

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE MEDICINA



**LINFOMAS NO – HODGKIN ASOCIADOS AL SIDA:
ESTUDIO CLÍNICO, MORFOLÓGICO,
INMUNOHISTOQUÍMICO Y MOLECULAR: PAPEL
ETIOLÓGICO DEL VIRUS DE EPSTEIN - BARR**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Alejandro Pascual Martín

Bajo la dirección del doctor

Carmen Bellas Menéndez

Madrid, 2001

ISBN: 84-669-2075-7

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE MEDICINA

**LINFOMAS NO-HODGKIN ASOCIADOS AL SIDA
ESTUDIO CLÍNICO, MORFOLÓGICO,
INMUNOHISTOQUÍMICO Y MOLECULAR. PAPEL
ETIOLÓGICO DEL VIRUS DE EPSTEIN-BARR.**

ALEJANDRO PASCUAL MARTÍN

TESIS DOCTORAL

MADRID 2000

AGRADECIMIENTOS	9
------------------------------	----------

ABREVIATURAS	11
---------------------------	-----------

1. INTRODUCCIÓN	15
------------------------------	-----------

1.1. LNH ASOCIADOS AL SIDA	16
---	-----------

1.1.1. Epidemiología.....	16
---------------------------	----

1.1.2. Clasificación.....	18
---------------------------	----

1.1.3. Características histológicas.....	20
--	----

1.1.4. Características clínicas.....	23
--------------------------------------	----

1.1.5. Inmunofenotipo.....	25
----------------------------	----

1.1.6. Genotipo molecular.....	27
--------------------------------	----

1.1.6.1. C-MYC.....	27
---------------------	----

1.1.6.2. BCL-6.....	29
---------------------	----

1.1.6.3. P53.....	34
-------------------	----

1.1.6.4. BCL-2.....	36
---------------------	----

1.1.7. Papel de la hiperestimulación antigénica en el desarrollo de linfomas en los pacientes infectados por el VIH.....	37
--	----

1.2. EL VIRUS DE EPSTEIN-BARR.....	40
1.2.1. Características estructurales.....	41
1.2.2. Transmisión.....	45
1.2.3. Latencia.....	45
1.2.4. Métodos de detección.....	52
1.3. EL VEB y LOS LNH ASOCIADOS AL SIDA.....	54
2.OBJETIVOS.....	58
3.MATERIALES Y MÉTODOS.....	62
3.1. MATERIAL.....	63
3.2. CLASIFICACIÓN Y ESTUDIO MORFOLÓGICO.....	63
3.3. ESTUDIO INMUNOHISTOQUÍMICO.....	66
3.3.1. Técnicas inmunohistoquímicas.....	66
3.3.2. Controles.....	69
3.3.3. Cuantificación de los resultados de las tinciones inmunohistoquímicas.....	70

3.4. TÉCNICAS MOLECULARES.....	72
3.4.1. Técnica de hibridación “in situ” para EBERs.....	72
3.4.2. Técnica de PCR.....	72
3.4.2.1. Métodos de extracción del ADN.....	73
3.4.2.2. Amplificación mediante la técnica de PCR.....	75
3.4.2.3. Visualización de los productos de la PCR.....	77
3.4. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	78
4. RESULTADOS.....	79
4.1. CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS.....	80
4.1.1. Distribución por sexos.....	80
4.1.2. Grupos de riesgo.....	80
4.1.3. Edad.....	81
4.1.4. Relación grupo de riesgo y sexo.....	82
4.1.5. Localización de los linfomas.....	82
4.2. CARATERÍSTICAS HISTOLÓGICAS.....	83
4.2.1. Relación entre los subtipos histológicos del los LS y su localización.....	84
4.2.2. Relación entre número de células CD-4 por μ L y tipo histológico de linfoma.....	85

4.3. CARACTERÍSTICAS INMUNOHISTOQUÍMICAS	87
4.3.1. Expresión de CD-20 y CD-3.....	87
4.3.2. Presencia de clonalidad para las cadenas ligeras de las inmunoglobulinas.....	87
4.3.3. Índice de proliferación.....	89
4.3.4. Expresión de la proteína p53.....	90
4.3.5. Expresión de la proteína Bcl-2.....	91
4.3.6. Expresión de la proteína Bcl-6.....	92
4.3.7. Expresión de CD-40.....	94
4.3.8. Expresión de la proteína LMP-1.....	95
4.3.9. Relación entre las oncoproteínas LMP-1, Bcl-6, Bcl-2 y p53 y los distintos grupos de linfomas.....	97
4.4. RESULTADOS MOLECULARES	99
4.4.1. Expresión de EBERs.....	99
4.4.2. Relación entre la expresión de EBER y la proteína LMP-1.	100
4.4.3. Tipaje del VEB.....	102
4.4.4. Tipaje del VEB en los linfomas EBERs positivos y su relación con el grupo de riesgo.....	104
4.4.5. Relación entre la cepa salvaje y delecionada del gen LMP-1 del VEB y los linfomas EBERs positivos	105

4.4.6. Relación de la cepa delecionada y el tipo del VEB en los linfomas con expresión de EBERs.....	107
4.4.7. Relación de la cepa delecionada y no delecionada del gen LMP-1 del VEB y los grupos de riesgo.....	108
4.5. GRUPO CONTROL.....	109
4.5.1. Datos clínicos.....	109
4.5.1.1. Distribución por sexos.....	109
4.5.1.2. Edad.....	109
4.5.2. Técnicas de PCR.....	110
4.5.2.1. Tipaje del VEB en los casos control.....	110
4.5.2.2. Presencia de la deleción de 30 pb en los casos control.....	110
4.5.2.3. Distribución de la deleción de 30 pb según el tipaje del VEB en los casos control.....	111
4.5.3. Relación entre los resultados del tipaje del VEB en el grupo control y en los pacientes con LNH asociados al SIDA VEB positivos.....	113
4.5.4. Relación entre la presencia de cepas delecionadas y no delecionadas del gen LMP-1 en el grupo control y en los pacientes con LNH asociados al SIDA VEB positivos.....	113
4.5.5. Comparación de la distribución de la cepa delecionada de 30pb según el tipaje del VEB en el grupo control y en tejidos afectados por LNH asociados al SIDA VEB positivos.....	114
4.6. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	114

4.7. TABLAS.....	117
5. DISCUSIÓN.....	127
5.1. CARACTERÍSTICAS EPIDEMIOLÓGICAS.....	128
5.2. LOCALIZACIÓN DE LOS LINFOMAS.....	130
5.3. SUBTIPOS HISTOLÓGICOS.....	131
5.4. RELACIÓN ENTRE SUBTIPOS HISTOLÓGICOS Y LOCALIZACIÓN.....	132
5.5. NÚMERO DE CÉLULAS CD-4/ μ L Y TIPO DE LINFOMA.....	133
5.6. INMUNOFENOTIPO.....	134
5.7. ÍNDICE DE PROLIFERACIÓN.....	135
5.8. GENOTIPO MOLECULAR (BCL-6, BCL-2 Y P53).....	135
5.9. EXPRESIÓN DE LA PROTEÍNA LMP-1 Y SU CORRELACIÓN CON BCL-6 Y CD-40.....	140
5.10. EXPRESIÓN DE EBERS.....	143
5.11. TIPAJE DEL VEB.....	144
5.12. DISTRIBUCIÓN DE LA PRESENCIA DE LA CEPA SALVAJE Y DELECIÓN DEL GEN LMP-1 DEL VEB.....	147
5.13. PATRONES DE LATENCIA EN LOS LNH ASOCIADOS AL SIDA.....	150

5.14. MECANISMOS PATOGENICOS EN LOS LNH ASOCIADOS AL SIDA.....	151
6. CONCLUSIONES.....	159
7. FIGURAS.....	164
8. BIBLIOGRAFÍA.....	176

AGRADECIMIENTOS.

La realización de una Tesis Doctoral supone un gran trabajo personal y en ella están empeñados muchos esfuerzos e ilusiones. La realización final de este trabajo supone para mí un gran motivo de satisfacción.

La realización de este trabajo es fruto de la colaboración de muchas personas, unas con su trabajo, otras con su empuje y otras con su apoyo personal, sin los cuales esta tesis no hubiera sido posible. Gracias a todos ellos.

A la profesora Carmen Bellas, directora de la Tesis Doctoral, por el trabajo y el esfuerzo que me ha dedicado, por sus amplios conocimientos que ha conseguido transmitirme y, sobre todo, por tener el privilegio de trabajar a su lado. A su inteligencia, rigor científico y profesional quiero expresarle mi gratitud.

A la profesora Carmen Martín, tutora de la Tesis Doctoral su colaboración y facilidades para la realización de este trabajo, sus actitudes profesionales y humanas, las cuales ya valoré en mis años de residencia, me han servido de ejemplo en todo momento.

A la doctora en Ciencias Químicas Almudena Santón Roldán por su paciencia y amabilidad al enseñarme las técnicas de patología molecular realizadas en esta tesis doctoral. Su capacidad profesional e inteligencia han sido un estímulo para realizar este trabajo.

A mis compañeros y profesores de residencia del Hospital Clínico San Carlos, donde realicé mi especialidad, ellos fueron mis maestros y sentaron la base de mi formación.

A los técnicos de laboratorio y celadores de los hospitales Ramón y Cajal y Clínico San Carlos de Madrid cuya labor siempre importante y callada nunca es suficientemente reconocida.

A Miguel Angel Vences Benito por su gran interés e inestimable ayuda en el análisis estadístico de nuestros resultados y su posterior procesamiento informático.

A Vicente Plá García fotógrafo del Hospital General de Albacete por su trabajo en la realización de la iconografía del presente trabajo.

A mi familia y amigos que son el componente afectivo imprescindible para conseguir cualquier meta y a los que estoy profundamente agradecidos.

Gracias. Muchas gracias.

A	Adenina
aa	Aminoácido
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADVP	Adicto a drogas por vía parenteral
ARN	Ácido ribonucleico
C	Citosina
del-LMP-1	Gen de la proteína latente de membrana del VEB con delección de 30 pb
dNTP	Desoxirribonucleótido trifosfato
ddNTP	Didesoxirribonucleótido trifosfato
EBER	ARN no traducido del VEB
EBNA	Antígeno nuclear del VEB
G	Guanina
I-kB	Factor inhibidor kB
IL	Interleucina
Kb	Kilopares de bases
KDa	KiloDalton
LB	Linfoma Burkitt
LDCG	Linfoma difuso de células grandes

LDCGA CD-30+	Linfoma difuso de células grandes anaplásico CD-30 positivo
LDCG CD-30	Linfoma difuso de células grandes con expresión de CD-30
LDCGNH	Linfoma difuso de células grandes no hendidas
LI	Linfoma inmunoblástico
LMP-1	Proteína latente de membrana del VEB
LNH	Linfoma no Hodgkin
LP	Linfoma plasmoblástico
LPC	Linfoma primario de cavidades
LPSNC	Linfoma primario de sistema nervioso central
LS	Linfoma sistémico
Lt-B	Linfoma tipo Burkitt
μL	Microlitro
μM	Micromolar
μm	Micra
mM	Milimolar
NF-kB	Factor nuclear kB

ng	Nanogramo
nm	Nanometro
pb	Pares de bases
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
SIDA	Síndrome de la inmunodeficiencia adquirida
T	Timidina
TNF	Factor de necrosis tumoral
TRAF	Factor asociado al receptor TNF
VCAM-1	Molécula de adhesión de células vasculares
VEB	Virus de Epstein-Barr
VIH	Virus de la inmunodeficiencia humana

INTRODUCCIÓN

1.- INTRODUCCIÓN

Es conocido que la incidencia de enfermedades linfoproliferativas, incluyendo los linfomas malignos, es significativamente mas alta en individuos con inmunodeficiencias congénitas, adquiridas o iatrogénicas.

Las proliferaciones linfoides asociadas a inmunodeficiencia se caracterizan por tener a menudo una localización extranodal, histología agresiva, crecimiento difuso, linaje B, frecuente asociación al virus de Epstein-Barr (VEB) y curso clínico rápidamente progresivo (Peters BS y col. 1991, Pluda JM y col. 1990, Gail MH y col. 1991, Tirelli U y col. 1994).

1.1.-LINFOMAS NO-HODGKIN (LNH) ASOCIADOS AL SÍNDROME DE INMUNODEFICIENCIA ADQUIRIDO (SIDA).

1.1.1.-Epidemiología.

Los LNH son la segunda neoplasia más común que se desarrolla en pacientes infectados por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) y es la más frecuente en algunos grupos de riesgo de SIDA, como son los adictos a drogas por vía parenteral (ADVP) y los hemofílicos (Ahmet T y col. 1987, Beral V y col. 1991, Ragni MV y col. 1993, Schulz TF y col. 1996). Es una enfermedad que forma parte del diagnóstico de SIDA desde 1985 (Center for Disease Control. 1985, Levine AM. 1993).

El riesgo de desarrollar LNH es 60 a 100 veces mayor en los pacientes con SIDA que en la población general (Rabkin CS y col. 1991, Beral V y col. 1991, Bibbar RS y col. 1992). En estudios llevados a cabo en el estado de Illinois (Coté TR y col. 1991) y en la Bahía de San Francisco (Reynolds P y col. 1993) la incidencia de linfomas era 141 y 71 veces mayor en pacientes con SIDA que en la población general.

La incidencia de LNH asociados a SIDA en Estados Unidos es de un 3% (Beral V y col. 1991). En Europa un estudio danés mostraba que los pacientes con SIDA desarrollaban linfomas en un 5% de casos (Biggar RJ y col. 1992). La verdadera incidencia, probablemente, esta situada entre un 4 y un 10% (Levine AM. 1987, Hamilton-Dutoit SJ y col. 1989). En Estados Unidos el 80% de los pacientes que desarrollaron esta enfermedad son homosexuales y el 20% drogadictos. En Europa esta diferencia, si existe, es mucho menor, posiblemente a causa de la mayor homogeneidad de acceso a medios diagnósticos entre los distintos estratos sociales (Serraino D y col. 1992). También se desarrollan linfomas en niños infectados por el VIH perinatalmente y en adultos con infección por VIH por transmisión sexual, transfusiones o inoculación. Al ser, en este momento, la transmisión sexual la causa principal de infección por VIH en la población general (Ellerbrock TV y col. 1992), es de esperar que aumente el número de linfomas en personas infectadas por esta vía.

El aumento en la tasa de supervivencia de pacientes con SIDA se acompaña de un alto riesgo de producción de tumores malignos, particularmente LNH. El desarrollo de estos linfomas tiene una latencia de 4 a 6 años y una probabilidad estimada para desarrollarse del

28,6% después de 30 meses y del 46,4% después de 36 meses de tratamiento con zidovudina (Pluda JM y col. 1990).

1.1.2.- Clasificación.

Los LNH asociados al SIDA se dividen en tres categorías de acuerdo con el lugar de origen anatómico: a) Linfomas sistémicos (LS) (nodal o extranodal), b) Linfomas primarios del Sistema Nervioso Central (LPSNC) y c) Linfomas primarios de cavidades (LPC) (Gaidano G y col. 1995, Jaffe ES y col. 1996b, Knowles DM. 1997).

Los LS comprenden el 80% de los LNH asociados al SIDA (Levine AM y col. 1984, Knowles DM. 1988, Lowenthal DA y col. 1988, Ioachim HL y col. 1991). Dentro de ellos se distinguen: Los linfomas de células pequeñas no hendidas o Burkitt (LB) y los linfomas difusos de células grandes (LDCG); estos a su vez pueden presentar una morfología con células inmunoblásticas o células grandes no hendidas (Knowles DM y col. 1988, Ioachim HL y col. 1991, Levine AM.1993, Carbone A y col. 1993a, Harris NL y col. 1994. Gaidano G y col. 1995, Knowles DM. 1997). La definición de LDCG en la población general incluye los linfomas difusos de células grandes anaplásicos CD-30 positivos (LDCGA CD-30 +) (Harris NL y col. 1994), estos linfomas también han sido descritos asociados al SIDA (Carbone A y col. 1993b, Tirelli U y col. 1995b).

El linfoma plasmoblástico (LP) de la cavidad oral es una entidad recientemente descrita dentro de los linfomas asociados al SIDA (Delecluse HJ y col. 1997).

Tanto los LB como los LDCG asociados al SIDA presentan un pronunciado pleomorfismo en comparación con los linfomas de la población inmunocompetente. Y esto hace difícil su clasificación (Gaidano G y col. 1995, Carbone A y col. 1995).

Estudios epidemiológicos muestran que los LB asociados al SIDA representan un 30-40%, mientras los LDCG son un 60-70% (Ziegler JL y col. 1984, Lowenthal DA y col. 1988, Knowles DM y col. 1988, Pedersen C y col. 1991, Beral V y col. 1991, Carbone A y col. 1995). Sin embargo, en algún estudio estadístico reciente, se observa una disminución en el porcentaje de los LB asociados al SIDA (20% frente al 80% de los LDCG) (Kaplan L y col. 1995).

En Italia el porcentaje de LDCGA CD-30 + asociados al SIDA supone el 14% del total de LNH en paciente VIH positivos, este es un porcentaje mayor que el observado en la población general, donde se encuentran en un 7,5% (Tirelli U y col. 1995a). Otros estudios tienen un porcentaje para este tipo de linfomas del 4% del total (Raphael M y col. 1993).

Los LPSNC representan el 20% de los LNH asociados al SIDA (Gill PS y col. 1985, Lowenthal DA y col. 1988, Beral V y col. 1991, Levine AM. 1993, Schulz TF y col. 1996), pero como muchos de estos tumores sólo son diagnosticados en la autopsia, su verdadera

incidencia probablemente es más alta, aproximadamente de un 40% (Wilkes M y col. 1988). La incidencia de los LPSNC es 1000 veces más frecuente en pacientes con SIDA que en la población general (Beral V y col. 1991, Cote TR y col. 1996). Además es la neoplasia más frecuente en pacientes pediátricos con SIDA (Gray T y col. 1991).

Por último, los LPC representan un 5% de este grupo de linfomas (Jaffe ES y col. 1996b, Carbone A y col. 1996 y 1997, Cesarman E y col. 1995).

1.1.3.-Características histológicas.

El LB, histológicamente, se caracteriza por presentar células de mediano tamaño núcleos redondos y uniformes con 2 a 5 pequeños nucleolos periféricos. El llamado linfoma tipo Burkitt (L tB) muestra células medianas con núcleos no hendidos, junto a células grandes de núcleos no hendidos con 1 a 2 nucleolos eosinófilos y presencia de diferenciación plasmocitoide (Carbone A y col. 1993a, 1995a y 1996). En estos tipos de linfomas las mitosis son muy frecuentes, así como la apoptosis. Resultado de esta última son los abundantes macrófagos con restos celulares fagocitados, que contribuyen al patrón en cielo estrellado.

En los linfomas difusos de células grandes no hendidas (LDCGNH) las células son más grandes y cohesivas de aspecto centroblástico, pueden mostrar patrón en "cielo estrellado" y puede aparecer diferenciación plasmocitoide (Carbone A y col. 1993a, 1995a y 1996).

Los linfomas inmunoblasticos (LI) tienen marcado polimorfismo; se distinguen dos grupos morfológicos uno de ellos caracterizado por estar constituido por inmunoblastos de mediano tamaño con diferenciación plasmocitoide y otro constituido por inmunoblastos grandes sin diferenciación plasmocitoide y en el que se observan células multinucleadas tipo Reed-Sternberg (Carbone A y col. 1993a, 1995a y 1996).

Tanto los LB como los LDCG asociados al SIDA pueden exhibir un pronunciado pleomorfismo. Muchos linfomas de células grandes muestran una variable proporción de células linfoides con atipia manifiesta y a menudo núcleos múltiples y bizarros. La mayor expresión de este polimorfismo se produce en los LDCGA CD-30 + (Carbone A y col. 1991, Chadburn A y col. 1993, Raphael M y col. 1993).

Los LP de la cavidad oral muestran células grandes con un núcleo redondo u oval más o menos excéntrico que tienen un nucleolo central o varios nucleolos periféricos. El citoplasma es amplio y basófilo con la tinción de Giemsa (Delecluse HJ y col. 1997).

Las características morfológicas de los LDCGA CD-30 + asociados al SIDA incluyen: Infiltración por células grandes pleomórficas con abundante citoplasma y núcleos de formas irregulares que poseen uno o más nucleolos, alta actividad mitótica y la presencia de células multinucleadas que recuerdan a las células de Reed-Stenberg, además, se observa fibrosis y numerosos macrófagos entremezclados con las células tumorales. Es necesaria la expresión

del antígeno CD-30 en todas o casi todas las células neoplásicas para el diagnóstico de este tipo de linfoma; a su vez, los LDCG (tanto los inmunoblásticos pleomórficos como los de células grande no hendida) deben ser excluidos de este grupo aunque algunas células neoplásicas sean CD-30 positivas (Carbone A y col. 1996).

Los LNH asociados y no asociados al SIDA de tipo histológico similar exhiben características morfológicas semejantes, excepto la alta frecuencia de figuras mitóticas, el incremento de detritus celulares y la gran tendencia a la necrosis que se observa en el grupo de LNH asociados al SIDA, lo que sugiere un alto índice de proliferación y un crecimiento tumoral más rápido (Knowles DM y col. 1992).

La gran mayoría de los LPSNC asociados al SIDA son linfomas difusos de células grandes, dependiendo de la presencia de rasgos inmunoblásticos plasmocitoides se pueden dividir en linfomas de células grandes no hendidas y linfomas inmunoblásticos plasmocitoides. (Jellinger KA y col. 1992, Camilleri-Bröet S y col. 1997).

Los LPC exhiben morfología de linfomas de alto grado de células grandes, células grandes anaplásicas y, más frecuentemente, inmunoblásticos (Green I y col. 1995).

1.1.4.- Características clínicas.

Los LS se presentan en dos tercios de los casos como una enfermedad diseminada en el momento del diagnóstico, infiltrando, a menudo, la médula ósea. Los restantes suelen presentar masa extranodal voluminosa (Estadio I E). El SNC y el aparato gastrointestinal son el primer y el segundo lugar más frecuente de afectación extranodal. Hay, además, alta frecuencia de síntomas sistémicos y tienen mal pronóstico (Levine AM y col. 1984, Knowles DM y col. 1988, Lowenthal DA y col. 1988, Ioachim HL y col. 1991, Karp JE y col. 1991, Levine AM. 1993).

En los individuos con infección por el VIH que desarrollan LB, estos tumores son generalmente precoces en su aparición de forma que los pacientes aún no tienen diagnóstico de SIDA y suelen tener niveles conservados de linfocitos CD-4. Los individuos que desarrollan LDCG y LPC asociados al SIDA son de presentación más tardía, tienen diagnóstico previo de SIDA (sarcoma de Kaposi u otras infecciones oportunistas) y niveles bajos de linfocitos CD-4 (Carbone A y col. 1993a, Gaidano G y col. 1995).

Los LB afectan más frecuentemente a ganglios linfáticos, médula ósea y músculo esquelético; mientras que los LI y LDCGNH, más a menudo, asientan sobre áreas extranodales como son cavidad oral, intestino o SNC y afectan, raramente, a la médula ósea (Boyle MJ y col. 1990, Beral V y col. 1991, Roithman S y col. 1991, Pluda JM y col. 1993, Carbone A y col.1995a).

