Neg				
L35	F/33	LH E.N.	Neg				
L36	M/30	LH E.N.	Neg				
L37	F/18	LH E.N.	Neg				
L38	M/26	LH E.N.	Neg				
L39	M/39	LH E. N.	Neg				
L40	M/18	LH E.N.	Neg				
L41	M/21	LH E.N.	Neg				
L42	M/49	LH E.N.	Neg				
L43	F/44	LH E.N.	Neg				

L, Linfoma de Hodgkin; CM, Celularidad mixta; EN, Esclerosis nodular; DL, Depleción linfocítica; PL, Predominio linfocítico; M, masculino; F, femenino. * Linfoma de Hodgkin con EBV en los linfocitos reactivos pero no en las células tumorales. Pos, positivo; Neg, negativo. Las líneas grises dividen los grupos histológicos.

Tabla A4: Características demográficas e histopatológicas de las Hiperplasias reactivas estudiadas.

Código de muestra	Sexo/Edad	Asociación con EBV	Código de muestra	Sexo/Edad	Asociación con el EBV	Código de muestra	Sexo/Edad	Asociación con EBV
HR1	M/13	Pos	HR17	M/45	Pos	HR33	F/50	Neg
HR2	F/9	Neg	HR18	M/83	Pos	HR34	F/68	Neg
HR3	M/13	Neg	HR19	M/54	Neg	HR35	F/18	Neg
HR4	F/12	Neg	HR20	F/37	Neg	HR36	F/20	Neg
HR5	M/3	Neg	HR21	F/38	Neg	HR37	M/18	Neg
HR6	M/14	Neg	HR22	F/46	Neg	HR38*	M/58	Neg
HR7	M/12	Neg	HR23	M/26	Neg	HR39	M/42	Neg
HR8	M/4	Neg	HR24	M/73	Neg	HR40	F/33	Neg
HR9	M/6	Neg	HR25	M/46	Neg	HR41	F/52	Neg
HR10	M/15	Neg	HR26	M/36	Neg			
HR11	M/13	Neg	HR27	M/65	Neg			
HR12*	F/37	Pos	HR28	M/22	Neg			
HR13*▣	M/34	Pos	HR29	M/27	Neg			
HR14	M/37	Pos	HR30	F/17	Neg			
HR15	F/47	Pos	HR31	F/36	Neg			
HR16*	M/38	Pos	HR32	F/50	Neg			

HR, hiperplasia reactiva; *, pacientes infectados con el virus de la inmunodeficiencia humana (HIV); ▣, paciente infectado con el virus de la Hepatitis C (HCV) y el Herpesvirus humano tipo 8 (HHV8); Pos, positivo; Neg, negativo. Las líneas en gris subdividen niños de adultos.

**Formulario de autorización de depósito de tesis/trabajo final integrador en la
 Comunidad Ciencias Exactas, Químicas y Naturales del RIDUNaM
 (Repositorio Institucional Digital de la UNaM)**

Por intermedio de la presente, el abajo firmante, AUTOR de la Tesis/TFI (Grado) titulada/o
Variedad del gen LMP1 del virus Epstein-Barr en el linfoma de Hodgkin.

Da FE de la autoría y originalidad de la obra mencionada, que fue dirigida por, *Rocío Hassan*

presentada y defendida en la Facultad de Ciencias Exactas, Químicas y Naturales de la Universidad
 Nacional de Misiones (FCEQyN-UNaM), el (fecha) *07.10.2007*, Acta/Expdte.
 N°....., con el fin de obtener el título de *Licenciado en genética.*

Tildar según corresponda

- Tesis de Posgrado
 Doctorado Maestría Trabajo Final Integrador
 Tesis de Grado

Derechos patrimoniales

Como autor, expreso mi conformidad en cuanto a la cesión gratuita de los derechos de reproducción y circulación de esta obra, en forma NO EXCLUSIVA, a la Facultad de Humanidades y Ciencias Sociales-UNaM. Dicha reproducción y circulación se podrá realizar, una o varias veces, en cualquier soporte, para todo el mundo, con fines sociales, educativos y científicos.





En virtud del carácter no exclusivo de esta cesión, el autor podrá reproducir y comunicar libremente la tesis o trabajo final integrador, a través de los medios que estime oportunos.

Condiciones de acceso en línea

- Autorizo el depósito de la tesis o trabajo final integrador en forma inmediata
 Autorizo el depósito del documento con embargo por el plazo de _____ meses a partir de la defensa de la misma.

Condiciones de uso de la tesis/TFI

Será puesta a disposición pública bajo las siguientes condiciones de uso:

	(BY) Atribución — Debe reconocer los créditos de la obra de la manera especificada por el autor o el licenciente (pero no de una manera que sugiera que tiene su apoyo o que apoyan el uso que hace de su obra).
	(NC) No Comercial — No puede utilizar esta obra para fines comerciales.
	(SA) Permite trabajos derivados — Siempre que se mantenga la misma licencia.
	Reconocimiento - NoComercial - CompartirIgual (by-nc-sa): No se permite un uso comercial de la obra original ni de las posibles obras derivadas, la distribución de las cuales se debe hacer con una licencia igual a la que regula la obra original.

Apellido y Nombres	GUIRETTI, DEISY MARIELA
Teléfono/Celular	
Correo electrónico	deisyguiretti@gmail.com

Apellido y Nombres	
Teléfono/Celular	
Correo electrónico	

Apellido y Nombres	
Teléfono/Celular	
Correo electrónico	

Se firma la presente en la Ciudad de Posadas, Misiones a los 16 días del mes de septiembre de 2025.

DNI: 27684881

DEISY MARIELA GUIRETTI