En los LPSNC asociados al SIDA la inmunodeficiencia es más severa y la enfermedad (SIDA) más avanzada que en los pacientes con LS (Beral V y col. 1991, Levine AM y col. 1993). Se desarrollan sobre todo en hemisferios cerebrales pero también se producen en cerebelo, ganglios basales y tronco cerebral. Suelen ser lesiones grandes y multifocales. El pronóstico es pésimo, el 75% de los pacientes tienen niveles de CD-4 menores de 50/mm (Gill PS y col. 1985, Pluda JM y col. 1990, MacMahon EM y col. 1991, Levine AM y col. 1991, Levine AM. 1992).

Los LDCGA CD-30 + tienen un conteo de linfocitos CD-4 similar al de los LB (Tirelli U y col. 1995b, Carbone A y col. 1996). Poseen una alta incidencia de lesiones extranodales y frecuente afectación del anillo de Waldeyer (Tirelli U y col., 1995b). En Italia este tipo de linfomas, así como, la enfermedad de Hodgkin asociada a la infección por el VIH se desarrollan más frecuentemente en pacientes ADVP (Carbone A y col. 1991).

Los LPC (pleura, pericardio y cavidad abdominal) permanecen circunscritos en esta localización, extendiéndose muy raramente a ganglios linfáticos o a distancia. Ocurre sobre todo en hombres, casi siempre VIH positivos y más en homosexuales (Karcher DS y col. 1992, Green I y col. 1995). Los pacientes de edad avanzada que presentan este linfoma no suelen ser VIH positivos (Said JW y col. 1996). A pesar de esta escasa tendencia a la diseminación, estos linfomas tienen muy mal pronóstico. La vida media tras el diagnóstico es de cuatro meses. La causa de muerte está en relación con la persistencia de linfoma residual o

complicaciones de la quimioterapia (Karcher DS y col. 1997). Los enfermos presentan usualmente una inmunosupresión muy severa (Said JW y col. 1996).

1.1.5.- Inmunofenotipo.

La mayor parte de los LNH asociados al SIDA tanto sistémicos como cerebrales o de cavidades derivan de linfocitos B (Jellinger KA y col. 1992, Levine AM. 1993, Carbone A y col. 1995a y 1996).

En los LB asociados al SIDA las células neoplásicas expresan inmunoglobulinas M-κ y M-λ de superficie. Las células neoplásicas son positivas para CD10, CD19, CD22, CD74, CD20, Cdw75 y CD45RA (Raphael M y col. 1994, Carbone A y col. 1995a y 1996).

Los LDCGNH asociados al SIDA expresan más frecuente positividad para CD19, CD20, CD74 y Cdw75 (Carbone A y col. 1995a).

En los LI asociados al SIDA el fenotipo más frecuente es CDw75, CD74 y CD20 (Carbone A y col. 1995a). Alguno de ellos pueden presentar negatividad para marcadores B y T. Se ha descrito que las formas inmunoblásticas presentan una mayor expresión de moléculas de adhesión (LFA1, ICAM1 y LFA3) y que suelen asociarse a una infección latente por el VEB de tipo III (Hamilton-Dutoit SJ y col. 1993a, Camilleri-Broët S y col. 1997).

Los LP de la cavidad oral poseen mínima o ausente expresión del antígeno leucocitario común y de CD-20 y son positivos para los antígenos característicos de las células plasmáticas CD-38c y CD 79a. Esto junto con una variable expresión de inmunoglobulinas y reordenamientos clonales del gen Ig H confirman su naturaleza B. (Delecluse HJ y col. 1997).

Casi todos los investigadores han demostrado que la mayoría de los LNH asociados al SIDA exhiben reordenamientos clonales de los genes de cadenas pesadas y ligeras de las inmunoglobulinas y ausencia de clonalidad del receptor de linfocitos T (Knowles DM y col. 1989, Carbone A y col. 1991).

Los LDCGA CD-30 + asociados al SIDA suelen ser de fenotipo B o nulo, a diferencia de los de la población general, que presentan un fenotipo T o nulo (Tirelli U y col. 1995b).

Los LPC en la mayoría de los casos muestran ausencia de antígenos de linaje B e inmunoglobulinas, pero la expresión de CD-30, CD-38 y EMA indica su procedencia de linfocitos B en estadios tardíos de maduración. Su origen en linfocitos B es confirmado por la presencia de reordenamientos clonales de los genes de las cadenas pesadas y ligeras de las inmunoglobulinas en la mayoría de estos casos (Karcher DS y col. 1992, Green I y col. 1995).

1.1.6.- GENOTIPO MOLECULAR.

1.1.6.1.- C-MYC.

El producto del oncogén c-myc es una fosfoproteína nuclear que funciona como un regulador de la transcripción y se expresa en las células en proliferación. El oncogén está relacionado con el control del paso de la fase G₀ del ciclo celular a la fase G₁, es inhibido durante la diferenciación celular y, además, tiene relación con la modulación de la apoptosis (Kelly K y col. 1983, Dalla-Favera R. 1993, Gaidano G y col. 1997a).

Uno de los mecanismos bioquímicos a través de los que actúa c-myc es mediante la formación de heterodímeros complejos con la proteína MAX, tal interacción es requerida para que c-myc induzca estimulación de la transcripción y proliferación celular (Blackwood EM y col. 1991, Gu W y col. 1993).

El gen c-myc está situado en el cromosoma 8q24. La hiperestimulación de poblaciones clonales de linfocitos B produce inestabilidad genética facilitando traslocaciones cromosómicas (Zech V y col. 1976, Chaganti RS y col. 1983, Peterson JM y col. 1985, Groopman JE y col. 1986). Estas traslocaciones cromosómicas se producen entre la banda 8q24 y uno de los locos de los genes de las inmunoglobulinas: Ig H 14q32 (80% de los casos) y, con menos frecuencia, Ig K 2p11 (15%) o Ig λ 22q 11 (5%) (Chaganti RS y col. 1983, Groopman JE y col. 1986, Subar M y col. 1988, Ballerini P y col. 1988, Gaidano G y col. 1993).

Las traslocaciones cromosómicas causan una alteración en la regulación de c-myc mediante, al menos, 2 mecanismos diferentes. En primer lugar, los alelos traslocados de c-myc son yuxtapuestos a elementos reguladores heterólogos derivados de los locus de las inmunoglobulinas, alterando la transcripción del oncogén (Dalla-Favera R. 1993). Además, la región reguladora 5' de c-myc es a menudo alterada por cambios estructurales que producen una modificación de su sensibilidad a factores reguladores celulares de la expresión de c-myc (Cesarman E y col. 1987). La activación oncogénica de c-myc, además, de producirse por alteraciones en la regulación de la transcripción, también se cree es debida a sustituciones en el exon-2 del gen c-myc, el cual corresponde al dominio de transactivación de la proteína (Bhatia K y col. 1993). Mientras en condiciones normales la activación de c-myc a través del dominio de transactivación es suprimida por la proteína p107 mediante interacciones proteína-proteína, la proteína c-myc que poseen mutaciones del exon 2 pueden escapar a la modulación mediada por p107 (Gu W y col. 1994).

Numerosos estudios demuestran que alteraciones en la regulación y expresión de c-myc pueden influir en el crecimiento "in vitro" de los linfocitos B y producir linfomas en ratones transgénicos (Adams JM y col. 1985, Lombardi L y col. 1987).

Las investigaciones moleculares encuentran reordenamiento en el gen c-myc entre un 72% y 100% de los LB asociados al SIDA y entre un 20% y 68% de los Lt-B (Gaidano G y col. 1995 y 1997c, Davi F y col. 1998). En los LDCG asociados al SIDA están descritas alteraciones en el gen c-myc en un 20% de casos (Groopman JE y col. 1986, Pelicci PG y

col. 1986, Subar M y col. 1988, Neri A y col. 1991, Ballerini P y col. 1993, Bhatia K y col. 1994, Gaidano G y col. 1993 y 1994). Se ha sugerido que estos últimos grupos de linfomas con reordenamiento del oncogén c-myc podrían representar casos de Lt-B asociados al SIDA que han sido mal diagnosticados debido al marcado pleomorfismo que poseen los linfomas asociados a esta enfermedad (Delecluse HJ y col. 1993, Gaidano G y col. 1995).

En los LPSNC y LPC asociados al SIDA no se detectan reordenamiento del oncogén c-myc (Knowles DM y col. 1989, Walts AE y col. 1990, Meeker T y col. 1991, Karcher DS y col. 1992, Green I y col. 1995, Camilleri-Bröet S y col. 1997).

1.1.6.2.- BCL-6.

El oncogén BCL-6 esta situado en el cromosoma 3q27 y codifica un factor de transcripción que contiene dominios con dedos de zinc cuya función es inhibir la transcripción. (Ye BH y col. 1993, Kersckaert JP y col. 1993).

BCL-6 sufre alteraciones en los linfomas tanto por mutaciones como por reordenamientos cromosómicos (Kersckaert JP y col. 1993, Ye BH y col. 1995, Migliazza A y col. 1995). Los reordenamientos cromosómicos llevan a la sustitución del promotor del gen BCL-6 por elementos reguladores heterólogos, estos derivan de diferentes lugares cromosómicos incluyendo, aunque no solo, el locus de las inmunoglobulinas (Ye BH y col. 1995, Chen W y col. 1998). Las secuencias heterólogas yuxtapuestas a los alelos traslocados

de BCL-6 llevan a una sobre-expresión de BCL-6 (Ye BH y col. 1995, Chen W y col. 1998). Se detectan reordenamientos de BCL-6 en un 20% de los LDCG asociados al SIDA y, aproximadamente, en un 40% de LDCG en pacientes inmunocompetentes (Bastard C y col. 1992, Ye BH y col. 1993, LoCoco F y col. 1994, Gaidano G y col. 1994).

La región reguladora 5' del gen puede presentar mutaciones de su secuencia. Este es un mecanismo adicional que altera la actividad inhibidora de la transcripción de BCL-6 (Migliazza A y col. 1997). Las mutaciones se producen en un 70% de los LDCG asociados a SIDA y en una proporción similar en los LDCG en pacientes inmunocompetentes (Migliazza A y col. 1995, Gaidano G y col. 1994 y 1997).

La expresión de la proteína BCL-6 (detectada por métodos inmunohistoquímicos) se produce en el 100% de los LB y en el 100% de los LDCGNH asociados al SIDA y esta poco relacionada con los LI asociados al SIDA, donde se detecta tan solo en un 22.2% (Carbone A y col. 1997 y 1998).

La expresión de BCL-6 y CD 138/syndecan-1 (este último es un marcador de diferenciación pre-terminal y terminal de linfocitos B (Sanderson RD y col. 1989, Berfield M y col. 1992, Wijdenes J y col. 1996)) determina dos fenotipos mayores en los LNH asociados al SIDA: BCL-6 +/syn-1 - y BCL-6 -/syn-1 + (Gaidano G y col. 1998).

Estos patrones fenotípicos identifican, en el tejido linfoide normal, áreas del ganglio linfático con poblaciones de linfocitos B en diferente estadio madurativo. Los linfocitos B dentro del centro germinal son BCL-6 +/ syn-1 -, mientras que las células plasmáticas predominantes en áreas interfoliculares son BCL-6 -/ syn-1 + (Sanderson RD y col. 1989, Cattoretti G y col. 1995, Onikuza T y col. 1995, Flenghi L y col. 1995, Wijdenes J y col. 1996).

Estas observaciones sugieren un modelo histogénético para el desarrollo de LNH asociados al SIDA. Los que poseen un fenotipo BCL-6 + / syn-1- (LB y LDCGNH) se originarían de linfocitos B relacionados con el centro germinal, mientras que los casos en los que se observa un fenotipo BCL-6 - / syn-1 + (LI) se generarían en linfocitos B que después de ser procesados en el centro germinal se encuentran en un estadio de maduración más avanzado cercano a las células plasmáticas, es decir, son linfocitos B post-centro germinal (Carbone A y col. 1997 y 1998, Gaidano G y col. 1998). La explicación de que los LB y LDCGNH, distintos fenotípicamente y molecularmente, muestren este mismo patrón fenotípico (BCL-6 + / syn-1 -) puede encontrarse en que las mismas células progenitoras pueden desarrollar distintos tipos de linfomas dependiendo de las vías moleculares por las que hayan sido activadas (Carbone A y col. 1997 y 1998).

Tabla 1. (Gaidano y col. 1998).

Histología	Presentación	Inmunodefíc.	Lesión genética.	Inf.EBV	LMP-1	Inf.HHV-8
Burkitt.	Precoz.	Moderada.	c-MYC	30%	-	-
Cél. Grande.	Tardía.	Marcada.	BCL-6	40%	-	-
Inmunoblástica.	Tardía	Marcada	?	90%	+	-
Linf. Cavidades.	?	Marcada	?	90%	- o raro	100%

Entre los LNH sistémicos asociados al SIDA la expresión de la proteína latente de membrana 1 del VEB (LMP-1) es excluyente con la expresión de BCL-6 y se une al fenotipo BCL-6 - / syn-1 +, sugiriendo que la maduración post-centro germinal es un requerimiento esencial para la expresión de LMP-1 en tumores de linfocitos B (Carbone A y col. 1997 y 1998). También se ha sugerido que la expresión de LMP-1 y BCL-6 esta modulada mutuamente de tal forma que la mayor expresión de uno inhibe la aparición del otro. (Dalla-Favera R y col. 1996).

Los LPSNC se asocian frecuentemente (50%) con mutaciones de la región no codificante reguladora 5' del gen BCL-6 (Migliazza A y col. 1995 y 1997, Gaidano G y col. 1997b y 1998). La expresión de la proteína BCL-6 es detectada en el 100% de los LPSNC en pacientes inmunocompetentes y en el 56,2% de los casos asociados al SIDA (Larocca LM y col. 1998).

A pesar de la frecuencia de mutaciones en el gen BCL-6, los LPSNC parecen estar desprovistos de reordenamientos del gen (LoCoco F y col. 1994, Gaidano G y col. 1994, Carbone A y col. 1998). La razón para la ausencia de reordenamientos del gen BCL-6 en los LPSNC asociados y no-asociados al SIDA permanece sin explicar. Es posible que la combinación de mutaciones en el gen y la infección por el VEB puede ser suficiente para desarrollar linfomas cerebrales en el contexto del SIDA (Larocca y col. 1998).

Al igual que en los LS asociados al SIDA, los LPSNC asociados al SIDA muestran expresión de BCL-6 y LMP-1 mutuamente excluyente y además una menor positividad de BCL-2. Los LPSNC también se dividen en dos grupos basados en el patrón de expresión de BCL-6, LMP-1 y BCL-2. Los LPSNC BCL-6 + / LMP-1 - / BCL-2 - se producen tanto en ausencia como en presencia de infección por VIH estando este fenotipo relacionado con morfología de células grandes no hendidas. Los LPSNC BCL-6 - / LMP-1 + / BCL-2 + se asocian a pacientes infectados por el VIH y están representados por linfomas con morfología inmunoblástica (Larocca LM y col. 1998).

Los LP de la cavidad oral son generalmente Bcl-6 negativos, aunque algunos pueden presentar baja o escasa expresión de esta oncoproteína (Delecluse HJ y col. 1997).

Los LPC asociados al SIDA no expresan BCL-6 (Nador RG y col. 1996, Karcher DS y col. 1997, Carbone A y col. 1998).

1.1.6.3.- p53.

El gen p53 está localizado en el cromosoma 17p13, y su producto es una fosfoproteína de un peso molecular de 53 kd (Greenblatt MS y col. 1994). La proteína p53 tiene una vida media muy corta y se halla en cantidades muy pequeñas en las células normales (Chowdary DR y col. 1994). La proteína p53 se ocupa de controlar el crecimiento mediando la regulación del paso de las fases G1 a S del ciclo celular y la muerte celular por apoptosis. La proteína p53 regula la transcripción de genes mediante su interacción con secuencias específicas del ácido desoxirribonucleico (ADN). Cuando ocurren lesiones en el ADN por radiación o carcinógenos, la acumulación de la proteína p53 produce la parada del ciclo celular en G1, bien para permitir que se repare el daño en el ADN (Kastan MB y col. 1991) o bien, para inducir la muerte por apoptosis de la célula, si la reparación no ha sido posible (Yonish-Rovach E y col. 1991).

Se detecta inactivación de p53 a través de mutaciones puntuales (exones 5 al 9) (Gaidano G y col. 1991 y 1992) en el 50-60% de los LB asociados al SIDA (Ballerini P y col. 1993, Gaidano G y col. 1993, Martin A y col. 1998, Knowles DM. 1999). La inactivación de p53 se observa en una proporción casi doble en este tipo de linfomas en comparación con los tumores de similar histología de enfermos inmunocompetentes (Gaidano G y col. 1991). Salvo en algunos estudios (Nakamura H y col. 1993, Martin A y col. 1998) no se han identificado mutaciones del gen p53 dentro de los LDCG asociados a SIDA en las grandes series europeas y americanas (Ballerini P y col. 1993, Gaidano G y col. 1993). Los pocos

casos publicados de LDCG asociados a SIDA con mutaciones de p53 podrían de hecho ser LtB asociados al SIDA altamente polimorfos. Este grupo de linfomas presenta una morfología de linfomas difusos de células grandes en el contexto de una profunda inmunodeficiencia y poseen un perfil molecular de linfomas de células pequeñas no hendidas asociadas al SIDA, como son mutaciones de p53 y la traslocación del gen ϵ -myc (Carbone A y col. 1995, Gaidano G y col. 1995).

La frecuente asociación entre alteraciones en el gen ϵ -myc y la inactivación de p53 en los LB asociados al SIDA puede tener un efecto sinérgico en el desarrollo de este tipo específico de linfomas (Gaidano G y col. 1992).

Las mutaciones del gen p53 pueden ocurrir en LB asociadas al SIDA con o sin infección de los clones tumorales por el VEB. Se deduce por ello que no hay una correlación directa entre ambas lesiones genéticas (Ballerini P y col. 1993, Gaidano G y col. 1993, Martin A y col. 1998).

Las técnicas inmunohistoquímicas muestran una sobre-expresión de p53 en los LB que varía, según los estudios, entre el 42% y el 60%. En los LDCGNH hay sobre-expresión de p53 en un 30% de casos, no se sobre-expresa en los LI y existe una sobre-expresión de p53 en el 60% de los LDCGA CD-30 + asociados al SIDA (Carbone A y col. 1995 y 1996).

La sobre-expresión de p53 en los LNH asociados al SIDA aparece relacionada en la mayor parte de los casos con mutaciones en el gen. Estas mutaciones producen la inactivación de la proteína (Martin A y col. 1998).

Las mutaciones frecuentemente encontradas en el gen p53 (exones 5 al 9) en los LB no se observan en los LDCGA CD-30 +. Por tanto, en estos últimos linfomas la sobre-expresión de la proteína p53 parece corresponder a la forma salvaje de la misma (Cesarman E y col. 1993, Carbone A y col. 1996).

Los LPSNC y LPC no muestran alteraciones moleculares del gen p53 (Nador RG y col. 1996, Camilleri-Bröet S y col. 1997, Karcher DS y col. 1997).

1.1.6.4.- BCL-2.

El oncogén Bcl-2 presente en el cromosoma 18 puede desarrollar alteraciones en su regulación a través de traslocaciones al cromosoma 14 en el locus de las cadenas pesadas de las inmunoglobulinas (Tsujimoto Y y col. 1985, Weis LM y col. 1987). La proteína Bcl-2 está localizada en la membrana nuclear, retículo endoplasmático liso y membrana externa de las mitocondrias (Krajewski S y col. 1993). Bcl-2 prolonga la supervivencia de las células por inhibición de la apoptosis (Hockenbery D y col. 1990). La proteína Bax es un inductor de la apoptosis, la unión de Bcl-2 a esta proteína inhibe su acción (Yin XM y col. 1994).

Los LPSNC asociados al SIDA frecuentemente expresan altos niveles de la proteína Bcl-2 con ausencia de reordenamiento del gen. Esto esta en relación con la bien conocida capacidad de la proteína LMP-1 del VEB para inducir niveles celulares sostenidos de Bcl-2 (Camilleri-Bröet S y col. 1995).

1.1.7.- Papel de la hiperestimulación antigénica en el desarrollo de los linfomas en los pacientes infectados por el VIH.

El desarrollo de linfomas en pacientes con infección por el VIH esta a menudo precedido por enfermedades linfoproliferativas polimorfas como son la linfadenopatía generalizada persistente (Tenner-Racz K y col. 1986, Pantaleo G y col. 1993) y la hiperglobulinemia policlonal (Schnittman SM y col. 1986, Fauci A y col. 1991). Estas alteraciones indican la presencia de una estimulación crónica de los linfocitos B inducida por antígenos. La relación entre ambos procesos fue documentada de forma precoz en pacientes VIH positivos al describirse en ellos expansiones clonales de linfocitos B en el contexto de la linfadenopatía generalizadas persistente (Pelicci PG y col. 1986).

En la respuesta normal de los linfocitos B al estímulo antigénico, los clones de células B que poseen inmunoglobulinas de superficie celular capaces de responder al estímulo antigénico, son conducidos a proliferar y expandirse clonalmente. La respuesta es, además, modulada por selección de estos clones celulares B que han modificado sus genes variables de las inmunoglobulinas para maximizar su afinidad y avidez por el estímulo

antigénico. A nivel molecular los cambios en los genes variables de las inmunoglobulinas se reflejan en sustituciones de nucleótidos (mutaciones somáticas) que se encuentran en regiones variables del gen de las inmunoglobulinas (Berek C y col. 1993, Jain R y col. 1994).

La relación entre la hiperestimulación de linfocitos B y los LNH asociados al SIDA se ha estudiado en LB (Jain R y col. 1994, Gaidano G y col. 1995). Los estudios de reordenamiento de los genes de las inmunoglobulinas que se han identificado, en estos tumores, muestran una sobre utilización de los genes de las inmunoglobulinas VH4, VH3, VH1, VH5 y VH7. Estos genes están implicados en la generación de clones autoreactivos de linfocitos B (Ng VL y col. 1994, Riboldi P y col. 1994, Bessudo A y col. 1996). El gen VH4, en particular, está asociado con anticuerpos producidos de forma normal y patológica (Pascual V y col. 1992).

Algunos de los tipos de LNH asociados al SIDA podrían ser proliferaciones de linfocitos B polirreactivos (algunos de los cuales reaccionan con proteínas codificadas por el VIH). Las mutaciones, relativamente, aleatorias del gen VH observadas en los genes de las inmunoglobulinas de estos linfomas pueden reflejar un defecto en el mecanismo de control que normalmente produce una eliminación de los clones reactivos para autoantígenos o antígenos virales (Ng VL y col. 1994).

Los anticuerpos anti-VIH producidos en el curso de la respuesta inmune normal posterior a la infección por el VIH revela una aparente sobre utilización de las familias VH1 y

VH4 (Andris JS y col. 1991, Moran MJ y col. 1993, Van der Donk EMM y col. 1994). Personas infectadas por el VIH desarrollan una respuesta inmune humoral persistente frente al virus (Sarnadharan MG y col. 1984, Robinson WEJ y col. 1990). Además, líneas celulares obtenidas de LB asociados al SIDA producen anticuerpos de tipo Ig M contra la glicoproteína gp 160 del VIH (Ng VL y col. 1994).

Un papel directo del VIH ha sido descrito en la producción de linfomas, así se han publicado linfomas de linfocitos T CD 4+ en pacientes con SIDA que mostraban genoma del VIH clonalmente integrado (Hencher B y col. 1992, Mack KD y col. 1997).

Ensayos realizados en cultivos de células del estroma de médula ósea obtenidos del aspirado de pacientes infectados por el VIH enriquecidos con células endoteliales de la microvasculatura del estroma demuestran que estas células están infectadas por el VIH. Al añadir a estos cultivos células procedentes de LB asociados al SIDA, se produce el autotrecimiento de estos linfocitos sin necesidad de la presencia del VEB ni del virus herpes humano tipo 8. Este mecanismo de autotrecimiento parece relacionado con la capacidad del VIH de inducir en células endoteliales del estroma la expresión de CD-40. CD-40, a su vez, aumenta la expresión de la molécula de adhesión de células vasculares (VCAM-1) que también juega un importante papel en el crecimiento de los linfocitos B. La unión entre CD-40 endotelial y el ligando CD-40 (CD-40-L) expresado en los linfocitos B podría tener una influencia sobre la proliferación de los linfocitos B (Moses AV y col. 1997).

Todos estos datos sostienen la hipótesis de que los linfocitos B que van a producir linfomas en pacientes infectados por el VIH están presentes en los estadios de hiperplasia linfoide. La pérdida de control en el crecimiento de estas células, resultado de efectos adicionales a la infección del VIH sobre el sistema inmune del huésped, produciría una expansión clonal de linfocitos B relacionados con inmunoglobulinas polirreactivas que reaccionan con autoantígenos o antígenos del VIH y que escapan al control normal del estímulo antigénico. La estimulación crónica resultaría en una proliferación linfoide policlonal de la que podría desarrollarse un proceso monoclonal (Ng LV y col. 1998).

Todos estos hallazgos indican que los LNH asociados al SIDA están caracterizados por la acumulación de múltiples lesiones genéticas que se producirían en un periodo de 4 a 6 años entre la infección por HIV y el desarrollo del linfoma.

1.2.-EL VIRUS DE EPSTEIN-BARR.

El VEB es un herpesvirus que pertenece a la subfamilia Gammaherpesvirineae y al género Linfocriptovirus. El VEB puede infectar, establecer latencia, inducir proliferación en los linfocitos B (Kieff E. 1996) y aumentar la producción de inmunoglobulinas (Rosen A y col. 1977). Infecta al 90% de la población mundial. La mayoría de los individuos toman contacto con el virus en la niñez o adolescencia, y el virus permanece latente toda la vida en una pequeña proporción de linfocitos B y en células epiteliales de la orofaringe y de las glándulas salivares (Schlossberg D.1989, Miller G. 1990a).

El VEB esta asociado con un amplio número de enfermedades malignas y benignas que incluyen: mononucleosis infecciosa (Henle W y col. 1979), enfermedad de Hodgkin (Miller G y col. 1990), linfoma de Burkitt (Zur H y col. 1970, Miller G. 1990), carcinoma nasofaríngeo (Zur H y col. 1970, Wolf H y col. 1973, Young LS y col. 1988), leucoplasia florida oral (Greenspan JS y col. 1985), enfermedades linfoproliferativa post-transplante (Swerdlow SH. 1992, Craig FE y col. 1993), linfomas en SIDA (Hamilton-Dutoit HJ y col. 1991b, Carbone A y col. 1993, Ballerini P y col. 1993) y linfomas de células T periféricos (Jaffe ES.1996a). Dennis Burkitt describió en 1958 las características clínicas y patológicas del linfoma que lleva su nombre y afectaba a niños africanos planteando ya la posibilidad de que esta enfermedad estuviera en relación con un virus (Burkitt D. 1958). Epstein, Achong y Barr detectaron posteriormente partículas del virus en muestras de uno de esos tumores africanos (Epstein MA y col. 1964).

1.2.1.- Características estructurales.

El VEB es un virus ADN con una gran envoltura icosaédrica de 150 nm de diámetro. Su core esta formado por un ADN unido a proteínas rodeado por un nucleocápside de 162 capsómeros a su vez rodeada por una envoltura externa que contiene abundantes glicoproteínas. Entre las proteínas que constituyen la cápside del VEB las de mayor tamaño pesan 160, 47 y 28 kDa. La envoltura externa muestra 4 glicoproteínas y 2 proteínas no-glicosiladas: gp350/220, gp250/200, gp115, gp85, p160 y p140 (Thorley-Lawson DA. 1988).

El VEB difiere de otros herpesvirus en que su capa externa esta compuesta predominantemente de la glicoproteína, gp350/220.

El genoma del VEB es un gran ADN lineal con doble cadena de 172-kb y un alto porcentaje de G+C (59%) (Baer R y col. 1984). Consta de una secuencia corta única de 10 kb (US) seguida por una secuencia de repeticiones internas de 40 kb (IR-1) y otra gran secuencia única aproximadamente de 120 kb de longitud que esta dividida en varios elementos repetitivos de menor tamaño (IR-2, IR-3, IR-4). El genoma contiene además, en ambos extremos, unas secuencias repetidas terminales de 0.5 kb. Ya que, cada virus difiere en la frecuencia de la repetición de estas secuencias y mantiene sus características en las sucesivas repeticiones, esta propiedad puede ser usada para identificar diferentes tipos y la clonalidad del virus (Hudson GS y col. 1985). Después de la infección de la célula huésped, el genoma viral se hace circular formando enlaces covalentes entre las dos secuencias terminales repetidas constituyendo un episoma localizado en el núcleo (Yates JL y col. 1985), del que pueden encontrarse entre 10 y 30 copias. La integración en el ADN del huésped se produce muy pocas veces.

El genoma del VEB puede producir entre 100 y 150 productos genéticos que se dividen en cuatro clases: proteínas de la fase latente, proteínas de la fase replicativa precoz-inmediata, proteínas de la fase replicativa precoz y proteínas de la fase tardía. 11 genes se expresan durante la infección latente. 2 pequeños ácidos ribonucleicos (ARNs) denominados EBER-1 y EBER-2, son los ARNs más abundantes producidos por el virus durante la fase

latente, 6 antígenos nucleares (EBNA-1, -2, -3A, -3B,-3C y -LP) y tres proteínas de membrana (LMP-1, -2A y -2B) (Knutson JC y col. 1989).

La proteína EBNA-1 del VEB es la única necesaria para la replicación del ADN viral en la fase latente (Gutierrez MI y col. 1998). El resto de las proteínas requeridas son producidas por la célula huésped. El inicio de la replicación del ADN se realiza en la zona denominada oriP. EBNA-1 se une a las dos zonas que forman oriP para iniciar la replicación de ADN.

Existen dos tipos diferentes de virus que se diferencian en las secuencias de los genes implicados en la infección latente: VEB-1 o A y VEB-2 o B. La diferencia mayor se produce en el gen EBNA-2 siendo la secuencia primaria de aminoácidos de EBNA-2 idéntica solo en un 56% (Sixbey JW y col. 1989, Jilg W y col. 1990). También puede realizarse el tipaje del virus estudiando las variaciones en las secuencias de los genes EBNA 3A, 3B y 3C (Samples J y col. 1990). La detección simultánea de ambos tipos de virus en el mismo paciente indica que la infección por un tipo de VEB no evita la infección por el otro tipo (Sixbey JW y col. 1989).

Estudios de seroprevalencia han demostrado que el tipo 2 de VEB es inusual en la población sana de occidente pero relativamente frecuente en Africa central y Nueva Guinea (Zimmer U y col. 1986). Los sujetos infectados por VIH pueden infectarse tanto por el virus tipo 1 como por el tipo 2, además ambos tipos de virus han sido encontrados en linfomas

asociados al SIDA (Boyle MJ y col. 1991, Shibata D y col. 1993). Los dos tipos de virus pueden jugar un papel oncogénico en el contexto de una deficiencia del sistema inmune. En los pacientes con linfomas asociados al SIDA existe un mayor porcentaje de infección por el VEB tipo 2 que en la población general (Sixbey JW y col. 1989, Boyle MJ y col. 1991, Borich B y col. 1992 a). La presencia de coinfecciones con los tipos 1 y 2 del VEB ha sido observada tanto en los individuos VIH positivos (Sculley TB y col. 1990, Buisson M y col. 1994, Yao QY y col. 1996) como en la enfermedad de Hodgkin pediátrica (Weinreb M y col. 1996, Santon A y col. 1998).

El tipaje del VEB realizado mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), sobre ADN extraído de células mononucleares de sangre periférica ha demostrado una alta prevalencia del VEB tipo 2 y de coinfecciones en pacientes VIH positivos con y sin linfoma. Esta infección se produce precozmente en este grupo de enfermos. Además, los autores de este estudio concluyen que la infección por el VEB tipo 2 y las coinfecciones no aumentan el riesgo de desarrollar LNH asociados al SIDA. También encuentran una alta prevalencia del VEB tipo 2 en la población homosexual (van Baarle B y col. 1999).

Líneas celulares linfoblastoides generadas in vitro por infecciones con el tipo 2 del VEB crecen peor que las células transformadas por el tipo 1 (Rickinson AB y col. 1987), además el tipo 2 del VEB es menos eficaz que el tipo 1 para desarrollar tumores en ratones con el síndrome de inmunodeficiencia combinada severa (Rowe M y col. 1991).

1.2. 2.- Transmisión.

El VEB se transmite a través de la saliva por contacto bucal o por partículas de aerosol (Chang RS y col. 1973, Klein G. 1975). También puede ser infectivo por transfusiones y trasplantes de órganos (Purtilo DT y col. 1980). La infección inicial ocurre en las células epiteliales de la orofaringe (Sixbey JW y col. 1984). Durante la etapa de infección productiva en las células epiteliales de la orofaringe y nasofaringe los linfocitos B que están en estos tejidos también se infectan. En los linfocitos B el virus permanece, generalmente, en forma de infección latente y solo ocasionalmente entra en ciclo replicativo en el que puede infectar otros linfocitos o reinfectar células epiteliales. El reservorio predominante del VEB es el sistema linfático (Pagano JS y col. 1992).

1.2.3.- Latencia.

Estudios sobre la expresión genética del VEB en cultivos celulares y muestras de biopsias de tumores humanos han identificado tres formas distintas de infección latente o tres diferentes tipos de latencia del virus (Rowe M y col. 1992). Las líneas celulares linfoblastoides, obtenidas infectando linfocitos con VEB in vitro, que produce la immortalización de los mismos, expresan 6 antígenos nucleares (EBNA 1, 2, 3A, 3B, 3C y LP) y 3 proteínas latentes de membrana (LMP 1, 2A y 2B). En estas células también se expresan un alto número de copias de EBERs 1 y 2 (Howe JG y col. 1986, Kieff E y col. 1990). En las líneas celulares linfoblastoides los 6 EBNA son generados en un gran ARN originado

de uno o dos promotores localizados en el extremo izquierdo del genoma viral lineal BamHI C o BamHI W (Cp o Wp) (Kieff E y col. 1990). Esta forma de latencia recibe el termino de latencia tipo III y es la que se observa en los procesos linfoproliferativos asociados a inmunodeficiencia (Young LS y col. 1989, Thomas JA y col. 1990).

La expresión de EBNA 1, LMPs y EBERs constituye la forma de latencia tipo II. Esta forma de latencia se expresa en un grupo de carcinomas de nasofaringe y también en los casos de Linfomas Hodgkin asociados al VEB (Young LS y col. 1988, Herbst H y col. 1993, Deacon EM y col. 1993).

La latencia de tipo I caracteriza al LB y en ella solo hay expresión de EBNA 1 y EBERs (Rowe DT y col. 1986). En las formas de latencia tipo I y II el origen de la transcripción de EBNA 1 se realiza en un promotor situado cerca de EBNA 1, el fragmento BamHI F del genoma de VEB (Fp) (Sample J y col. 1991).

Después de la infección in vitro de los linfocitos B, la expresión de los productos genéticos del VEB en su fase latente muestra un patrón temporal. EBNA-LP y EBNA-2 son los más precoces en aparecer alcanzando niveles máximos sobre las 24 horas. EBNA-1, -3A, -3B, -3C y LMP-1 se expresan mas tardíamente y llegan a detectarse a las 24 horas. EBER-1 y -2 alcanzan su máxima expresión a las 36 horas (Sugden B. 1989).

EBNA-1 es una proteína de tamaño variable de entre 60 y 85 kDa. Posee tres funciones importantes: activación de la transcripción, replicación de ADN viral y conservación del mismo. EBNA-1 esta fosforilada en sus residuos de serina, este hecho puede ser importante para su funcionamiento. EBNA-1 interactua con oriP y funciona como un iniciador y finalizador de la replicación del ADN (Yates JL y col. 1984). Esta proteína se asocia con cromosomas en la metafase y puede jugar un papel en la correcta división de los episomas de VEB en las células hijas de los linfocitos después de la división celular. Para realizar su función la proteína EBNA-1 requiere múltiples lugares de unión y dominios, esto sugiere que para su funcionamiento necesita interactuar con otras proteínas celulares.

EBNA-2 es una proteína fosforilada que es esencial para que se produzca la immortalización del linfocito B (Hammerschmidt W y col. 1989). La estructura de la proteína es diferente en los dos tipos de EBV; el tipo-1 pesa 90 kDa y el tipo 2 78 kDa. Los mismos dominios de EBNA-2 que son necesarios para la immortalización de linfocitos B son esenciales para la transactivación de los genes virales LMP-1, LMP-2A y -2B, y celulares CD21, CD23 y c-fgr (Wang F y col. 1990). Durante la primera fase de la infección, EBNA-2 se transcribe por medio del promotor Wp, en fases posteriores cambia al promotor Cp (Speck SH y col. 1989). El resultado es una curva de autoestimulación de la expresión del gen durante la latencia.

EBNA-3A, -3B y -3C poseen pesos moleculares de entre 135 y 165 kDa, se localizan en el núcleo y se desconoce su función.

EBNA-LP o EBNA-4 posee un tamaño variable de entre 20 a 130 kDa dependiendo del tipo de célula infectada. La proteína esta fosforilada en múltiples sitios. Se asocia con RNA nucleares de virus y puede tener un papel en su procesamiento.

LMP-1 es una proteína viral análoga a la familia de los receptores TNF en las células humanas. La vida media de esta proteína es de 2 a 5 horas que aumenta a 16 ó 20 horas cuando LMP-1 se asocia con el citoesqueleto (Moorthy RK y col. 1990). Esta situada en la membrana celular con un dominio de 24 aminoácidos intracitoplasmáticos, seguidos por seis dominios intramembranosos y un extremo carboxilo terminal intracitoplasmático de 200 aminoácidos (Liebowitz D y col. 1986).

El extremo carboxilo terminal es importante para la vida media de la proteína y su efecto oncogénico (Izumi K y col. 1994). Este extremo intracelular se liga a proteínas intracelulares llamadas factor asociado al receptor de TNF (TRAFs), al unirse ambas proteínas se transmite la señal de crecimiento celular por activación del factor nuclear kB (NF-kB) que libera su factor inhibidor kB, de este modo se produce la proliferación celular (Liebowitz D y col. 1993, Mosialos G y col. 1995, Kaye KM y col. 1996, Devergne O y col. 1996). Este mecanismo de activación se ha demostrado en muestras de tejidos procedentes de LNH asociados a SIDA y en la enfermedad linfoproliferativa post-transpante (Liebowitz D. 1998).

LMP-1 es capaz de transformar fibroblastos, producir tumores en ratones desnudos (Wang D y col. 1985) y alterar el crecimiento de células stem multipotenciales

hematopoyéticas y células epiteliales (Hu L y col. 1993). Es también esencial para el crecimiento y transformación de linfocitos B (Henderson S y col. 1991, Peng M y col. 1991, Kaye KM y col. 1993).

La delección de 30 pb del extremo 3' del gen LMP-1 (del-LMP-1), que se corresponde con los aminoácidos 346 a 355 de la proteína, se ha detectado en numerosos tumores relacionados con el VEB (Hudson G y col. 1985, Knecht H y col. 1993a, Sandvej K y col. 1994). Cepas con del-LMP-1 se observaron por primera vez en carcinomas nasofaríngeos en China (Hu LF y col. 1991). También se ha observado en un subgrupo de enfermedad de Hodgkin (Knecht H y col. 1993b, Sandvej K y col. 1995) y en linfomas de Burkitt y tejido linfoide reactivo infectados por el VEB (Sandvej K y col. 1994, Chen WG y col. 1996).

La presencia de cepas con delección del gen LMP-1 se asocia con agresividad histológica en carcinomas nasofaríngeos y en la enfermedad de Hodgkin (Knecht H y col. 1993, Santon A y col. 1995). En España se ha observado una mayor incidencia de dichas cepas en la enfermedad de Hodgkin pediátrica (Santon A y col. 1998).

La delección de 30 pb determina una prolongación en la vida media de la proteína (Moorthy RK y col. 1993). Este hecho puede acentuar el efecto oncogénico y transformante de la proteína LMP-1. Así, se ha demostrado que la proteína del-LMP-1 es más eficaz en la producción de tumores que la proteína salvaje en ratones desnudos o ratones con inmunodeficiencia combinada severa (Chen M y col. 1992, Hu L y col. 1993).

En los LNH asociados al SIDA algunos estudios demuestran una alta incidencia de cepas con delección del gen LMP-1 (89%-100% en enfermedad de Hodgkin y 50% a 79% en linfomas no-Hodgkin). En los mismos grupos de linfomas de la población VIH negativa, los porcentajes de la presencia de la cepa delecionada son menores (32% en la enfermedad de Hodgkin y del 43% en linfomas no Hodgkin) (Knecht H y col. 1993, Santon A y col. 1995, Bellas C y col. 1996).

El significado de la delección del gen LMP-1 en la enfermedad linfoproliferativa postransplante es aún más controvertido. Aunque, en general, no parece encontrarse relación entre la presencia de la delección y la morfología o clonalidad y supervivencia de los pacientes con enfermedad linfoproliferativa post-transplante (Smir BN y col. 1996, Kingma DW y col. 1996, Scheinfeld AG y col. 1997). La incidencia de cepas delecionadas en las diferentes categorías de la enfermedad linfoproliferativa post-transplante, muy probablemente, refleje la frecuencia de las cepas deLMP-1 en la población general (Smir BN y col. 1996).

Se ha observado una alta prevalencia de deLMP-1 tanto en LB como en personas sanas VEB sero positivas y en tejidos linfoides reactivos de la población sana de Brasil (Chen WG y col. 1996). Otros estudios tampoco han encontrado una mayor incidencia de deLMP-1 en tumores asociados a VEB que la existente en la población sana de esa zona geográfica (Khanim F y col. 1996).

La presencia de infecciones dobles del VEB con ambas cepas LMP-1 salvaje y delecionada del gen LMP-1 (infección dual) es un hecho frecuente tanto en niños sanos como en la población pediátrica con enfermedad de Hodgkin en España (Santon A y col. 1998). Esta doble infección también ha sido descrita, aunque con menor frecuencia, en pacientes inmunocompetentes y en pacientes infectados por el VIH (Cheung ST y col. 1996, Chen HL y col. 1996, Knecht H y col. 1996, Yao QY y col. 1996, Dolcetti R y col. 1997).

La LMP-1 induce la expresión de marcadores de activación celular (CD-23, CD-30, CD-40), moléculas de adhesión (LFA-1, LFA-3, ICAM-1), CD-30 y del oncogén Bcl-2 (Wang D y col. 1988, Henderson S y col. 1991, Hamilton-Dutoit SJ y col. 1993, Kanavaros P y col. 1993, Camiller-Bröet S y col. 1995).

Los EBERs se expresan en cualquier célula infectada de forma latente por el VEB, salvo en las células epiteliales de la leucoplasia florida oral (Gilligan K y col. 1990). El gen que codifica los EBERs está localizado en un extremo del genoma de VEB se expresa precozmente durante la infección latente del VEB y codifica un pequeño ARN mensajero que es expresado en unos 10 millones de copias por célula infectada (Rooney C y col. 1989). Contiene regiones para el control de la polimerasa II y III. Se localizan en el núcleo y en el citoplasma íntimamente asociados al retículo endoplasmático rugoso de las líneas celulares linfoblastoides inmortalizadas por VEB y en algunas células del LB.

Los niveles de expresión de EBERs pueden mostrar variabilidad de célula a célula (Herbst H y col. 1992, Niedobitek G y col. 1992). Esta variabilidad junto a un cierto grado de degradación del ARN en los tejidos procesados rutinariamente, puede explicar la ausencia de señal en una proporción de las células tumorales. Algunos autores consideran que para que un linfoma se considere asociado al VEB, al menos, el 80% de las células neoplásicas deben expresar EBERs (Korbjuhn P y col. 1992) Este porcentaje, sin embargo, es arbitrario y otros porcentajes han sido utilizados en otros estudios (Niedobitek G y col. 1995).

1.2.4.- Métodos de detección.

Cinco métodos son los más útiles:

1.- Hibridación por "Southern Blot" mediante la utilización de fragmentos clonados de ADN del VEB.

2.- Hibridación "in situ" mediante la utilización de sondas correspondientes a diferentes regiones del ADN del VEB y mediante oligonucleótidos complementarios de los EBERS.

3.- Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

4.- Desarrollo de líneas celulares linfoblastoides positivas para el VEB.

5.- Inmunohistoquímica para reconocimiento de proteínas virales.

El método de "Southern Blotting" permite determinar la clonalidad del virus (Raab-Traub N y col. 1986).

La prueba de Southern blot requiere una gran cantidad de ADN de alto peso molecular que no puede ser obtenido del material incluido en parafina.

También la presencia de genoma de VEB puede estudiarse por hibridación "in situ" usando sondas específicas constituidas por fragmentos de ADN correspondientes a la región Bam HI-W del virus. Estos fragmentos pueden estar radiomarcados (Weiss LM y col. 1989, Randhawa PS y col. 1991) o biotinilados (Kanavaros P y col. 1992).

La sensibilidad y especificidad de la hibridación "in situ" utilizando material incluido en parafina para la detección de ADN del VEB en linfomas relacionados con SIDA es semejante a la prueba de Southern blotting (Hamilton-Dutoit SJ y col. 1991a).

Numerosos estudios han descrito protocolos con PCR para detectar genoma del VEB en tejidos. Muchos autores han seleccionado las secuencias de Bam HI-W para su amplificación (Saito I y col. 1989, Knecht H y col. 1990). También se han ampliado secuencias correspondientes al gen EBNA-1 (Shibata D y col. 1991). Otros artículos describen protocolos de PCR para ampliaciones de las regiones EBNA 2 A y 2B (Bam HI-Y) para

tipificar los tipos de VEB 1 y 2 que constituye una herramienta molecular de interés epidemiológico (Sixbey JW y col. 1989, Jigl W y col. 1990). Otra región del genoma del VEB útil para distinguir los dos tipos de virus es el gen EBNA 3C (Sample J y col. 1990, Santon A y col. 1998).

También es muy útil la técnica de PCR para determinar la presencia de cepas con la delección de 30 pb del gen de la proteína LMP-1 (Santón A y col. 1998).

Se puede determinar, así mismo, la clonalidad del VEB en muestras de tumores amplificando mediante PCR la porción del gen LMP-1 que contiene repeticiones de 33pb. Estas regiones contienen de 3 a 7 repeticiones (Ometto L y col. 1997).

1.2.5.- El VEB y los LNH asociados al SIDA.

La infección por el VEB ha sido, durante mucho tiempo, considerada como un factor crítico en el desarrollo de los LNH asociados al SIDA. La reactivación de la infección por el VEB es común que se produzca en pacientes con SIDA. Se ha demostrado que el número medio de células infectadas por el VEB con capacidad de crecer espontáneamente "in vitro" aumenta en estos pacientes (Birx DL y col. 1986, Katz BZ y col. 1991).

Se identifica genoma del VEB en un 30% de los LB asociados al SIDA (Gaidano G y col. 1998). La infección por el VEB en este proceso se considera que es un factor de

predisposición para el posterior desarrollo de linfoma en el contexto de una linfadenopatía generalizada persistente (Shibata D y col. 1991). Los LB asociados al SIDA VEB positivos, generalmente, no expresan EBNA-2 y LMP-1 que son claves para inducir la transformación de los linfocitos B (Carbone A y col. 1993a). La activación de c-myc suele suprimir la expresión de EBNA-2 (Davi F y col. 1998). Estas observaciones sugieren que el VEB no es el principal factor en la patogenia de este tipo de linfomas, aunque en asociación con otros factores pueden contribuir al desarrollo de dicha proliferación linfoide (Gaidano G y col. 1998).

Aproximadamente, en un 80% de los LDCG asociados al SIDA se encuentra genoma del VEB (Hamilton-Dutoit SJ y col. 1991a y 1993a, Ballerini P y col. 1993, Carbone A y col. 1993).

Los LDCG, frecuentemente, expresan la LMP-1 y en algunos casos, también, EBNA-2 por tanto el VEB podría jugar un papel en la patogenia de estos linfomas (Hamilton-Dutoit SJ y col. 1991a y 1993a, Carbone A y col. 1993). Entre las variantes de los linfomas difusos de células grandes existe una mayor frecuencia de infección por el VEB y expresión de LMP-1 en los LI que en los LDCGNH (Gaidano G y col. 1998).

Los LDCG parecen desarrollarse como una proliferación linfoide inducida por el VEB en un contexto de alteración de la respuesta inmunocitotóxica frente al VEB (Rowe M y col. 1991). De hecho, se ha demostrado que la disminución de linfocitos T citotóxicos específicos contra el VEB y el incremento en la carga viral se correlacionan con la progresión de estos

linfomas (Kertein MJ y col. 1997). Se ha demostrado, en modelos experimentales animales, el papel de las condiciones inmunitarias del paciente en el desarrollo de linfomas mediante la utilización de ratones con inmunodeficiencia combinada severa a los que se inoculan linfocitos de sangre periférica de donantes VEB positivos o extractos de muestras procedentes de enfermos con linfoma de Hodgkin, observándose que estos ratones desarrollaron distintos tipos de enfermedades linfoproliferativas. El análisis molecular e inmunohistoquímico de estas proliferaciones linfoides demostró, en todas ellas, la existencia de material genético del VEB (Rowe M y col. 1991, Kapp U y col. 1993).

Se ha encontrado asociación entre el VEB y los LP de la cavidad oral en el 60% de los casos. En todos se observaba expresión de EBERs en las células tumorales en ausencia de expresión de EBNA-2. En un 34% de casos se acompaña de la expresión de la proteína LMP-1 (Delecluse HJ y col. 1997).

Prácticamente todos los LPSNC asociados al SIDA albergan infección por el VEB. Esta es la única alteración genética detectada en este tipo de linfomas. La infección por el VEB en LPSNC asociados al SIDA esta unida a la expresión de antígenos transformantes codificados por el VEB. La LMP-1 se observa en aproximadamente un 50% de casos, sugiriendo un papel oncogénico del virus en la patogénesis de la enfermedad (MacMahon EME y col. 1991, Camilleri-Bröest S y col. 1995 y 1997).

Los LPC asociados al SIDA muestran una fuerte vinculación con el VEB y también con la infección por el Herpesvirus asociado al sarcoma de Kaposi (KSHV) o Herpesvirus humano 8 (HHV-8) (Cesarman E y col. 1995, Karcher DS y col. 1995). El papel que juega cada uno de estos virus en el desarrollo de estos tipos de linfomas no es bien conocido todavía. Parece que las interacciones entre los dos virus podría tener un papel en el desarrollo de la neoplasia. En el 20% de linfomas de cavidades no se detecta genoma del VEB, mientras que en todos ellos se demuestra ADN de HHV-8. Puede ser que, en muchos casos, el VEB contribuya a la activación del HHV-8, posiblemente aumentando la replicación de HHV-8 en las células neoplásicas (Cesarman E y col. 1995).

OBJETIVOS

2.- OBJETIVOS.

Los LNH constituyen la segunda neoplasia más frecuente que se desarrolla en los pacientes con SIDA.

Estos linfomas son un grupo heterogéneo tanto desde el punto de vista morfológico, como fenotípico y molecular. A pesar de estas diferencias los LNH asociados al SIDA tienen una serie de características comunes: alta incidencia de localización extranodal, alto grado histológico, crecimiento difuso, estirpe B, comportamiento clínico agresivo y frecuente asociación con el VEB.

Diferente oncogenes han sido relacionados con el desarrollo de este grupo de linfomas. Los más estudiados son c-myc, p53, Bcl-6, Bcl-2 y el oncogén LMP-1 del VEB.

Dos teorías han sido postuladas para explicar el desarrollo de linfomas en pacientes con SIDA. Un mecanismo sería a través de la hiperestimulación antigénica y otro sería secundario a la infección por el VEB.

Basándonos en estos datos los objetivos planteados en el presente estudio son los siguientes:

1. Estudiar algunas de las características clínicas de los pacientes infectados por el VIH que desarrollaron estos linfomas, como son: sexo, edad, grupo de riesgo, localización inicial de la neoplasia y el número de células CD-4 por μL en el momento de aparición del linfoma.
2. Clasificar los LNH por su localización en LS y LPSNC. Clasificar los LNH por su fenotipo en linfomas de estirpe B y linfomas de estirpe T. Los linfomas B se subtipificaron en LB, LDCGNH, LI, LDCG CD-30+.
3. Correlacionar los distintos tipos de linfomas con su localización y número de células CD-4 por μL en el momento del diagnóstico.
4. Estudiar en cada grupo de linfomas las características inmunohistoquímicas en cuanto a expresión de CD-20, CD-3, CD-40, patrón de expresión de las cadenas ligeras kappa y lambda y el índice de proliferación (Mib-1).
5. Relacionar la expresión de los oncogenes p53, Bcl-6, Bcl-2 y LMP-1 con cada tipo de linfomas.
6. Analizar la presencia del VEB a través de la expresión de EBERs y de la proteína LMP-1 en cada grupo de linfomas.

7. Tipar el VEB presente en cada grupo de linfoma y comparar la prevalencia del VEB-1 y VEB-2 en cada uno de estos tipos de linfomas y compararlo con una población control.

8. Determinar la frecuencia de asociación de la cepas del VEB caracterizada por la delección de 30 pb en el extremo 3' del oncogén LMP-1 en los distintos grupos de LNH asociados al SIDA y comparar los resultados con los obtenidos en una población control.

MATERIALES Y MÉTODOS

3.- MATERIALES Y MÉTODOS.

3.1.-MATERIAL.

El material del presente estudio esta constituido por 61 casos de linfomas desarrollados en pacientes con infección por el VIH. Los casos fueron recogidos entre 1986 y 1998 en los hospitales Ramón y Cajal y Clínico San Carlos de Madrid. En las historias clínicas se valoraron la edad, el sexo, el grupo de riesgo, la localización del linfoma y el número de células CD-4/ μ l en sangre periférica en el momento del diagnóstico del linfoma. Todas las muestra corresponden a biopsias afectadas por linfomas de diferentes localizaciones, ganglionares y extraganglionares, previas al tratamiento, fijadas en formol e incluidas en parafina.

Se utilizaron, además 50 controles constituidos por patologías benignas de pacientes adultos sin infección por el VIH. Dichos controles correspondían a 7 amígdalas reactivas, 16 linfadenitis reactivas y linfocitos periféricos de 27 casos de mononucleosis infecciosas. En todos los casos de la población control, excepto en 10, se estudió material fresco.

3.2.- CLASIFICACIÓN Y ESTUDIO MORFOLÓGICO.

El diagnóstico morfológico se realizó en biopsias fijadas en formol e incluidas en parafina utilizándose para ello secciones de 4 μ m teñidas con hematoxilina y eosina.

Los LNH asociados al SIDA se dividieron en tres categorías de acuerdo con el lugar de origen anatómico (Gaidano G y col.1995, Jaffe ES y col. 1996, Knowles D. 1997).

a) Linfomas sistémico (LS) (nodal o extranodal).

b) Linfomas primarios del Sistema Nervioso Central (LPSNC).

c) Linfomas primarios de cavidades (LPC).(En nuestra serie no incluimos ningún caso de este tipo de linfoma)

Los LS se tipificaron a su vez en: LB y LDCG; estos a su vez se clasificaron en LI y LDCGNH (Knowles DM y col.1988, Ioachim HL y col. 1991, Levine AM.1993, Carbone A y col. 1993a, Harris NL y col. 1994. Gaidano G y col. 1995, Knowles DM. 1997).

Los criterios morfológicos que se utilizaron para la clasificación histológica fueron los de la Organización Mundial de la Salud (OMS) (Harris NL y col. 1999).

El LB es una neoplasia de células de mediano tamaño núcleos redondos y uniformes con 2 a 5 nucleolos. El Lt-B muestra células pequeñas con núcleos no hendidos, junto a células grandes de núcleos no hendidos con 1 a 2 nucleolos eosinófilos y presencia de diferenciación plasmocitoide. Algunos Lt-B muestran marcado pleomorfismo celular y puede ser necesario estudiar la existencia de la traslocación del gen c-myc para su

diagnóstico. Si esto no es posible los Lt-B se definen como linfomas que recuerdan a los LB pero tienen un mayor pleomorfismo y células grandes junto con índice de proliferación mayor del 99%. Siguiendo los criterios de Davi HJ y colaboradores, que consideran los Lt-B asociados al SIDA como una variante morfológica e inmunofenotípica de los LB asociados al SIDA (Davi HJ y col. 1998), en nuestro trabajo los Lt-B y LB están agrupados bajo el término de LB.

En los LDCGNH las células son grandes y cohesivas, pueden acompañarse de patrón en “cielo estrellado” y tener diferenciación plasmocitoide.

Los LI son polimorfos; distinguiéndose dos grupos morfológicos uno de ellos constituido por una proliferación de inmunoblastos de mediano tamaño con diferenciación plasmocitoide y otro caracterizado por una proliferación de inmunoblastos grandes sin diferenciación plasmocitoide con células multinucleadas tipo Reed-Sternberg.

Las características morfológicas de los LDCGA CD-30+ asociados al SIDA son la presencia de células grandes pleomórficas con abundante citoplasma y núcleos de formas irregulares que poseen uno o más nucleolos, alta actividad mitótica y células multinucleadas que recuerdan a las células de Reed-Sternberg, fibrosis y numerosos macrófagos entremezclados con las células tumorales. La expresión del antígeno CD-30 es necesario en

todas o casi todas las células neoplásicas para el diagnóstico de este tipo de linfomas (Carbone A y col. 1996).

En nuestro estudio incluimos como un grupo aparte los LDCG que expresaban el antígeno CD-30. Este grupo incluye LDCGNH, LI y LDCGA CD-30 +. La razón por la que separamos este grupo esta relacionada con la alta asociación de la expresión de CD30 con la presencia de genoma del VEB y sobretodo con la expresión de LMP-1 (Kanavaros P y col. 1992).

La gran mayoría de los LPSNC asociados al SIDA son linfomas difusos de células grandes y dependiendo de la presencia de rasgos inmunoblásticos plasmocitoides se pueden dividir en linfomas de células grandes tipo centroblástico y linfomas inmunoblásticos plasmocitoides (Jellinger KA y col. 1992, Camilleri-Bröet S y col. 1997).

3.3.-ESTUDIO INMUNOHISTOQUÍMICO.

3.3.1.-Técnicas inmunohistoquímicas.

Los anticuerpos empleados en este estudio fueron: CD-30, CD-40, CD-20, CD-3, kappa, lambda, Mib-1, p-53, Bcl-2, Bcl-6 y LMP-1 (CS1-4). Su reactividad y procedencia aparecen reflejados en la tabla.2.

Tabla:2.-Anticuerpos.

Anticuerpo.	Procede.	Reactividad.
CD-20.	Dako.	Células B.
CD-3 policlonal.	Dako.	Células T.
CD-30.	Dako.	Antígeno Ki-1.
CD-40.	Novocastra.	Células B activadas.
Kappa.	Dako.	Células B.
Lambda.	Dako.	Células B.
Mib-1.	Dako.	Antígeno Ki-67 (Células proliferativas).
p-53.	Novocastra.	Proteína p53 (salvaje y mutante).
Bcl-6.	Novocastra.	Proteína bcl-6.
Bcl-2.	Dako.	Proteína bcl-2.
LMP-1.	Novocastra.	Proteína latente de membrana del VEB.

La detección inmunohistoquímica se realizó sobre secciones de tejido fijado en formol e incluido en parafina mediante la técnica inmunohistoquímica estándar tipo complejos estreptavidina(E)-biotina(B) (Dako ChemMate TM LSAB detection Kit peroxidase/DAB code N° K500. Glostrup, Denmark). (Cattoreti G y col. 1988).

Las secciones de parafina de (3-4 µm) se montaron sobre portas tratados con poli-L-lisina, se desparafinaron con xilol y se rehidrataron de forma secuencial en etanol al 100%, al

96%, al 80%, al 70% y finalmente en agua. Para inhibir la peroxidasas endógena las secciones se trataron con una solución fresca de agua oxigenada al 5% en metanol durante 10-15 minutos.

Para realizar el desenmascaramiento antigénico se realizó un tratamiento previo a la inmunotinción (Shi SR y col. 1991) consistente en sumergir las preparaciones en un tampón de citrato sódico 0,01 M pH 6 y procesarlos en olla a presión durante un tiempo variable que osciló entre 1 y 3 minutos.

Se utilizaron dos métodos inmunohistoquímicos diferentes:

a) Técnica de estreptavidina-biotina:

Se realizó la técnica estándar tipo Complejos estreptavidina-biotina (LASB) (DAKO ChemMate-TM LSAB detection Kit Peroxidase/ DAB code No K500. Glostrup, Denmark). Tras la incubación con el Ac primario, diluido adecuadamente en tampón tris-salino (TBS) a pH 7,4 durante 30 minutos en cámara húmeda, la inmunotinción se realizó con un suero biotinilado antiinmunoglobulinas de ratón, seguido de la aplicación de estreptavidina marcada con peroxidasa (Strep AB HRP) y como cromógeno diaminobencidina (DAB), finalmente, las secciones histológicas se contrastaron con hematoxilina de Mayer.

El proceso de inmunotinción se hizo en el sistema automatizado TECHMATE 500/DAKO.

b) Técnica de FAAFA.

Tras el tratamiento de desparafinación y rehidratación, las preparaciones se lavaban con TBS, para luego incubarlas con el Ac primario óptimamente diluido durante 30 minutos. De nuevo se lavaban con TBS y seguidamente se incubaban con el Ac secundario (suero de conejo anti-ratón) diluido 1/50 durante 30 minutos. A continuación se aplicaba el complejo inmunofosfatasa alcalina anti-fosfatasa alcalina diluido al 1/50 durante 30 minutos.

3.3.2.-Controles.

El estado de antigenicidad del tejido se valoró mediante la inmunotinción con el anticuerpo antivimentina para los antígenos citoplasmáticos y con el anticuerpo anti-Mib-1 para los antígenos nucleares.

Como control positivo para los anticuerpos CD-20, CD-3, CD-40, Bcl-2 y Bcl-6 se utilizaron secciones de amígdala incluidas en parafina y para la proteína LMP-1 y el antígeno CD-30 se usaron secciones de muestras de enfermedad de Hodgkin asociada al VEB. Como controles negativos se realizó sistemáticamente la omisión del anticuerpo primario.

3.3.3.-Cuantificación de los resultados de las tinciones inmunohistoquímicas (IHO).

El inmunofenotipo de las células neoplásicas se determinó en función de la reactividad frente a los anticuerpos anti-CD-20 y anti-CD-3 policlonal.

Se estableció como fenotipo B, cuando la expresión de CD-20 fue positiva en al menos el 20% de las células neoplásicas y la tinción de CD-3 fue negativa. El fenotipo T se determinó cuando la expresión de CD-3 fue positiva al menos en el 20 % de las células tumorales y el marcaje con CD-20 fue negativo.

La expresión de CD-30 se valoró cuando era de membrana y citoplasmática pudiendo observarse una intensificación a nivel del aparato de Golgi. Cuando al menos el 10% de las células neoplásicas eran positivas, el linfoma se incluyó en el grupo de linfomas CD-30 positivos.

CD-40 se expresa en la membrana y el citoplasma celular y se consideró positivo cuando más del 30% de las células tumorales eran positivas.

La clonalidad para las cadenas ligeras de las inmunoglobulinas kappa y lambda se valoró mediante la presencia de tinción citoplasmática y/o de superficie en las células tumorales. La expresión de kappa o lambda debía ser mutuamente excluyente y producirse en más del 30% de las células tumorales.

Para cuantificar la expresión de Mib-1 se utilizó como control interno la positividad en las células endoteliales. Se consideró índice de proliferación bajo cuando se teñían menos del 10% de los núcleos de las células tumorales, índice de proliferación medio cuando se teñían entre el 10% y el 50% y alto índice de proliferación cuando se observaba tinción de más del 50% de los núcleos de las células tumorales.

Se consideró que no existía sobre-expresión de p53 cuando menos del 20% de los núcleos de las células tumorales expresaban la proteína; positiva con una cruz cuando se observaba expresión entre un 20% y un 50% y positiva con dos cruces cuando más del 50% de las células tumorales la expresaban.

La proteína Bcl-6 es nuclear y los casos fueron considerados positivos cuando más del 50% de las células tumorales lo expresaban.

La proteína Bcl-2 tiñe el citoplasma. Los casos fueron considerados positivos cuando más del 25% de las células tumorales lo expresaban.

Por último, mediante el anticuerpo LMP-1 se detecta tinción de membrana. Los casos eran considerados positivos cuando alguna célula neoplásica expresaba la proteína.

3.4.-TÉCNICAS MOLECULARES

3.4.1.-Técnica de hibridación “in situ” para EBERs.

Se montaron cortes de 4 μm de material incluido en parafina sobre portas tratados con poli-L-lisina, fueron desparafinados con xilol y se rehidrataron de forma secuencial en etanol al 100%, al 96%, al 80%, al 70% y, finalmente, en agua. Para inhibir la peroxidasa endógena las secciones se trataron con una solución fresca de agua oxigenada al 5% en metanol durante 10-15 minutos.

A continuación se realizó la digestión enzimática del tejido con pepsina al 0,1% CIH durante 15 minutos a 37°C en baño. Después se lavaron, rápidamente, en agua destilada, PBS y etanol y se secaron en estufa a 37°C durante 10-20 minutos.

Se cubría cada corte con 8 a 20 μlitros de la sonda específica (EBERs PNA, Dako) se colocaba un cubreobjetos y se incubaba en placa de Terasaki en estufa a 55°C manteniéndolo 1 hora y 30 minutos.

Para eliminar el exceso de sonda se lavaban las muestras en una solución de 2xSSC/50% formamida en baño con agitación a 55°C durante 15 minutos. Posteriormente, se sumergían en una solución bloqueante de TBT durante 10 minutos.

A continuación se incubaban en cámara húmeda con el anticuerpo anti-FITC (Dako M878) diluido en TBT al 1/100 a temperatura ambiente durante 30 minutos. Tras un lavado en TBS con agitación durante 5 minutos se cubrían las muestras con un anticuerpo de conejo anti-ratón marcado con biotina (Histostainplus Zymed) y se incubaban 30 minutos en cámara húmeda. Se lavaban con agitación en PBS durante 5 minutos y se incubaban con una solución de diaminobencidina fresca durante 10 minutos, se lavaban en agua corriente 5 minutos. Se contrastaban con Hematoxilina de Mayer un minuto, deshidrataban con alcoholes crecientes y montaban.

En todos los experimentos se introdujo un caso control positivo procedente de un ganglio con una mononucleosis infecciosa, así como, un control negativo (ganglio linfático).

La expresión de EBERs se consideraba positiva cuando alguna célula neoplásica mostraba tinción positiva nuclear.

3.4.2.-Técnicas de PCR.

3.4.2.1.-Método de extracción del ADN.

La extracción de ADN a partir de muestras frescas (biopsias ganglionares y amígdalas reactivas) se realizó incubando durante toda la noche a 37°C con proteinasa K a una concentración final de 200µg/ml en un tampón de lisis constituido por NaCl 100 mM, EDTA

25mM pH8 dodecil sulfato sódico al 0,5%. El ADN se purificó mediante dos extracciones volumen a volumen con fenol-cloroformo-isoamílico (49:49:2), se precipitó utilizando doble volumen de etanol absoluto y se resuspendió en Tris-HCL/EDTA 1mM/0,1mM pH 7,6 (Sambrook J y col. 1989).

La extracción de ADN, a partir de las biopsias incluidas en parafina, se llevó a cabo utilizando dos secciones de 5 µm del mismo bloque del tejido empleado para el diagnóstico histológico, teniendo la precaución de utilizar cuchillas nuevas con cada bloque y limpiar los microtomos con alcohol de 70° para impedir la contaminación de ADN entre las muestras.

Las muestras se desparafinaron realizando dos extracciones con xilol y otras dos extracciones con alcohol absoluto. El tejido una vez seco y desparafinado fue sometido a una digestión con proteinasa K (200 µg/ml) en un tampón de lisis constituido por KCL 50 mM, Tris-HCL 10mM pH 8,5 y Triton-X 100 al 0,1% (Wright DK y col. 1990). Una vez completada la digestión, la proteinasa K se inactivó calentando la muestra a 95°C durante 10 minutos. El sobrenadante se conservaba a -20°C y se utilizaba directamente (sin valorar la concentración en el espectrofotómetro) para el análisis por medio de la PCR. La amplificación se realizó sistemáticamente con 2 y 5 µl del sobrenadante resultante de todo el proceso de extracción.

3.4.2.2.- Amplificación mediante la técnica de PCR.

La técnica de PCR fue aplicada a los casos recogidos en el presente estudio que mostraron expresión de EBERs con objeto de tipificar la cepa de VEB mediante el estudio del gen EBNA-3C y del gen LMP-1. Los oligonucleótidos utilizados como cebadores para el tipaje del VEB aparecen recogidos en la Tabla 3 (Jones MD y col. 1983, Sample J y col. 1990).

Tabla 3. Secuencia y localización de los oligonucleótidos utilizados en la PCR. Tipaje VEB				
	Nombre.	Secuencia 5'-3'.	Localización.	Tamaño en pb.
Tipaje de VEB.	EBNA-3C-1	AGAAGGGGAGCGTGTGTTT	Gen EBNA-3C	153 VEB tipo 1
Tipaje de VEB.	EBNA-3C-2	GGTCGTTTTTGACGTCGGC	Gen EBNA-3C	246 VEB tipo 2

Para el estudio de la delección de 30 pb del gen que codifica la proteína LMP-1 se usaron los oligonucleótidos reseñados en la Tabla 4 (Chen WG y col. 1996).

Tabla 4. Oligonucleótidos utilizados para la detección de la delección de 30 pb.		
LMP-del 1.	5'CGGAGGAGGTGGAAAACAAA3'	Se amplifica un fragmento de 161 pb (residuos 324 al 377).
LMP-del 2.	5'GTGGGGGTCGTCATCATCTC3'	Se amplifica un fragmento de 161 pb (residuos 324 al 377).

Las reacciones de amplificación se llevaron a cabo en un volumen final de 50 μ l. Los componentes de cada mezcla y sus concentraciones respectivas se reflejan en la Tabla 5.

Tabla 5. Reactivos para la amplificación.	
Componente.	Concentración final por tubo de reacción.
Buffer PCR. MgCL ₂ .	Tris-HCL 10mM pH 8,3, KCL 50 mM, 0,01% gelatina. 1,5mM.
DATP,dCTP,dGTP, dTTP	200 μ M de cada uno.
Oligonucleótidos cebadores.	0,2-0,6 μ M de cada uno.
ADN	2 a 5 μ l.
AmpliTaq Polimerasa.	2 unidades.
Agua bidestilada.	c.s.p. 50 μ l.

Los protocolos de amplificación incluían siempre una incubación inicial a 94°C durante 5 minutos, 40 ciclos consecutivos de desnaturalización, hibridación de oligonucleótidos y extensión y un paso final de extensión a 72°C durante 7 minutos. Las condiciones concretas de amplificación para cada pareja de cebadores se detalla en la Tabla 6.

Tabla 6. Condiciones de amplificación VEB.			
	Temperatura.	Tiempo.	Número de ciclos.
Desnaturalización inicial.	94°C	5 min.	1
Desnaturalización.	94°C	1 min.	40
Hibridación.	EBNA 3C 56°C	1 min.	40
Hibridación.	LMP-del 59°C	1 min.	40
Extensión.	72°C	1 min.	40
Extensión final.	72°C	7 min.	1

En todos los experimentos se incluyó un control positivo de amplificación consistente en ADN extraído de las líneas celulares transformadas por el VEB conocidas como Raji, B95.8 (control VEB tipo 1), P3HR1 (control VEB tipo 2), ó AG876 (control delección 30 pb). Se incluyó también un tubo conteniendo todos los componentes de la reacción excepto el ADN para descartar la existencia de contaminaciones.

3.4.2.3.-Visualización de los productos de la PCR.

Una vez realizada la amplificación, 8 µl de cada producto de amplificación de la PCR para el VEB se sometían a electroforesis en geles de acrilamida al 6-8% a 140 voltios y temperatura ambiente durante 1 hora aproximadamente. Finalizada la electroforesis, los fragmentos amplificados se visualizaron tiñendo los geles durante 15 minutos con una disolución de 0,5µg/ml de bromuro de etidio en TBE 1X colocandolos en el transiluminador.

Para conocer los pesos moleculares de los productos de amplificación de cada muestra se utilizaron como patrones de electroforesis el marcador de peso molecular V y VIII de Boehringer Mannheim.

3.5.- ANÁLISIS ESTADÍSTICO.

La prueba estadística aplicada a los resultados se basó en el cálculo de Pearson- χ^2 usando el programa BMDP versión 7.1 para UNIX. Este valor es necesario para analizar si los parámetros cualitativos están relacionados y, en caso de que lo estén, indica como es de fuerte la asociación entre ambos. Se consideró que existía una asociación significativa desde el punto de vista estadístico cuando “p” era = 0,05.

RESULTADOS

4.- RESULTADOS.

El grupo de estudio esta constituido por 61 casos. Las características clínicas e histológicas de este grupo de casos y los resultados obtenidos con las técnicas inmunohistoquímicas y moleculares son los siguientes:

4.1.-CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS. (Tablas 7-12).

4.1.1.- Distribución por sexos.

De los 61 pacientes con LNH asociados al SIDA 51 eran varones (83,6%) y 10 eran mujeres (16,3%). La relación entre ambos sexos era, por tanto, de 5,1: 1.

4.1.2- Grupos de riesgo.

Todos los pacientes tenían anticuerpos frente el VIH.

De todos los pacientes 25 (40,9%) eran ADVP. La transmisión sexual fue la vía de infección en 28 pacientes (45,8%); de ellos 16 pacientes (26,3%) eran homosexuales, 2 pacientes (3,2%) eran homo y heterosexuales y los 10 pacientes restantes (16,3%) eran heterosexuales.

Un paciente (1,6%) se infectó por el VIH mediante una transfusión sanguínea.

En 7 paciente (11,4%) no fue posible encontrar en las historias clínicas referencias al grupo de riesgo relacionado con la vía de infección por el VIH.

4.1.3.- Edad.

El intervalo de edades, en el momento del diagnóstico del linfoma, en el conjunto de todos los pacientes estaba comprendido entre 22 y 55 años, con una mediana de 34 años, un valor medio de 36,3 años y una desviación estándar de $\pm 8,50$. En 7 pacientes no se pudo determinar la edad por errores en las historias clínicas.

En los pacientes ADVP las edades estaban comprendidas entre 22 y 53 años con una mediana de 30 años, una media de 33.08 años y una desviación estándar de $\pm 7,24$.

El grupo de pacientes homosexuales presenta un intervalo de edad entre 25 y 53 años con una mediana de 46 años, una media de 40,7 años y una desviación estándar de $\pm 9,13$.

Los pacientes heterosexuales muestran un intervalo de edades entre 28 y 55 años con una mediana de 34 años, una media de 37,2 años y una desviación estándar de $\pm 8,86$.

Tanto los dos pacientes que declararon relaciones hetero y homosexuales como el paciente que adquirió la infección por una transfusión tenían una edad de 38 años.

4.1.4.- Relación entre grupos de riesgo y sexo.

De los 25 pacientes ADVP 21 (84%) eran varones y 4 (16%) eran mujeres; proporción 5,25/1.

El 100% de los 16 pacientes homosexuales eran varones, y también los dos pacientes (100%) que manifestaron tener relaciones homo y heterosexuales.

En el grupo de 10 pacientes que adquirieron la infección VIH por transmisión heterosexual 5 de ellos (50%) eran mujeres y otros 5 (50%) eran varones. Destaca, por tanto, dentro de este grupo que el riesgo de desarrollar la enfermedad es igual para hombres y mujeres.

El único paciente que adquirió la enfermedad por una transfusión era varón.

4.1.5.- Localización de los linfomas.

En el material estudiado 49 muestras (80,32%) correspondían a LS y 12 (19,67%) eran LPSNC.

Dentro de los LS, 25 casos (51,02%) afectaban a ganglios linfáticos y 23 (46,93%) tenían localización extranodal, solo en un caso (2,04%) no fue posible determinar el lugar de origen del linfoma.

Entre los LS extranodales 13 casos (26,53%) afectaron al aparato digestivo (1 en lengua, 2 en boca, 4 gástricos, 3 en intestino grueso, 1 en canal anal y 2 en hígado). Los otros 10 linfomas extranodales tenían su origen en diferentes lugares: 2 se localizaban en piel, 1 en partes blandas, 1 en pulmón, 1 en cuello de fémur, 1 en maxilar, 1 en riñón y tejido perirenal, 1 subdural y epidural, 1 mediastínico y 1 en pericardio.

4.2.- CARACTERÍSTICAS HISTOLÓGICAS.

La agrupación de los 49 linfomas sistémicos por tipos histológicos es la siguiente:

13 casos (26,5%) eran LB (Figuras 1 y 2).

10 casos (20,5%) eran LDCGNH (Figura 3).

15 casos (30,6%) eran LI (Figuras 4 y 5).

9 casos (18,3%) eran LDCG CD-30 +. Dentro de este grupo 6 casos eran linfomas de células grandes no hendidas, 2 casos linfomas inmunoblásticos y el caso restante era un LDCGA CD-30 + (Figura 6) (1,6% del total de todos los linfomas estudiados en nuestra serie).

Estos 3 últimos grupos de linfomas denominados en conjunto LDCG comprendían 34 casos (69,3%).

Además, otros 2 casos (4,08%) fueron clasificados como linfomas de células T periféricas no especificados (células grandes).

Dentro de los linfomas cerebrales, 7 (58,33%) tenían morfología de linfomas de células grandes no hendidas, 4 (33,33%) eran linfomas inmunoblásticos (Figura 7) y 1 (8,33%) no pudo ser clasificado.

4.2.1.- Relación entre los subtipos histológicos de los LS y su localización.

De los 13 LB 10 (76,9%) estaban localizados en ganglios linfáticos, 1 (7,6%) en intestino grueso, 1 caso (7,6%) en riñón y tejido perirenal y en el caso restante (7,6%) no se pudo encontrar la localización exacta en la historia clínica.

De los 10 LDCGNH, 6 (60%) presentaban localización ganglionar y 4 (40%) extranodal (2 se encontraban en estómago, 1 subdural y epidural y 1 era de origen pulmonar).

Los 15 LI mostraron localización en tejido linfático 4 casos (26,66%) mientras que los 11 casos restantes eran de situación extraganglionar (73,33%). Dentro de este último grupo 5 (33,33%) se hallaron en aparato digestivo (2 en boca, 1 en hígado, 1 en intestino grueso y 1 en canal anal). Los 6 restantes presentaban localizaciones diversas: partes blandas, cuello de fémur, región maxilar, piel, pericardio y mediastino.

De los 9 LDCG CD-30 + tenían localización ganglionar 4 casos (44,44%) y eran extranodales los 5 casos restantes (55,55%) todos ellos localizados en aparato digestivo (2 gástricos, 1 en lengua, 1 en hígado y 1 en intestino grueso) (Figura 10).

De los 2 linfomas de células T periféricos un caso era de localización ganglionar y el otro afectaba la hipodermis.

Destaca que el 76,9% de los LB son ganglionares. Por otro lado, el 73,33% de los LI son extranodales, con una alta proporción de linfomas en aparato digestivo (33,33%). Los LDCGNH y LDCG CD-30 + presentan un porcentaje parecido de localizaciones nodales y extranodales.

4.2.2.- Relación entre número de células CD-4 por mL y tipo histológico de linfoma.

El número de células CD-4 en los pacientes VIH positivos en el momento del diagnóstico del linfoma fue el siguiente en cada grupo de linfomas:

LPSNC: El número de células CD-4 por μL pudo determinarse en 7 de los 12 casos. Presenta un rango entre 2 y 108 $\text{cel}/\mu\text{L}$, una mediana de 13 $\text{cel}/\mu\text{L}$, una media de 37,57 $\text{cel}/\mu\text{L}$ y una desviación estándar de $\pm 44,74$.

LB: El número de células CD-4 por μL se determinó en 9 de los 13 casos. Presenta un rango entre 79 y 727 cel/ μL , una mediana de 200 cel/ μL , una media de 296,3 cel/ μL y una desviación estándar de +/- 193,11.

LDCGNH: El número de células CD-4 por μL se determinó en 7 de los 10 casos. Presenta un rango entre 10 y 152 cel/ μL , una mediana de 25 cel/ μL , una media de 43 cel/ μL y una desviación estándar de +/- 46,07.

LI: El número de células CD-4 por μL se determinó en 11 de los 15 casos. Presenta un rango entre 17 y 135 cel/ μL , una mediana de 88 cel/ μL , una media de 85.09 cel/ μL y una desviación estándar de +/- 36,42.

LDCG CD-30 +: El número de células CD-4 por μL se determinó en 7 de 9 casos. Presenta un rango entre 16 y 158 cel/ μL , una mediana de 118 cel/ μL , una media de 96.14 cel/ μL y una desviación estándar de +/- 49,66.

Linfomas T: El número de células CD-4 por μL se determinó en los 2 casos. Presenta un rango entre 18 y 254 cel/ μL , una media de 136 cel/ μL y una desviación estándar de +/- 118.

4.3.- CARACTERÍSTICAS INMUNOHISTOQUÍMICA. (Tablas 13-18).

4.3.1.- Expresión de CD-20 y CD-3.

56 casos (91,8%) mostraron expresión del antígeno CD-20 en las células tumorales, por lo tanto, eran de estirpe B (Figura 8). En 3 casos (4,9%) no expresaron CD-20 ni CD-3. De estas, 2 casos eran LI y el otro un LDCGA CD-30 + (este linfoma está incluido dentro de los LDCG CD-30 +).

En 2 casos (3,3%) las células linfoides neoplásicas expresaron CD-3, es decir, eran de estirpe T (Figura 9).

4.3.2.- Presencia de clonalidad para las cadenas ligeras de las inmunoglobulinas.

La técnica inmunohistoquímica para la detección de las cadenas ligeras de las inmunoglobulinas demostró clonalidad en 26 casos (42,62%) de los cuales 15 casos (24,59%) presentaron restricción para cadena ligera kappa y 11 casos (18,03%) para cadena ligera lambda (Figuras 12 y 13).

En el grupo de LPSNC se identificó clonalidad en 5 de los 12 casos (41,66%), 3 de ellos presentaban restricción para cadena kappa y 2 para cadena lambda.

En el grupo de los LB se detectó clonalidad en 5 casos (38,46%), 3 tenían restricción para cadena kappa y 2 para lambda.

En los LDCGNH la clonalidad se detectó mediante esta técnica en 3 de los 10 casos (30%), 2 casos expresaban kappa y el otro caso lambda.

En el grupo de los LI se detectó clonalidad en 7 de los 15 casos (46,66%), de ellos 4 eran de tipo kappa y 3 de tipo lambda.

Dentro de los LDCG CD-30 + la clonalidad se observó en 6 de los 9 casos (66,66%), 3 casos mostraban restricción para cadena kappa y otros 3 para cadena lambda.

Si se analizan en conjunto todos los linfomas existe una mayor presencia de clonalidad para las cadenas ligeras kappa; de 26 casos que mostraron clonalidad para las cadenas ligeras de las inmunoglobulinas 15 casos (57,6%) eran kappa. La frecuencia de detección de clonalidad mediante técnica inmunohistoquímica en parafina en los diferentes tipos de linfomas se distribuye de la siguiente manera: LDCG CD-30 + (66,66%), los LI (46,66%) y LPSNC (41,66%), los LB (38,46%) y los LDCGNH (30%).

4.3.3.- Índice de proliferación.

El índice de proliferación fue medido mediante el anticuerpo Mib-1. Siguiendo los criterios definidos en la sección Materiales y Métodos para la evaluación de la expresión de Mib-1 se observó un alto índice de proliferación en 40 casos (65,5%) (Figura 14), medio en 15 casos (24,5%) y no pudo valorarse en 6 casos (9,8%). La relación entre el índice de proliferación y los diferentes tipos de linfomas se describe en la tabla 19.

Tabla 19. Distribución del índice de proliferación por grupos de linfomas.

	ALTO.	MEDIO.	BAJO.	NO VALORABLE.
LPSNC.	6 (50%)	3 (25%)		3 (25%)
LB.	11 (84,6%)			2 (15,3%)
LDCGNH.	8 (80%)	1 (10%)		1 (10%)
LI.	9 (60%)	6 (40%)		
LDCG CD-30 +.	4(44,44%)	5(55,55%)		
Linfomas T.	2 (100%)			
TOTAL	40(65,5%)	15 (24,5%)		6 (9,8%)

4.3.4.- Expresión de la proteína p53.

Se observó sobre-expresión de la proteína p53 en 25 casos (40,98%) del total de los linfomas. La sobre-expresión de p53 se distribuyó en los diferentes tipos de linfomas de la siguiente manera:

Dentro del grupo de LPSNC 7 casos (58,3%) sobre-expresaron p53, 5 de ellos presentaban una morfología de célula grande no hendida (4 casos mostraron una intensidad 2 cruces y 3 casos de una cruz), un caso (8,3%) era negativo y en 4 casos (33,3%) no pudo realizarse el estudio por falta de material.

En el grupo de los LB se observó sobre-expresión de p53 en 5 casos (38,46%) con una intensidad de 2 cruces 2 casos y con 1 cruz 3 casos. En otros 2 casos la expresión de p53 no pudo ser testada al no poderse valorar los antígenos nucleares (Mib-1 no fue valorable).

Entre los LDCGNH 4 casos (40%) tenían sobre-expresión de esta proteína (Figura 15) (1 caso con una intensidad de 2 cruces y 3 con una intensidad de 1 cruz), 4 casos (40%) eran negativos y 2 casos (20%) no fueron valorables.

Dentro de los LI 4 casos (26,6%) sobre-expresaron p53 (3 casos con una intensidad de 2 cruces y 1 caso con una intensidad de 1 cruz) y los 11 casos (73,3%) restantes fueron p53 negativos.

En los LDCG CD-30 + se observó sobre-expresión de p53 en 4 casos (44,4%) (2 casos con una intensidad de 2 cruces y otros 2 con una intensidad de 1 cruz), los otros 5 casos (55,5%) eran negativos.

Finalmente, de los 2 linfomas T uno era positivo (50%) con una intensidad de 1 cruz y el otro caso (50%) era negativo.

En conclusión, la sobre-expresión de p53 es más frecuente (58,3%) y más intensa en los LPSNC. También se observa una alta incidencia de sobre-expresión en los LDCGNH (40%) y en los LDCG CD-30 + (44,44%). De los 24 casos que mostraron expresión de p53 en el conjunto de todos los linfomas 13 (54,16%) poseían una morfología de células grandes no hendidas. Destaca, también, el bajo índice de expresión de p53 en los LB.

4.3.5. - Expresión de la proteína Bcl-2.

La expresión de la proteína Bcl-2 se observó en 14 casos (22,9%) del total de linfomas con la siguiente distribución entre los diferentes tipos:

En el grupo de los LPSNC 5 casos (41,6%) fueron positivos, 3 casos (25%) negativos y 4 casos (33,3%) no pudieron ser estudiados con este anticuerpo por falta de material.

En los LB no se identificó expresión de Bcl-2 en los 12 casos en que dicha técnica fue valorable.

9 casos (90%) de los LDCGNH eran negativos y solo uno de ellos (10%) fue positivo.

Dentro de los LI 3 casos (20%) mostraron positividad y 12 casos (80%) fueron negativos.

En el grupo de los LDCG CD-30 + se detectó positividad en 5 casos (55,5%) (Figura 17) mientras que 4 casos (44,4%) fueron negativos.

Los 2 linfomas T no presentaron positividad para Bcl-2.

La expresión de Bcl-2 es más frecuente en los LPSNC (41,6%) y en los LDCG CD-30 + (55,5%).

4.3.6.- Expresión de la proteína Bcl-6.

La detección de expresión de la proteína Bcl-6 se realizó en 48 de los 61 casos del estudio. En 10 de los 12 LPSNC no pudo determinarse debido a la falta de material al tratarse de biopsias esterotáxicas.

En el conjunto de todos los linfomas la positividad para Bcl-6 se detectó en 19 casos (39,5%) siendo negativos 29 (60,3%). La correlación con los diferentes tipos fue la siguiente:

En los LPSNC solo se realizó las pruebas de inmunohistoquímica en 2 casos siendo ambos negativos.

Dentro de los LB no se pudo realizar la determinación de Bcl-6 en 2 casos, 9 casos (69,2%) fueron positivos y 2 casos (15,3%) negativos.

Entre los LDCGNH 7 (70%) expresaron Bcl-6 (Figura 16). Fueron negativos 2 casos (20%) y no pudo realizarse el estudio en 1 caso.

Dentro de los LI solo se observó expresión en un caso (6,6%) y fueron negativos los 14 casos restantes (93,3%).

En los LDCG CD-30 + se observó positividad en 2 casos (22,2%) (ambos con morfología de células grandes no hendidas) y fueron negativos los 7 casos restantes (77,7%).

Por último, los dos casos de estirpe T fueron negativos para Bcl-6.

Es importante destacar la alta asociación de expresión de la proteína Bcl-6 con los LB y los LDCGNH con unos porcentajes de positividad de 69,2% y 70% respectivamente.

4.3.7.- Expresión de CD-40.

En el conjunto de todos los linfomas 31 casos (81,5%) fueron positivos, 7 casos (18,4%) negativos y no se pudo realizar la técnica de inmunohistoquímica por falta de material en 23 casos. Por grupos de linfomas la expresión de CD-40 fue la siguiente:

En los LPSNC solo se pudo realizar la determinación en 1 caso que fue positivo. En las otras 11 muestras no se dispuso de material suficiente para detectar CD-40.

En el grupo de los LB, 9 casos (69,2%) fueron positivos, 3 casos (23,0%) negativos y no se realizó la prueba en 1 caso.

Entre los LDCGNH 6 (60%) mostraron positividad, 1 caso (10%) era negativo y no se realizó la prueba en 3 casos.

Dentro de los LI, 10 casos (83,3%) eran positivos, 2 casos (16,6%) negativos y en otros 3 no se pudo determinar (Figura 11).

De los LDCG CD-30 + 4 casos (80%) eran positivos, 1 caso negativo y no se realizó la prueba en 4 casos.

Finalmente, en los linfomas T solo se pudo realizar la determinación en un solo caso que fue positiva.

Por tanto la expresión de CD-40 esta homogéneamente distribuida entre los 5 grupos de linfomas B asociados al SIDA. El único caso de linfoma T en que se determinó la expresión de CD-40, esta fue positiva.

4.3.8.- Expresión de la proteína LMP-1.

La presencia de expresión de la proteína LMP-1, se observó en 35 casos (58,3%) y fue negativa en 25 casos (41,6%). En un caso el resultado no era valorable.

Por grupos los resultados fueron los siguientes:

Dentro de los LPSNC los 12 casos (100%) expresaban la proteína.

En los LB se identificaron 2 casos (15,3%) positivos y 11 casos fueron negativos (84,6%).

Dentro de los LDCGNH se observaron 2 casos (20%) positivos y 7 casos (70%) fueron negativos, en un caso la técnica no fue valorable.

En los LI existían 10 casos (66,6%) positivos mientras que en 5 casos (33,3%) los resultados fueron negativos.

Los LDCG CD-30 + mostraron positividad los 9 casos (100%) (Figura 18).

Para finalizar, en los dos linfomas de células T no se detectó expresión de la proteína LMP-1 en ninguno de los dos casos.

En conclusión, destaca que la expresión de la proteína LMP-1 se observa en un 100 % de los LPSNC y el 100% de los LDCG CD-30 +. También los LI muestran un alto porcentaje de presencia de esta proteína 66,6%. En los LB, LDCGNH y linfomas T la presencia de expresión de esta proteína se detecta en un pequeño número de casos o esta ausente.

4.3.9.- Relación entre las oncoproteínas LMP-1, BCL-6, BCL-2 y p53 y los distintos grupos de linfomas.

Tabla 20. Distribución de las oncoproteínas en los diferentes grupos de LNH asociados al SIDA.

	LMP-1	BCL-6	BCL-2	P53
LPSNC.	12 (100%)		5 (41,6%)	7 (58,3%)
LB.	2 (15,3%)	9 (69,2%)	0 (0%)	5 (38,4%)
LDCGNH.	2 (20%)	7 (70%)	1 (10%)	4 (40%)
LI.	10 (66,6%)	1 (6,6%)	3 (20%)	4 (26,6%)
LDCG CD-30 +.	9 (100%)	2 (22,2%)	5 (55,5%)	4 (44,4%)
Linfomas T.	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	1 (50%)

Los LPSNC expresaban la proteína LMP-1 en los 12 casos (100%), Bcl-6 solo pudo realizarse en dos casos que fueron negativos, Bcl-2 se detectó en 5 casos (41,6%) y p53 resultó positiva en 7 casos (58,3%).

Los LB mostraron en 2 casos (15,3%) expresión de LMP-1, la expresión de Bcl-6 fue positiva en 9 casos (69,2%), la expresión de Bcl-2 fue negativa en todos los casos y se detectó sobre-expresión de p53 en 5 casos (38,4%).

Los LDCGNH presentaron 2 casos (20%) positividad para LMP-1, Bcl-6 fue positivo en 7 casos (70%), Bcl-2 en 1 caso (10%) y sobre-expresaban p53 4 casos (40%).

En los LI se identificaron 10 casos (66,6%) positivos para LMP-1, 1 caso (6,6%) positivo para Bcl-6, 3 casos (20%) positivos para Bcl-2 y 4 casos (26,6%) sobre-expresaron p53.

Dentro de los LDCG CD-30 +, 9 casos (100%) expresaban LMP-1, la expresión de Bcl-6 fue positiva en 2 casos (22,2%), de Bcl-2 en 5 casos (55,5%) y sobre-expresaban p53 4 casos (44,4%) (los 4 casos tenían morfología de células grandes no hendidas).

Los 2 linfoma de células T no presentaron expresión de LMP-1, Bcl-6 y Bcl-2 y uno de ellos sobre-expresaba p53.

Es conocido que la proteína LMP-1 induce la expresión de Bcl-2. En nuestro estudio de los 14 casos positivos para Bcl-2, 12 expresaban LMP-1. Otros 19 casos positivos para LMP-1 no mostraron la presencia de la proteína Bcl-2.

La relación entre las proteínas Bcl-2 y LMP-1 es más evidente en los LPSNC (5 casos) y en los LDCG CD-30 + (5 casos). En los LI solo 3 de los 10 casos con presencia de la proteína LMP-1 expresaban también Bcl-2.

Se observa además, una relación inversa entre la expresión de LMP-1 y Bcl-6. Así, los LB y LDCGNH que expresan frecuentemente la proteína Bcl-6, de forma significativa, pocos de ellos expresan LMP-1. Sin embargo, los LPSNC, y los LS de tipo LI y LDCG CD-30 + que tienen un alto porcentaje de positividad para LMP-1 tienen una baja expresión de Bcl-6.

4.4.- RESULTADOS MOLECULARES. (Tablas 13-18).

4.4.1.- Expresión de EBERs.

Los resultados obtenidos con la técnica de hibridación “in situ” para EBERs fueron los siguientes:

En el total de los linfomas, se observó positividad en 45 de ellos (73.7%), el estudio fue negativo en 15 (24.5%) y no valorable en un caso (1,6%). Por grupos histológicos la expresión de EBERs fue la siguiente:

En el grupo de LPSNC los 12 casos (100%) mostraron la expresión de EBERs.

Dentro de los LB fueron positivos 6 casos (46,1%) y 7 casos negativos (53,8%).

En los LDCGNH solo 3 casos (30%) expresaban EBERs, 6 casos (60%) eran negativos y 1 caso no fue valorable (10%).

De los LI 14 casos (93,3%) eran positivos y el caso restante (6,6%) era negativo.

Los 9 casos de LDCG CD-30 + (100%) eran positivos (Figura 19).

Por último, dentro de los linfomas de células T un caso fue positivo (50%) y otro negativo (50%).

4.4.2.- Relación entre la expresión de EBERs y la proteína LMP-1.

Considerados todos los linfomas en conjuntos la expresión de LMP-1 se observó en 35 casos (58,3%) y la expresión de EBERs se encontró en 45 (73,7%).

En el grupo de los LPSNC se detectó en los 12 casos tanto expresión de la proteína LMP-1 como de EBERs (100%).

De los 6 casos de LB que expresaban EBERs, 2 casos eran también positivos para LMP-1. Por tanto, el 46,1% de casos en este tipo de linfoma expresaban EBERs y LMP-1.

En los LDCGNH de los 3 casos positivos para EBERs, 2 también expresaban LMP-1, 1 caso que expresó EBERs no expresó LMP-1. En total 3 casos (30%) expresaban EBERs y LMP-1.

En el grupo de LI, 10 casos expresaban EBERs y LMP-1 y en 4 casos solo se detectó EBERs. En conjunto, 14 casos (93,3%) expresaban EBERs y LMP-1.

En los LDCG CD-30 + los 10 casos (100%) presentaban expresión de EBERs y LMP-1.

En el grupo de linfomas T en el caso que se detectó expresión de EBERs no se identificó LMP-1.

En el conjunto de todos los linfomas asociados al SIDA 45 casos (73,7%) expresaron EBERs, 35 casos expresaron EBERs y LMP-1 y 16 casos fueron negativos para ambos (26,2%). Es importante señalar que los LPSNC y los LS de tipo LI y LDCG CD-30 + en un alto porcentaje se asocia la expresión de EBERs y LMP-1, 100%, 93,3% y 100% respectivamente. Esta asociación es menor en los LB y LDCGNH 46,1% y 30%.

4.4.3.- Tipaje del VEB.

Tabla 21. Tipaje del VEB por grupos de linfomas en los casos positivos para EBERs.

	VEB-1	VEB-2	VEB-1+2	No amplifica.
LPSNC.	7 (58,3%)	3 (25%)		2 (16,6%)
LB.	4 (66,6%)	2 (33,3%)		
LDCGNH.	1 (33,3%)	1 (33,3%)		1 (33,3%)
LI.	7 (50%)	2 (14,2%)	4 (28,5%)	1 (7,1%)
LDCG CD-30+.	2 (22,2%)	3 (33,3%)	4 (44,4%)	
Linfomas T.	1 (100%)			
TOTAL.	22 (48,8%)	11 (24,4%)	8 (17,7%)	4 (8,8%)

El tipaje del VEB mediante PCR se realizó en los 45 linfomas que expresaron EBERs se consiguieron productos de amplificación del gen EBNA-3C en 41 casos (91,1%). El VEB era de tipo 1 en 22 casos (48,8%) y en 11 casos (24,4%) era de tipo 2. Se encontraron infecciones duales por los tipos 1 y 2 en 8 casos (17,7%). En 4 muestras (8,8%) no fue posible la tipificación del virus (Figura 20).

La relación del tipo de VEB y el subtipo de linfoma fue la siguiente:

LPSNC. El estudio mediante PCR de EBNA-3C fue eficaz en 10 casos (83,3%), 7 (58,3%) eran de tipo 1 y 3 (25%) eran del tipo 2. No se identificaron coinfecciones. No se

obtuvieron productos de amplificación en 2 casos (16,6%). De estos dos casos uno procedía de una autopsia antigua y estaba fijado en formol no tamponado por lo que el ADN estaba muy degradado. En el otro caso la muestra era muy pequeña. En ambas muestras no se consiguió amplificar el gen de la β -globulina que se utilizó para valorar el estado del ADN extraído de las muestras.

LB. En 6 casos (100%) se consiguió amplificación del gen EBNA-3C, de ellos 4 casos (66,6%) correspondían al tipo 1 y 2 casos (33,3%) al tipo 2. No se observaron coinfecciones.

LDCGNH. Se obtuvo amplificación del gen EBNA-3C en 2 casos (66,6%), de los cuales, 1 caso (33,3%) era tipo 1 y el otro caso (33,3%) era de tipo 2. No se observaron infecciones duales. En 1 caso (33,3%) no se consiguió amplificación del gen EBNA-3C.

LI. Amplificaron para EBNA-3C 13 casos (92,9%), de ellos 7 casos (50%) mostraron VEB tipo 1, 2 casos (24,2%) tipo 2, y además, 4 casos (28,5%) presentaban infecciones duales por ambos tipos. Solo en 1 caso (13,3%) no se obtuvieron productos de amplificación.

LDCG CD-30 +. Se obtuvieron productos de amplificación en todos los casos (100%). 2 casos (22,2%) se asociaban a VEB tipo 1, otros 3 casos (33,3%) al VEB tipo 2 y en 4 casos (44,4%) se encontraron infecciones duales por ambos tipos.

Linfomas de células T. El único caso positivo para EBERs estaba asociado al VEB tipo 1.

En resumen, destaca una mayor incidencia de asociación con VEB tipo 1 (51,1%).

En el grupo de LDCG CD-30 + destaca, además, el alto porcentaje de infecciones duales por los VEB tipo 1 y 2, que alcanzan al 44,4% de los casos.

4.4.4.- Tipaje del VEB en los linfomas EBERs positivos y su relación con el grupo de riesgo.

Tabla 22.

	Homosexual	Heterosexua	ADVP	Otros	Total
	1				
VEB-1	5 (45,4%)	6 (54,5%)	7 (50%)	1 (100%)	19 (51,3%)
VEB-2	6 (54,5%)	5 (45,5%)	7 (50%)		18 (48,6%)
Aislado.	4 (36,3%)	3 (27,2%)	4 (28,5%)		11 (29,7%)
Coinfección.	2 (18,1%)	2 (18,1%)	3 (21,4%)		7 (18,9%)
TOTAL	11 (29,7%)	11 (29,7%)	14 (37,8%)	1 (2,7%)	37

Como se puede ver en la tabla 22 la distribución de los dos tipos del VEB por grupos de riesgo es bastante homogénea. Hay una presencia algo mas alta del VEB tipo 2 en el grupo de pacientes homosexuales 54,5%.

4.4.5.- Relación entre las cepas salvaje y delecionada del gen LMP-1 del VEB y los linfomas con expresión de EBERs.

Tabla 23.

	No delecionada.	Delecionada.	Coinfecciones.	No amplifica.
LPSNC.	8 (66,6%)	2 (16,6%)		2 (16,6%)
LB.		6(100%)		
LDCGNH.	2 (66,6%)	1 (33,3%)		
LI.	7 (50,0%)	5 (35,7%)	1 (7,1%)	1 (7,1%)
LDCG CD-30+.	4 (44,4%)	3 (33,3%)	1 (11,1%)	1 (11,1%)
Linfomas T.		1(100%)		
TOTAL.	21 (46,6%)	18 (40,0%)	2 (4,4%)	4 (8,8%)

De las 45 muestras de linfomas en las que se detectó expresión de EBERs en las células neoplásicas la reacción de amplificación del gen de la proteína LMP-1 se consiguió en 41 casos (91,1%), de los cuales 21 casos (46,6%) correspondían a la forma no delecionada o salvaje, en 18 casos (40%) se detectó la variante delecionada y se observaron infecciones duales por ambas formas delecionada y no delecionada en 3 casos (4,4%). No se obtuvieron productos de amplificación en 4 muestras (8,8%). Por grupos de linfomas la distribución fue la siguiente:

Dentro de los LPSNC, en 8 casos (66%) se identificó la cepa no delecionada en 2 casos (16,6%) la cepa delecionada y en ningún caso se detectaron infecciones por ambas

cepas. En total en 10 casos (83,2%) se obtuvieron productos de amplificación del gen LMP-1, mientras que en 2 (16,6%) casos no se consiguió amplificar el gen.

LB. En los 6 casos (100%) se detectó la cepa delecionada. En ningún caso se detectó la cepa salvaje y tampoco se identificaron coinfecciones.

LDCGNH. En 2 casos (66,6%) se detectó la cepa no delecionada, en 1 caso (33,3%) la cepa delecionada y no se detectaron coinfecciones.

LI. En 7 casos (50%) se detectó la cepa salvaje, en 5 casos (35,7%) la cepa delecionada y en 1 caso (7,1%) se detectó coinfección por ambas cepas. En 1 caso (7,1%) no se obtuvieron producto de amplificación.

LDCG CD-30 +. En 4 casos (44,4%) se detectó la cepa salvaje, en 3 casos (33,3) la cepa delecionada y 1 caso (11,1%) había una infección dual por ambas cepas. En conjunto se obtuvieron productos de amplificación para el gen de la proteína LMP-1 en 8 casos (88,8%) y 1 caso (11,1%) no se consiguió amplificar el gen.

Linfomas de células T. El único caso asociado al VEB lo era a la cepa no delecionada.

Considerando todos los linfomas en conjunto se advierte que la proporción entre las cepas salvajes y las delecionadas es semejante, 46,6% y 40% respectivamente. La presencia

de infecciones duales por ambas cepas es muy poco frecuente, solo 2 casos (4,4%). Destaca que en los LB se asocian en un 100 % a la forma delecionada del gen LMP-1.

4.4.6.- Relación de la cepa delecionada y el tipo del VEB en los linfomas con expresión de EBERs.

Tabla 24.

	VEB-1	VEB-2	VEB-1+2	TOTAL
No delecionado.	11 (50%)	4 (36,3%)	5 (71,4%)	20/40 (50%)
Delecionado.	11 (50%)	7 (63,6%)	2 (28,5%)	20/40 (50%)
Aislada.	10 (45,5%)	7 (63,3%)	1 (14,2%)	18/40 (45%)
Coinfección.	1 (4,5%)		1 (14,2%)	2/40 (5%)
TOTAL	22/40 (55%)	11/40 (27,5%)	7/40 (17,5%)	40

En el 50% de los casos el VEB era de tipo 1 (11/22) y la cepa viral no presentaba la deleción de 30pb del gen LMP-1, en el otro 50% de casos (11/22) se detectó la cepa delecionada, aisladamente en 10 muestras (45,5%) y en forma de infección dual con la cepa salvaje en 1 caso (4,5%). De los 11 casos asociados al VEB tipo 2, 4 casos (36,3%) no tenían delecionado el gen de la LMP-1 mientras que en otros 7 casos (63,6%) se encontró la variante delecionada. De los 7 casos en los que se detectó coinfección por el VEB tipo 1 y 2, en 5 de ellos (71,4%) el gen LMP-1 era de tipo salvaje, 1 caso (14,2%) presentó la forma delecionada y otro caso (14,2%) una infección dual por ambos tipos de cepas (14,2%) (Figura 21).

Destaca, por tanto, que en los casos asociados al VEB tipo 2 existe una alta incidencia de las cepas con delección de 30pb del gen LMP-1 (63,6%).

En los casos que presentaron infección por el VEB tipo1 el porcentaje de cepas no delecionadas y delecionadas del gen de la proteína LMP-1 era semejante, con una incidencia ambas cepas del 50%.

4.4.7.- Relación de la cepa delecionada y no delecionada del gen LMP-1 del VEB y los grupos de riesgo.

Tabla 25.

	Homosexual	Heterosexua	ADVP	Otros	Total
	1				
No delecionada.	4 (40%)	6 (66.6%)	7 (50%)	1 (100%)	18 (52.9%)
Delecionada.	6 (60%)	3 (33.3%)	7 (50%)		16 (47%)
Aislada.	5 (50%)	3 (33.3%)	6 (42.8%)		14 (41.1%)
Coinfección.	1 (10%)		1 (7.1%)		2 (5.8%)
TOTAL	10	9	14	1	34

La cepa salvaje del gen LMP-1 es más frecuente en todos los grupos de riesgo salvo en el grupo de pacientes homosexuales donde predomina la cepa delecionada.

4.5.-GRUPO CONTROL.

El grupo control estaba constituido por 50 muestras distribuidas de la siguiente manera: 16 linfadenitis reactivas, 7 amígdalas reactivas y 27 casos de mononucleosis infecciosa. Las características de esta población de referencia y los resultados obtenidos en el estudio molecular son los siguientes:

4.5.1.- Datos clínicos.

4.5.1.1.- Distribución por sexos:

La relación hombres mujeres fue de 2:1.

4.5.1.2.- Edad.

El intervalo de edades estaba comprendido entre 16 y 85 años, con un valor medio de 30. Considerando cada tipo de control por separado, el rango de edades abarcaba de 18 a 33 años con un valor medio de 25,4 para las amígdalas reactivas, de 21 a 85 con una media de 47,7 para las linfadenitis reactivas y, finalmente, de 16 a 31 con una edad media de 20,6 años para los pacientes con mononucleosis infecciosa.

4.5.2.- Técnicas de PCR.

4.5.2.1- Tipaje del VEB en los casos control.

Los resultados aparecen reflejados en la tabla 26.

Tabla 26. Tipaje del VEB en la población control.

	VEB 1.	VEB 2.	VEB 1+2	n.c	Total
Amígdalas.	5	--	1	1	7
Linfadenitis.	13	1	1	1	16
Mononucleo sis.	21	1	3	2	27
Total.	39 (78%)	2 (4%)	5 (10%)	4 (8%)	50

El VEB tipo 1 se detectó en el 78% de los controles (39/50). En 2 casos (4%) se encontró el VEB tipo 2 y en 5 muestras (10%) existían infecciones duales por ambos tipos de virus. La tipificación no fue posible en 4 casos (8%).

4.5.2.2.- Presencia de la delección de 30 pb en los casos control.

La amplificación del extremo 3' del gen LMP-1 fue eficaz en 49 de los 50 controles. En un 65,3% de ellos (32/49) sólo se detectó la banda correspondiente a la cepa prototipo no delecionada. En el 34,7% restante de los casos (17/49) se identificó el fragmento

correspondiente a la deleción, de forma aislada en 4 muestras (8,2%) y conjuntamente con la cepa no deleccionada en 13 (26,5%). La distribución de la cepa deleccionada según el tipo de control se muestra en la Tabla 27:

Tabla 27. Distribución de la deleción de 30pb en la población control.

	Amígdalas.	Linfadenitis.	Mononucleosis.	Total.
No deleción.	3	10	19	32/49 (65,3%)
Deleción.	6	6	8	17/49 (34,7%)
Aislada.	–	4	--	4/49 (8,2%)
Coinfección.	3	2	8	13/49 (26,5%)
Total.	6*	16	27	49

*La amplificación del extremo 3' del gen LMP-1 fue eficaz en 6 de las 7 amígdalas reactivas incluidas en el grupo control.

4.5.2.3.- Distribución de la deleción de 30 pb según el tipaje del VEB en los casos control.

La Tabla 28 muestra la distribución de la deleción de 30 pb teniendo en cuenta el tipaje del VEB en el grupo de controles adultos.

Tabla 28. Distribución de la delección de 30 pb según el tipaje del VEB en la población control.

	VEB 1.	VEB 2.	VEB 1+2.	n.c.	Total.
No delección.	24(63,2%)	2(100%)	4(80%)	2(50%)	32/49(65,3%)
Delección	14(36,8%)	--	1(20%)	2(50%)	17/49(34,7%)
Aislada.	4(10,5%)	--	--	--	4/49(8,2%)
Coinfección.	10(26,3%)	--	1(20%)	2(50%)	13/49(26,5%)
Total.	38*	2	5	4	49

*En uno de los 39 casos en los que el VEB fue de tipo 1, no fue posible amplificar el extremo 3' del gen LMP-1. Dicho caso no se incluye en la presente tabla.

En el 63,2% de los casos en los que el VEB era de tipo 1 (24/38) la cepa viral no estaba delecionada, mientras que en el 36,8% restante (14/38) fue posible detectar la delección de 30 pb, aisladamente en 4 muestras (10,5%) y en forma de infección dual con la cepa estándar en 10 (26,3%). Los dos únicos casos de tipo 2 presentes en la población control no estaban delecionados. De las 5 muestras en las que existían co-infección por virus tipo 1 y 2, 4 (80%) no estaban delecionadas mientras que en la otra (20%) se encontró la variante delecionada acompañada de la cepa prototipo. Finalmente, en los 4 casos en los que no fue posible tipificar el VEB, 2 (50%) no estaban delecionados y en los otros 2 (50%) coexistía la variante delecionada con la no delecionada.

4.5.3.- Relación entre los resultados del tipaje del VEB en el grupo control y en los pacientes con LNH asociados al SIDA y VEB positivos.

En el conjunto de todos los LNH asociados al SIDA el VEB tipo 2 esta representado en un alto porcentaje de casos, 24,4%, en comparación con el grupo control donde el VEB 2 aparece solamente en un 4% de casos.

En los LB asociados al VEB el porcentaje del tipo 2 se detecta en el 33,3% de los casos.

Además existe una alta frecuencia de coinfecciones (presencia tanto del VEB 1 como del VEB 2) en los LDCG CD-30 + (44,4%) en relación a la población control ya que en esta las coinfecciones tan solo aparece en un 10% de casos.

4.5.4.- Relación entre la presencia de cepas delecionadas y no delecionadas del gen LMP-1 en el grupo control y en los pacientes con LNH asociados al SIDA y VEB positivos.

La relación entre ambos grupos muestra porcentajes algo mayores de cepas del VEB con deleción del extremo 3´del gen LMP-1 en los tejidos con LNH asociados al SIDA (40%) que en la población control en los que la deleción del extremos 3´del gen LMP-1 solo se encuentra en un 34,7% de los casos.

En la población control se observa más coinfecciones (presencia de cepas no delecionada y delecionada en el mismo paciente) 26,5% que en los tejidos afectos por LNH asociados al SIDA (4,4%).

Los LB tienen el porcentaje más alto de asociación a la cepa delecionada del gen LMP-1 (100%) comparado tanto con otros tipos de LNH asociados al SIDA como con la población control.

4.5.5.- Comparación de la distribución de la cepa delecionada de 30 pb según el tipaje del VEB en el grupo control y en los tejidos afectados por LNH asociados al SIDA y VEB positivos.

En los LNH asociados al SIDA se identifica un alto porcentaje de cepas del VEB con deleción del extremo 3' del gen LMP-1 tanto en los casos de linfomas asociados al VEB tipo 1 (50%) como a los asociados al tipo 2 (63,6%). En la población control el VEB tipo 1 se asocia en un 36,8% a cepas con deleción del extremo 3' del gen LMP-1 mientras que ningún caso de VEB tipo 2 se observó asociación a la cepa delecionada.

4.6.- ANÁLISIS ESTADÍSTICO.

El LB tienen una asociación estadísticamente significativa con la localización en ganglio linfático. El valor de Pearson- χ^2 (p) de 0,0005.

También los LDCGNH muestran una asociación estadísticamente significativa con la localización en ganglio linfático. El valor de Pearson- χ^2 (p) de 0,0005.

Existe una fuerte asociación estadística entre los LI y la localización extraganglionar. El valor de “p” es de 0,0005.

La asociación estadística entre niveles altos de número de células CD-4 por μL y los LB es significativa. El valor de “p” es de 0,0099.

Esta asociación también se encuentra entre niveles bajos de células CD-4 por μL y los LPSNC. El valor de “p” es de 0,0099.

La expresión de la proteína Bcl-6 tiene una asociación estadísticamente significativa con los LB (“p”= 0.0011). Esta asociación no se produce en los LDCGNH (“p” =0,0248). La ausencia de esta asociación estadística puede deberse al pequeño número de casos estudiados de este grupo de linfomas (10 casos: de ellos 7 casos expresaban Bcl-6, 2 casos no expresaban esta proteína y en 1 caso no pudo realizarse el estudio de la expresión de Bcl-6 por agotarse el material de la biopsia).

La sobre-expresión de p53 no esta asociada estadísticamente a ningún tipo de linfomas (LDCGNH tienen un valor de “p” 0.78 y los LB tienen un valor de “p” 0,7657).

El grupo de LPSNC, LI y LDCG CD-30 + presentan una fuerte asociación estadística con la expresión de EBERs y LMP-1 el valor de “p” en estos casos es, respectivamente, $p=0,0013$ y $p=0.0001$.

En los LB la presencia de cepas del VEB con delección del gen LMP-1 muestran una asociación estadística significativa con valor de “p” 0,0049.

No existe asociación estadística entre niveles bajos de número de células CD-4 por μL y una mayor frecuencia de asociación a cepas del VEB con delección del extremo 3' del gen LMP-1 (“p” =0,6578).

Tabla 7. Datos clínicos de los LPSNC.

	Sexo.	Edad.	G.Riesgo.	Localización.	Nº cel. CD4
C-1	M	42	ADVP	Cerebro.	108
C-2	M	d	d	Cerebro.	d
C-3	V	42	ADVP	Cerebro.	15
C-4	M	28	Heterosexual.	Cerebro.	d
C-5	V	30	ADVP	Cerebro.	13
C-6	V	38	Transfusión.	Cerebro.	d
C-7	V	47	Heterosexual.	Cerebro.	12
C-8	V	30	ADVP	Cerebro.	5
C-9	M	32	Heterosexual.	Cerebro.	2
C-10	M	33	Heterosexual.	Cerebro.	d
C-11	V	24	ADVP	Cerebro.	d
C-12	V	32	ADVP	Cerebro.	108

d: Dato desconocido.

Tabla 8. Datos clínicos de los LB.

	Sexo.	Edad.	G.Riesgo.	Localización.	Nº cel. CD4.
C-13	V	26	Homosexual.	Ganglio linfático.	168
C-14	V	d	d	d	d
C-15	M	36	ADVP	Colon.	d
C-16	V	d	Heterosexual.	Riñón y tej. perirenal.	d
C-17	V	37	Homosexual.	Ganglio linfático.	160
C-18	V	41	Homosexual.	Ganglio linfático.	d
C-19	V	32	Heterosexual.	Ganglio linfático.	500
C-20	V	30	Homosexual.	Ganglio linfático.	727
C-21	V	43	d	Ganglio linfático.	200
C-22	V	34	ADVP	Ganglio linfático.	340
C-23	V	27	ADVP	Ganglio linfático.	310
C-24	V	30	Homosexual.	Ganglio linfático.	181
C-25	V	31	Homosexual.	Ganglio linfático.	79

d: Dato desconocido.

Tabla 9: Datos clínicos de los LDCGNH.

	Sexo.	Edad.	G. Riesgo.	Localización.	Nº cel. CD4.
C-26	M	42	ADVP	Subdural. Epidural.	10
C-27	V	32	ADVP	Estómago.	d
C-28	V	30	ADVP	Ganglio linfático.	27
C-29	V	d	d	Ganglio linfático.	25
C-30	V	d	d	Ganglio linfático.	d
C-31	V	49	Homosexual	Ganglio linfático.	50
C-32	V	29	ADVP	Estómago.	24
C-33	V	26	ADVP	Pulmón.	13
C-34	V	30	ADVP	Ganglio linfático.	152
C-35	V	d	d	Ganglio linfático.	d

d: Dato desconocido.

Tabla 10: Datos clínicos de los LI.

	Sexo.	Edad.	G.Riesgo.	Localización.	Nº cel. CD4
C-36	V	30	ADVP	Partes Blandas.	124
C-37	V	55	Heterosexual	Hígado.	135
C-38	M	29	Heterosexual	Amígdala. Cavum.	63
C-39	M	45	Heterosexual	Paladar. Ganglio linfático.	54
C-40	V	28	Homosexual	Ileon y Ciego.	42
C-41	V	d	d	Boca.	d
C-42	V	46	Homosexual	Cuello de fémur.	96
C-43	V	42	ADVP	Región maxilar.	122
C-44	V	22	ADVP	Ganglio linfático.	d
C-45	V	34	Heterosexual	Piel.	d
C-46	V	38	Homo y He- terosexual	Ganglio linfático.	118
C-47	V	28	ADVP	Pericardio.	d
C-48	V	46	Homosexual	Mediastino	88
C-49	V	53	Homosexual	Canal anal.	17
C-50	V	48	Homosexual	Boca.	77

d: Dato desconocido.

Tabla 11: Datos clínicos de los LDCG CD-30 +.

	Sexo.	Edad.	G.Riesgo.	Localización.	Nº cel. CD-4
C-51 Cel. Grande.	V	46	Homosexual	Ganglio linfático.	158
C-52 Anaplásico.	M	25	ADVP	Hígado.	d
C-53 Cel. Grande.	V	36	ADVP	Estómago.	51
C-54 Cel. Grande.	V	43	ADVP	Ganglio linfático.	132
C-55 Cel. Grande.	V	52	Homosexual	Lengua.	59
C-56 Cel. Grande.	V	48	Homosexual	Colon.	16
C-57 Inmunoblas.	V	38	Hetero y Homosexual	Ganglio linfático.	118
C-58 Inmunoblas.	V	33	d	Ganglio linfático.	d
C-59 Cel. Grande.	V	53	ADVP	Estómago.	139

d: Dato desconocido.

Tabla 12: Datos clínicos de los linfomas T.

	Sexo.	Edad.	G.Riesgo.	Localización.	Nº cel. CD4
C-60	V	35	ADVP	Hipodermis.	254
C-61	V	27	ADVP	Ganglio linfático.	18

Tabla 13. Características inmunohistoquímicas y moleculares de los LPSNC.

	CD-20	CD-3	CD-30	CD-40	K	L	MIB-1	BCL-6	p53	BCL-2	LMP-1	EBERS	Tipo de virus.	Tipo de LMP-1.
C-1	+	-	-	n.r.	+	-	Alto	-	++	+	+	+	1	Salvaje.
C-2	+	-	-	n.r.	-	+	Alto	n.r.	++	++	+	+	1	Del.
C-3	+	-	+	n.r.	n.v.	n.v.	Alto	n.r.	++	++	+	+	1	Salvaje.
C-4	+	-	-	n.r.	n.v.	n.v.	n.v.	n.r.	-	++	+	+	2	Salvaje.
C-5	+	-	-	n.r.	n.v.	n.v.	Medio	n.r.	n.r.	n.r.	+	+	2	Salvaje.
C-6	+	-	-	n.r.	n.v.	n.v.	Medio	n.r.	++	-	+	+	1	Salvaje.
C-7	+	-	-	n.r.	+	-	Alto	n.r.	+	++	+	+	2	Del.
C-8	+	-	-	n.r.	-	-	n.v.	n.r.	n.r.	n.r.	+	+	n.a.	n.a.
C-9	+	-	-	n.r.	-	-	Medio	n.r.	+	-	+	+	1	Salvaje.
C-10	+	-	-	n.r.	+	-	Alto	n.r.	n.r.	n.r.	+	+	1	Salvaje.
C-11	+	-	-	+	-	+	Alto	-	+	-	+	+	n.a.	n.a.
C-12	+	-	-	n.r.	n.v.	n.v.	n.v.	n.r.	n.r.	n.r.	+	+	1	Salvaje.

n.r.: Estudio no realizado. n.a.: No amplifica.

n.v.: No valorable.

Del.: Delecionado.

Tabla14. Características inmunohistoquímicas y moleculares de los LB.

	CD-20	CD-3	CD-30	CD-40	K	L	MIB-1	p53	BCl-6	BCL-2	LMP-1	EBERS	Tipo de virus.	Tipo de LMP-1.
C-13	+	-	-	+	-	-	Alto	++	+	-	-	+	2	Del.
C-14	+	-	-	+	-	-	n.v.	n.v.	-	-	-	-		
C-15	+	-	-	n.r.	n.v.	n.v	Alto	n.r.	n.r.	n.r.	-	+	2	Del.
C-16	+	-	-	+	-	-	Alto	+	-	-	-	-		
C-17	+	-	-	-	+	-	Alto	-	n.r.	-	-	-		
C-18	+	-	-	+	-	+	n.v.	n.v.	+	-	-	-		
C-19	+	-	-	+	+	-	Alto	-	+	-	+	+	1	Del.
C-20	+	-	-	+	-	+	Alto	-	+	-	-	-		
C-21	+	-	-	+	+	-	Alto	-	+	-	-	+	1	Del.
C-22	+	-	-	+	-	-	Alto	-	+	-	-	+	1	Del.
C-23	+	-	-	+	-	-	Alto	+	+	-	-	-		
C-24	+	-	-	-	n.v.	n.v	Alto	++	+	-	-	-		
C-25	+	-	-	-	-	-	Alto	+	+	-	+	+	1	Del.

n.r.: Estudio no realizado.

n.v.: No valorable.

Del. : Dleccionado.

Tabla 15. Características inmunohistoquímicas y moleculares de los LDCGNH.

	CD-20	CD-3	CD-30	CD-40	K	L	MIB-1	p53	BCL-6	BCL-2	LMP-1	EBERS	Tipo de virus.	Tipo de LMP-1.
C-26	+	-	-	+	-	-	Alto	-	+	-	-	-		
C-27	+	-	-	+	-	+	Alto	+	+	-	+	+	2	Del.
C-28	+	-	-	+	-	-	Alto	+	+	-	-	-		
C-29	+	-	-	n.r.	+	-	Alto	++	n.r.	-	-	-		
C-30	+	-	-	-	+	-	n.v.	n.v.	+	++	-	-		
C-31	+	-	-	+	n.v.	n.v.	Medio	n.v.	-	-	n.v.	-		
C-32	+	-	-	n.r.	-	-	Alto	-	+	-	+	+	1	Salvaje.
C-33	+	-	-	+	-	-	Alto	-	-	-	-	n.v.		
C-34	+	-	-	n.r.	-	-	Alto	-	+	-	-	+	n.a.	Salvaje.
C-35	+	-	-	+	-	-	Alto	+	+	-	-	-		

n.r.: Estudio no realizado.

n.v.: No valorable.

Del.: Delecionado.

n.a.: No amplifica.

Tabla 16: Características inmunohistoquímicas y moleculares de los LI.

	CD-20	CD-3	CD-30	CD-40	K	L	MIB-1	p53	BCL-6	BCL-2	LMP-1	EBERS	Tipo de virus.	Tipo de LMP-1
C-36	+	-	-	+	n.v.	n.v.	Medio	-	-	-	+	+	1+2	Salvaje.
C-37	+	-	-	+	n.v.	n.v.	Alto	++	-	-	+	+	1+2	Salvaje.
C-38	+	-	-	+	-	-	Alto	++	-	-	+	+	1+2	Salvaje.
C-39	+	-	-	+	-	-	Alto	-	-	-	+	+	1	Del.
C-40	+	-	-	n.r.	+	-	Alto	-	-	-	-	-		
C-41	+	-	-	n.r.	+	-	Medio	-	-	-	-	+	1+2	Del.
C-42	+	-	-	n.r.	+	-	Medio	++	-	-	+	+	2	Del.
C-43	-	-	-	+	+	-	Alto	+	-	-	-	+	n.a.	n.a.
C-44	+	-	-	-	-	-	Alto	-	+	+	+	+	1	Salvaje.
C-45	+	-	-	+	-	+	Medio	-	-	-	+	+	1	Salvaje.
C-46	+	-	-	-	-	+	Alto	-	-	-	+	+	1	Salvaje.
C-47	-	-	-	+	-	+	Alto	-	-	-	+	+	1	Del.
C-48	+	-	-	+	-	-	Medio	-	-	+	-	+	2	Del.
C-49	+	-	-	+	-	-	Medio	-	-	+	+	+	1	Salvaje.
C-50	+	-	-	+	n.v.	n.v.	Alto	-	-	-	-	+	1	Salvaje + Del.

n.r.: Estudio no realizado. Del.: Delecionado.
n.v.: No valorable. n.a.: No amplifica

Tabla 17: Características inmunohistoquímicas y moleculares de los LDCG CD-30+

	CD-20	CD-3	CD-30	CD-40	K	L	MIB-1	P53	BCL-6	BCL-2	LMP-1	EBERS	Tipo de Virus	Tipo de LMP-1
C-51 Cel. Grande.	+	-	+	+	+	-	Medio	-	-	-	+	+	2	Salvaje
C-52 Anaplásico.	-	-	+	n.r.	+	-	Medio	+	-	-	+	+	1+2	Salvaje +Del Del.
C-53 Cel. Grande.	+	-	+	n.r.	-	-	Alto	++	+	+	+	+	2	Del.
C-54 Cel. Grande.	+	-	+	+	-	-	Alto	-	-	-	+	+	2	Salvaje
C-55 Cel. Grande.	+	-	+	+	+	-	Alto	-	+	+	+	+	1	Del.
C-56 Cel. Grande.	+	-	+	-	-	+	Medio	++	-	-	+	+	1+2	n.a.
C-57 Inmunoblas.	+	-	+	+	-	-	Medio	-	-	+	+	+	1+2	Salvaje
C-58 Inmunoblas.	+	-	+	n.r.	-	+	Medio	-	-	+	+	+	1	Del.
C-59 Cel. Grande.	+	-	+	n.r.	-	+	Alto	+	-	+	+	+	1+2	Salvaje

n.r.: Estudio no realizado.

Del.: Delecionado.

n.a.: No amplifica.

Tabla 18: Características inmunohistoquímicas y moleculares de los linfomas T.

	CD-20	CD-3	CD-30	CD-40	K	L	MIB-1	P53	Bcl-6	BCL-2	LMP-1	EBERS	Tipo de virus.	Tipo de LMP-1
C-60	-	+	-	+	-	-	Alto	-	-	-	-	+	1	Del.
C-61	-	+	-	n.r.	-	-	Alto	+	-	-	-	-		

n.r.: Estudio no realizado.

Del.: Delecionado.

DISCUSIÓN

5.- DISCUSIÓN.

Los LNH asociados al SIDA forman parte de las entidades diagnósticas de esta enfermedad desde 1985 (Center for Disease Control. 1985). Durante las últimas décadas la frecuencia de estos linfomas en los pacientes con infección por el VIH ha aumentado progresivamente (Schulz TF y col. 1996). Es la segunda neoplasia más frecuente en los enfermos de SIDA, aunque en algunos grupos de riesgo, como los ADVP y hemofílicos, esta situada en el primer lugar (Ahmed T y col. 1987, Beral V y col. 1991, Ragni MV y col. 1993, Schulz TF y col. 1996).

Estos procesos linfoproliferativos están caracterizados por derivar en su mayoría de linfocitos B, tener una clínica muy agresiva y aparecer con gran frecuencia en localizaciones extraganglionares (Knowles DM y col. 1988). A pesar de estas semejanzas los LNH asociados al SIDA constituyen un grupo de linfomas heterogéneos desde el punto de vista clínico, histológico, inmunofenotípico y molecular (Gaidano G y col. 1995).

5.1.- Características epidemiológicas.

Los porcentajes de incidencia de LNH asociados al SIDA varían entre el 3% en Estados Unidos y el 5% en Europa (Beral V y col. 1991, Biggar RJ y col. 1992). Aunque la verdadera incidencia para algunos autores se encuentra entre el 4 y 10% (Levine AM. 1987, Hamilton-Dutoit SJ y col. 1989).

La distribución de la enfermedad por sexos (relación hombre/mujer) encontrada en nuestro estudio (5,1/ 1), es semejante a la publicada en otros trabajos (Carbone A y col. 1996, Bacchi CE y col. 1996).

En Estados Unidos el 80% de los pacientes con LNH asociados al SIDA son homosexuales y un 20% ADVP. En Europa y Brasil las proporciones entre ambos grupos de riesgo están más niveladas (Serraino D y col. 1992, Bacchi CE y col. 1996). En nuestra serie el porcentaje de pacientes ADVP es del 40,9 % y los pacientes en los que la infección se adquirió por vía de transmisión sexual fue de un 45,8%, de ellos un 26,3% eran homosexuales, 3,2% homo y heterosexuales y un 16,3% heterosexuales.

La presencia en los países europeos de unos porcentajes muy semejantes, entre los pacientes con SIDA que desarrollaron linfomas y adquirieron la enfermedad por vía sexual o por vía parenteral ligada a la drogadicción, puede deberse a que en Europa existe una mayor posibilidad para los enfermos drogadictos de acceder a medios diagnósticos que en Estados Unidos (Serraino D y col. 1992).

En nuestra serie destaca la alta incidencia de pacientes infectados por transmisión heterosexual que desarrollaron linfomas (16,3%). En Brasil este porcentaje alcanza el 20,5% (Bacchi CE y col. 1996). El número de linfomas en este grupo de riesgo, ira en aumento al ser la vía de transmisión heterosexual, en la actualidad, la principal causa de infección por el VIH en la población general (Ellerbrock TV y col. 1992).

La edad media de los enfermos, en nuestro estudio, se sitúa en los 36,3 años. Es semejante a la de otros trabajos publicados (Bacchi CE y col. 1996. Carbone A y col. 1996). Los pacientes ADVP, al igual que en otras publicaciones (Bacchi CE y col. 1996. Carbone A y col. 1996), muestran una edad de presentación más precoz, con una media de 33,08 años, mientras que los pacientes homosexuales y heterosexuales tienen una edad media de 40,7 años y 37,2 años respectivamente.

Relacionando grupos de riesgo y sexo, los varones predominan en los grupos de riesgo formados por los ADVP y entre los pacientes homosexuales, tanto en nuestro trabajo como en otros estudios (Bacchi CE y col. 1996. Carbone A y col. 1996). Sin embargo, en los casos en los que la infección por el VIH se adquirió por transmisión heterosexual la relación mujer/hombres es 1:1. Al ser la vía de transmisión heterosexual cada vez más importante para la infección del VIH es de esperar que el porcentaje de mujeres que desarrollen LNH asociados al SIDA sea cada vez mayor.

5.2.- Localización de los linfomas.

En nuestra serie los LS constituyen el 80,32% de los casos mientras que los LPSNC representan el 19,67%. Esta relación es semejante a la descrita en otras series publicadas (Levine AM y col. 1984, Gill PS y col. 1985, Knowles DM y col. 1988, Lowenthal DA y col. 1988, Iochim H y col. 1991, Beral V y col. 1991, Levine AM. 1993, Schulz TF y col. 1996).

Entre los LS destaca el alto porcentaje de linfomas de localización extranodal (46,93%), característica ampliamente descrita (Levine AM y col. 1984, Knowles DM y col. 1988, Lowenthal DA y col. 1988, Iochim H y col. 1991, Karp JE y col. 1991, Levine AM. 1993).

5.3.- Subtipos histológicos.

En esta serie de los 49 LS, el 26,5% correspondían aLB, el 69,3% a LDCG y el 4,08% a linfomas T. Un número similar de casos de LB se ha descrito en algunos estudios publicados anteriormente (Kaplan L y col. 1995), aunque en la mayoría de las series publicadas la incidencia del LB es mayor (30%) (Ziegler JL y col. 1984, Lowenthal DA y col. 1988, Knowles DA y col. 1988, Pedersen C y col. 1991, Beral V y col. 1991, Carbone A y col 1995).

Dentro del grupo de los LDCG, los LI eran los más frecuentes (30,6%) seguidos de los LDCGNH (20,5%) mientras LDCG CD-30 + fueron los más infrecuentes (18,3%). Los dos primeros tipos están bien caracterizados en las numerosas series previamente publicadas (Knowles DM y col. 1988, Ioachim HL y col 1991, Levine AM. 1993, Carbone A y col. 1993a, Gaidano G y col. 1995, Knowles DM. 1997). El grupo de LDCG CD-30 +, incluye 6 LDCGNH, 2 LI y 1 LDCGA CD-30 +. La razón por la que separamos este grupo esta relacionada con la alta asociación de la expresión de CD30 con la presencia de genoma del VEB y sobretodo con la expresión de LMP-1 (Kanavaros P y col. 1992).

Siendo sin embargo, en nuestra serie muy poco frecuentes los LDCGA CD-30 + (1,6%), mientras que en otros trabajos publicados el porcentaje se sitúa entre un 4 y un 14% (Raphael M y col. 1993, Tirelli U y col. 1995).

En el grupo de los LPSNC el 58% eran de linfomas de células no hendidas y el 33,33% eran de tipo inmunoblástico. En la mayoría de las series publicadas se describe una distribución semejante (Jellinger KA y col. 1992, Camilleri-Bröet S y col 1997).

5.4.- Relación entre subtipos histológicos y localización.

En nuestra serie, al igual que en series anteriores, se observa una alta asociación entre los LB y la localización nodal (76,9%). Esta relación también se encuentra en un alto porcentaje de LDCGNH (60%). En ambos grupos dicha asociación tiene significado estadístico ($p=0,0005$). Por otro lado, los LI se desarrollan sobre todo en zonas extraganglionares (73,33%) con un alto porcentaje de afectación del aparato digestivo (33,33%) (Boyle MJ y col. 1990, Beral V y col. 1991, Roihman S y col. 1991, Pluda JM y col. 1993, Carbone A y col. 1995). La relación de los LI y la localización extraganglionar es también estadísticamente significativa ($p=0,0005$).

Los LDCG CD-30+ se desarrollan tanto en los ganglios linfáticos como en el tracto digestivo.

El número de casos localizados en el aparato digestivo en nuestra serie es importante, correspondiendo al 21,31% de todos los linfomas estudiados y al 26,53% de los LS. Dentro de este grupo los tipos más frecuentes son los LI y los LDCG CD-30+. Al igual que lo referido en otras series los linfomas localizados en boca e intestino grueso afectaban sobre todo a pacientes homosexuales (85,7%) (Ioachim HL y col.1997, Delecluse HJ y col. 1997). Todos los linfomas gástricos de esta serie están en el grupo de pacientes ADVP.

5.5.- Número de células CD-4/ml y tipo de linfomas.

El número de células CD-4 era significativamente bajo en el grupo de los LI, LDCGNH y LDCG CD-30 +. Aunque las cifras más bajas de células CD-4 se encontraron en los LPSNC (media 37,57 cel/ μ l, desviación estándar +/- 44,74). La asociación entre LPSNC y niveles bajos de células CD-4 es estadísticamente significativa (p=0,0099).

Los pacientes con LB tienen más conservadas el número de células CD-4, siendo estadísticamente significativa la asociación de LB y número alto de células CD-4 (p= 0,0099).

Los linfomas T tenían unas cifras de células CD-4 intermedias entre los LB y el resto de linfomas.

Por lo tanto, los LPSNC, LDCGNH, LI, aparecen en pacientes VIH positivos cuando la inmunodeficiencia es severa mientras que los LB se desarrollan dentro de un sistema

inmune relativamente conservado. Estos datos coinciden con estadísticas previamente publicadas (Boyle MJ y col. 1990, Beral V y col. 1991, Roithman S y col 1991, Pluda JM y col. 1991, Carbone A y col. 1995, Gaidano G y col. 1998).

5.6.- Inmunofenotipo.

Al igual que todas las series publicadas, en la nuestra se observa un importante predominio del fenotipo B (91,8%) mientras que tan solo el 3,3% expresaban fenotipo T (Jellinger KA y col.1992, Levine AM. 1993, Carbone A y col 1995 y 1996). Un LDCGA CD-30 + era de fenotipo nulo y dos LI no expresaban CD-20, dato ampliamente referido en este tipo de LNH asociados al SIDA (Tirelli U y col. 1995, Delecluse HJ y col 1997).

Se ha descrito en la gran mayoría de las series publicadas que los LNH asociados al SIDA muestran reordenamientos clonales de los genes de las cadenas pesadas y ligeras de las inmunoglobulinas (Knowles DM y col. 1989, Carbone A y col. 1991). En nuestro estudio la detección de clonalidad se ha realizado aplicando métodos inmunohistoquímicos para la detección de las cadenas ligeras de las inmunoglobulinas. Se detectó clonalidad en 26 casos (42,62%), de los cuales 15 (24,59%) mostraron restricción para la cadena ligera kappa y 11 casos (18,03%) para cadena ligera lambda. Los mayores porcentajes de clonalidad se observaron en el grupo de los LDCG CD-30 + (66,66%). En los LI y en los LPSNC se detectó clonalidad para cadenas ligeras en el 46,66% y 41,66% de los casos mientras que en los LDCGNH y en los LB se detectó clonalidad en el 30% y 38,46 de los casos.

Estudios de reordenamiento del gen de las inmunoglobulinas en LNH asociados al SIDA indican que los linfomas policlonales predominan en pacientes con niveles altos de linfocitos CD-4 y están frecuentemente asociados a la presencia del VEB (Kaplan LD y col. 1995).

Nuestros resultados reflejan el mayor rendimiento del estudio inmunohistoquímico de la clonalidad B en los casos en los que se asocia diferenciación plasmática como sucede en los LI.

5.7.- Índice de proliferación.

La inmensa mayoría de los LNH asociados al SIDA son de alto grado histológico (Knowles DM y col. 1988, Carbone A y col. 1991, Ioachim HL y col. 1991, Levine AM. 1993). El estudio del índice de proliferación mediante el anticuerpo Mib-1, en nuestra serie, encontró un índice de proliferación alto o medio en el 88,4%. Los índices más altos de proliferación se demostraron en los LB y en los LDCGNH.

5.8.- Genotipo molecular (Bcl-6, Bcl-2 y p53).

En nuestra serie se ha detectado sobre-expresión de p53 dentro del grupo de LB en un número de casos menor (38,46%) que lo descrito en otras publicaciones en las que se describe sobre expresión de p53 en el 40%-60% de estos linfomas (Carbone A y col. 1995 y 1996, Martin A y col. 1998). Esta diferencia podría estar relacionada con el hecho de que los LNH asociados al SIDA, como hemos referido previamente, muestran un gran

pleomorfismo que dificulta su caracterización morfológica (Davi HJ y col. 1998) siendo, sobre todo, difícil separar los Lt-B y LDCGNH. Estudios previos (Carbone A y col. 1995 y 1996) refieren linfomas con morfología de células grandes no hendidas y alta expresión de p53 que tienen traslocaciones del gen c-myc, estos autores consideran que estos linfomas deben incluirse dentro de los Lt-B aunque se desarrollen en pacientes con una marcada inmunosupresión.

En nuestra serie los LDCGNH con sobre expresión de p53 corresponden a pacientes con una marcada inmunosupresión (43 células CD-4/ μ l). Debido a que nosotros no hemos realizado el estudio molecular del gen c-myc no podemos valorar su posible inclusión en el grupo de los Lt-B .

También destaca el alto porcentaje de LPSNC y LDCGNH CD-30 + que muestran morfología de células grandes no hendidas, con sobre-expresión de p53, dato no descrito en otras series (Carbone A y col. 1996, Camilleri-Bröet y col. 1997, Martin A y col. 1998). De forma que nuestros resultados apoyan que la alta expresión de p53 se asocia a linfomas con morfología de célula grande no hendida además de a los LB. De todas formas la sobre-expresión de p53 no se asocia estadísticamente con ningún tipo de linfoma.

El mayor porcentaje de expresión de la proteína Bcl-2 se observó en los LDCG CD-30 + (55,5%) y en los LPSNC (41,6%). Ningún caso de LB expresaba dicha proteína y los LI solo el 20% de los casos presentaron expresión de Bcl-2. Tampoco expresaba Bcl-2 ninguno de los linfomas T.

La ausencia de expresión de Bcl-2 es característica, por tanto, no solo de LB de la población general sino también de los LB asociados al SIDA (Lair R y col. 1998).

Se observó una alta asociación entre la expresión de Bcl-2 y LMP-1 en los LDCG CD-30 + y LPSNC. Este hallazgo podría estar relacionado con la conocida capacidad de la LMP-1 para inducir niveles celulares sostenidos de Bcl-2 (Camilleri-Bröet S y col. 1995). Sin embargo, los LI que muestran en un alto porcentaje expresión de la proteína LMP-1 solo expresaban Bcl-2 un 20% de ellos. Una publicación reciente muestra la alta asociación entre los LI con diferenciación plasmocitoide y la sobre expresión del oncogén TCL-1 (Teitell M y col. 1999). La función de la proteína que codifica este oncogén parece estar relacionada con la prevención de la apoptosis de forma parecida a la acción que ejerce Bcl-2. La baja expresión de Bcl-2 en los LI asociados al SIDA podría estar asociada a la sobre-expresión de TCL-1 que ejercería una acción semejante a Bcl-2. La inducción de LMP-1 sobre Tc1-1 es una posibilidad que deberá investigarse.

Destaca, también, en nuestra serie los altos niveles de Bcl-2 en LDCG CD-30 + no descrito en otros trabajos publicados.

Los LDCG en la población general expresan Bcl-2 hasta en un 70% de casos (Lai R y col. 1998). Sin embargo, el grupo LDCGNH asociadas al SIDA solo presenta sobre expresión de Bcl-2 un 20% de ellos.

El oncogén BCL-6 puede sufrir alteraciones en los linfomas tanto debido a mutaciones como a reordenamientos cromosómicos (Kersckaert JP y col. 1993, Ye BH y col. 1995, Migliazza A y col. 1995), estas lesiones moleculares determinan una sobre-expresión de la proteína (Ye BH y col.1995, Chen W y col. 1998). Las mutaciones aparecen en un 70% de los LDCG asociados al SIDA, mientras que los reordenamientos se encuentran en un 20% de dichos linfomas (LoCoco F y col. 1994, Gaidano G y col. 1994).

En la serie de LNH asociados al SIDA publicada por Carbone A y colaboradores se describe sobre-expresión de la proteína Bcl-6 detectada mediante técnica de inmunohistoquímica en el 100% de los LB y en el 100% de los LDCGNH mientras que solo se detecta en el 22,2% de los LI asociados al SIDA (Carbone y col. 1997 y 1998).

En los LPSNC se detectaron mutaciones del gen Bcl-6 no habiéndose encontrado reordenamientos del gen en ningún caso (LoCoco F y col.1994, Gaidano G y col. 1994, Carbone A y col. 1998). La expresión de la proteína aparece en más de la mitad de los casos en este tipo de linfomas (Larocca LM y col. 1998).

Como en la mayoría de las otras series publicadas en nuestro estudio destaca la presencia de expresión de la proteína Bcl-6 en los LB y en los LDCGNH, observándola en el 69,2% de nuestros casos de LB y en el 70% de los LDCGNH. Además la expresión de la proteína Bcl-6 se asocia de forma significativa con los LB ($p=0,0011$). Esta asociación no se ha demostrado en el grupo de los LDCGNH ($p=0,0248$), posiblemente debido al pequeño número de casos que componen este grupo de linfomas en nuestra serie.

En nuestro grupo de LI solo detectamos expresión de Bcl-6 en el 6,6% de los casos, porcentaje más bajo que el referido en otras series (Carbone A y col. 1997 y 1998). Mientras que en los LDCG CD-30 + la proporción de positividad de Bcl-6 estaba entorno al 22,2%.

Se han descrito dos grandes grupos LPSNC asociados al SIDA uno de ellos caracterizado por el fenotipo BCL-6 +/ LMP-1 -/ BCL-2 -, que suele mostrar una morfología de células grandes no hendidas y el otro con fenotipo BCL-6 -/ LMP-1 +/ BCL-2 +, que suele tener morfología inmunoblástica (Larocca LM y col. 1998). La expresión de la proteína BCL-6 en los LPSNC aparece en las diferentes series entorno al 50% (Carbone A y col. 1996, Larocca LM y col. 1998).

En nuestro trabajo todos los LPSNC estudiados mostraban expresión de la LMP-1, tanto los linfomas con morfología inmunoblástica como los de célula grande no hendida. Solo en dos casos se estudió la expresión de Bcl-6 en dos casos y ambos resultaron negativos, un caso tenía morfología inmunoblástica y otro de célula grande no hendida.

5.9.- Expresión de la proteína LMP-1 y su correlación con Bcl-6 y CD-40.

La LMP-1 esta implicada en la traducción de señales para el crecimiento y la proliferación celular a través de factores de transcripción de la familia NF- κ B (Hammarskjöld ML y col. 1992, Laherty CD y col.1992). LMP-1 regula la actividad de NF- κ B produciendo cambios en la molécula inhibidora I κ B α mediante un mecanismo de fosforilación seguido de proteolisis (Herrero JA y col. 1995).

Este mecanismo de inducción de la proliferación celular a través de la proteína LMP-1 ha sido demostrado en tejidos procedentes de LNH asociados al SIDA y de la enfermedad linfoproliferativa post-transplante (Liebowitz D.1998).

En los LNH asociados al SIDA se observa expresión de LMP-1 fundamentalmente en los LI sistémicos y en los LPSNC asociados al SIDA (MacMahon EME y col. 1991, Camilleri-Bröet S y col. 1995, Carbone A y col. 1997, Gaidano G y col. 1998).

Al igual que en otras series, en la nuestra, destaca a frecuente expresión de la proteína LMP-1 en los LPSNC y en los LI observándose en el 100% y en el 66,6% de casos respectivamente. También se observa expresión de LMP-1 en todos los LDCG CD-30+. Observándose una fuerte asociación estadística entre la expresión de LMP-1 y los LPSNC, LI y LDCG CD-30 + ($p=0,0013$).

La presencia de LMP-1 y Bcl-6 parecen modularse mutuamente de tal manera que la mayor expresión de una de ellas inhibe la presencia de la otra proteína (Dalla-Favera R y col.1996). Así, en los LNH asociados al SIDA la presencia de LMP-1 es excluyente con la expresión de Bcl-6 y se une al fenotipo Bcl-6 - /syn-1 +. Este fenotipo se expresa fisiológicamente en células plasmáticas de las áreas interfoliculares (Sanderson RD y col. 1989, Wijdenes J y col. 1996), lo que ha sugerido que la maduración post-centro germinal es necesaria para la expresión de LMP-1 en las neoplasias de linfocitos B (Carbone A y col. 1997 y 1998). Por otra parte, un fenotipo Bcl-6 +/- syn-1 - / LMP-1 - parece asociarse con los linfomas que se originan en linfocitos B relacionados con el centro germinal (Carbone A y col. 1997 y 1998, Gaidano G y col. 1998). Es decir el fenotipo Bcl-6+/syn-1- se relaciona con los linfocitos del centro germinal (Flenghi L y col. 1995).

Nuestros resultados confirman dichos hallazgos: así los LB y LDCGNH muestran una alta expresión de Bcl-6 (69,2% y 70%) con una baja expresión de LMP-1 (15,3% y 20%) y, por otro lado, los LI, LDCG CD-30 + y LPSNC que expresan frecuentemente LMP-1 (66,6%, 100% y 100%) se asocian a baja incidencia de expresión de la proteína Bcl-6 (6,6%, 22,2% y 0%).

La LMP-1 induce la expresión de marcadores de activación celular, entre ellos CD-40 (Wang D y col. 1988). Según esta teoría era de esperar una mayor presencia de CD-40 en aquellos grupos de linfomas con expresión de LMP-1. En nuestra serie la distribución de CD-40 es homogénea en todos los grupos de linfomas, así en los LB es de un 69,2%, en los LDCGNH 60%, LI 83,3% y en los LDCG CD-30 + 80%. La alta expresión de CD-40

en los LNH asociados al SIDA no parece inducida por la proteína LMP-1 y podría relacionarse con la característica de marcador de linfocitos B activados que posee CD40 (Law CL y col. 1990). CD-40 se expresa en linfocitos del centro germinal y del manto folicular en ganglios linfáticos no neoplásicos (Carbone A y col.1995).

El porcentaje de células neoplásicas que expresan LMP-1 es muy variable de forma que oscila entre la presencia de escasas células neoplásicas positivas en algunos casos a la presencia de expresión de LMP-1 en la mayoría de las células neoplásicas en otros casos.

El hecho de que existan casos en los que solo una proporción de células tumorales exprese LMP-1 sugeriría que esta no debe ser necesaria para el mantenimiento de la transformación celular. Otra explicación posible para este hallazgo sería que la infección por el VEB fuera secundaria al establecimiento del clon tumoral, produciéndose la infección en una minoría de células tumorales después de la transformación neoplásica. Esta hipótesis significaría que el VEB no jugaría un papel fundamental en la patogénesis de estos linfomas. Otra posibilidad para la expresión irregular de LMP-1 sería que la expresión de la proteína estuviera relacionada con la fase del ciclo celular en la que se encuentran las células neoplásicas (Hamilton-Dutoit SJ y col. 1992). Así, por ejemplo, en estudios realizados “in vivo” en amígdalas de pacientes con mononucleosis infecciosa e “in vitro” en líneas celulares linfoblastoides infectadas por el VEB, solo una proporción de las células expresan LMP-1 al mismo tiempo (Pallesen G y col.1992).

5.10.- Expresión de EBERs.

Los EBERs son ARNs expresados en un alto número de copias en células infectadas de forma latente por el VEB que pueden detectarse por métodos de hibridación “in situ” (Howe JG y col. 1986). La presencia de expresión de EBERs determinada mediante estas técnicas muestra variabilidad de célula a célula en las neoplasias (Herbst H y col. 1992). La degradación del ARN en los tejidos procesados rutinariamente podría explicar la ausencia de señal específica en una proporción de células tumorales (Korbjuhn P y col. 1993). La presencia de EBERs esta relacionada con la infección latente por el VEB y se ha sugerido que en la fase lítica la expresión de EBERs podría frenarse y aunque no hay evidencia de que esto ocurra en la fase latente de la infección, esta posibilidad no puede en la actualidad descartarse totalmente (Niedobitek G. 1995).

En los LNH asociados al SIDA el grupo histológico que con mayor frecuencia expresa EBERs es el de los LI (Carbone A y col. 1995).

En nuestro trabajo la mayor presencia de EBERs se detectó en los LPSNC y en los LDCG CD-30 + (100%) mientras que en los LI el porcentaje fue algo menor (93,3%). Estos tres grupos de linfomas se asocian estadísticamente con la expresión de EBERs ($p=0,0001$). En el grupo de LB solo el 46% expresa EBERs y en los LDCGNH lo hacen únicamente el 30%.

La presencia simultanea de LMP-1 y EBERs fue muy alta en los LPSNC, LDCG CD-30 + y LI. Esta asociación fue mucho menor en los LB. De los tres LDCGNH con expresión de EBERs dos de ellos expresaron LMP-1.

La frecuente presencia de genoma del VEB en los LDCG es un hecho evidente (Ballerini P y col. 1993, Hamilton-Dutoit SJ y col. 1991 a y 1993 a, Gaidano G y col. 1995, Carbone A y col.1996). Sin embargo la frecuencia de esta asociación en el caso de los LB es mucho menor, como ya ha sido descrito previamente (Carbone A y col, 1996 y Gaidano G y col. 1995 y 1998). El estudio de la expresión de CD-30 en los LDCGNH permite separar dos subgrupos: aquellos que expresan CD-30 que se asocian a una mayor expresión de LMP-1 y EBERs y por tanto a la presencia del VEB y, por otro lado, el grupo que no expresa CD-30 en los que la incidencia de asociación al VEB es mucho menor (Kanavaros P y col. 1992).

5.11.- Tipaje del VEB.

Se han identificado 2 tipos de VEB el tipo 1 o A y el tipo 2 o B. El gen EBNA 2 es el más utilizado para diferenciar estos dos tipos de virus, ya que tienen tan solo un 56% de su secuencias idénticas (Sixbey JW y col.1989, Jilg W y col. 1990). Otros genes utilizados para el tipaje del virus son EBNA 3A, 3B, y 3C (Samples J y col. 1990). En nuestro trabajo el tipaje se ha realizado amplificando con PCR del gen EBNA 3C, el producto de la amplificación del gen EBNA-3C del VEB tipo 2 es un fragmento de 246 pb, mientras que el producto de la amplificación del gen EBNA-3C del VEB tipo 1 es un fragmento de 153 pb (Samples J y col. 1990, Santon A y col. 1998).

Los sujetos de raza blanca sanos, usualmente, portan una sola cepa del VEB, fundamentalmente del tipo 1. En las personas infectadas por el VIH-1 pueden encontrarse infecciones tanto por el tipo 1 como por el tipo 2. En los LNH asociados al SIDA se han detectado cualquiera de los dos tipos de virus (Boyle MJ y col.1991, Shibata D y col. 1993). Esto sugiere que ambos tipos de virus pueden jugar un papel oncogénico en el contexto de un sistema inmune deficiente. En los enfermos inmunosuprimidos se ha descrito una mayor incidencia de infección por el VEB tipo 2 que en la población sana (Boyle MJ y col. 1993). También, se ha descrito una mayor frecuencia de coinfecciones por las cepas del VEB 1 y 2 (Sculley y col. 1990, Buisson M y col. 1994, Yao QY y col. 1996).

La cepa del VEB de tipo 2 parece ser un agente transformador neoplásico menos eficaz que el tipo 1 y podría requerir una inmunodeficiencia más severa para establecer una infección diseminada “in vivo” e inducir el crecimiento celular de las enfermedades linfoproliferativas (Boyle MJ y col. 1993).

El tipo 1 del VEB se encuentra con mayor frecuencia que el tipo 2 en las lesiones linfoproliferativas post-transplante y en los LDCG asociados al SIDA y el tipo 2 es más frecuente, en algunas series, en los LB asociados al SIDA (Ometto L y col. 1997).

En nuestro estudio la amplificación del gen EBNA 3C, realizada sobre los ADNs extraídos de los tejidos afectados por linfoma y dentro del grupo en los que se había detectado expresión de EBERs, fue conseguida en el 91% de los casos. En el 48,8% de ellos el VEB era de tipo 1, en el 24,4% de los casos era de tipo 2 y en el 17,7% de los casos se detectaron infecciones duales. Al igual que en otros trabajos publicados también el tipo 1 fue la cepa más frecuente del VEB encontrada en nuestra serie (Ometto L y col. 1997).

Aunque el tipo 2 del VEB aparece más frecuentemente en los tejidos afectados LNH de pacientes con SIDA (24,4%) que en las muestras de tejido de la población control (4%).

En el grupo de LDCG CD-30 + es importante señalar el alto porcentaje de casos en los que se detectan infecciones duales alcanzando al 44,4% de las muestras siendo la forma más frecuente de infección. En el resto de los grupos predomina el VEB tipo 1, también en el caso de los LB, a diferencia de lo que se describe en otros trabajos (Ometto L y col. 1997). En nuestro estudio la mayor incidencia del VEB de tipo 2 también se observa en los LB y LDCG CD-30 + (33,3%), seguidos de los LPSNC (25%).

El estudio de la presencia del VEB tipo 2, tanto de forma aislada como en forma de coinfecciones, en los LNH asociados al SIDA y su relación con los grupos de riesgo muestra que el porcentaje de cepas de tipo 1 y de tipo 2 es semejantes en los distintos grupos de riesgo y solo se observa una mayor frecuencia de infección por el tipo 2 en los paciente homosexuales. En nuestro trabajo esta diferencia es poco relevante y no contribuye a pensar

que la prevalencia del VEB tipo 2 sea mayor en pacientes homosexuales que en otros grupos de riesgo como se ha mencionado en otros estudios (van Baarle B y col.1999).

5.12.- Distribución de la presencia de las cepas salvajes y delecionada del gen LMP-1 del VEB.

La LMP-1 actúa como un oncoproteína capaz de transformar fibroblastos, producir tumores en ratones desnudos (Wang G y col. 1995), induce el crecimiento de células-stem multipotenciales hematopoyéticas y de células epiteliales (Hu L y col. 1993) y es esencial para el crecimiento y transformación de linfocitos B (Henderson S. 1991, Peng M y col. 1992). La LMP-1 posee un extremo carboxilo-terminal con 200 aminoácidos necesarios para la transformación maligna de las células y que esta relacionado con la vida media de la proteína (Izumi K y col. 1994, Liebowitz D. 1998).

La deleción de 30 pb en el extremo 3' del gen LMP-1 (del-LMP-1) correspondiente a los aminoácidos 346 a 355 de la proteína (Hudson GS y col. 1985) se ha demostrado que prolonga la vida media de la misma (Moorthy RK y col. 1993) y que se relaciona con un potencial mayor para inducir tumores (Chen M y col. 1992, Hu L y col. 1993). Además, se cree que la deleción esta asociada con signos histológicos de comportamiento agresivo en carcinomas nasofaríngeos y en la enfermedad de Hodgkin (Knecht H y col 1993a, Santon A y col. 1995).

En la mayoría de los estudios publicados en los linfomas asociados al SIDA se detecta una alta incidencia de las cepas caracterizadas por poseer la delección de 30pb en el gen LMP-1 (del-LMP-1) (100% en la enfermedad de Hodgkin y 50% - 78% en linfomas no Hodgkin) (Knecht H y col. 1993, Santon A y col. 1995 y 1998). En la población sana y en los linfomas asociados al VEB de pacientes VIH negativos la incidencia de la cepa delecionada es mucho menor (24% en la enfermedad de Hodgkin y del 43 al 50% en linfomas no Hodgkin) (Knecht H y col. 1993, Santon A y col. 1995 y 1998).

La enfermedad de Hodgkin de adultos infectados por el VIH el porcentaje de casos asociados a la cepa del VEB delecionada es mayor del 90%. Este hallazgo ha sugerido que la infección por esta variante del virus podría incrementar el riesgo de desarrollar enfermedad de Hodgkin en el contexto de la inmunosuficiencia asociada a la infección por el VIH (Bellas C y col. 1996, Santon A y col.1995, Dolcetti R y col. 1997). También se ha encontrado una estrecha relación entre la cepa del-LMP-1 y la enfermedad de Hodgkin pediátrica (Santon A y col. 1998).

En España en la población sana la incidencia de las cepas del-LMP-1 es mucho menor que la de la cepa salvaje. Además la presencia de infecciones dobles por cepas del VEB con el gen LMP-1 salvaje y delecionado es un hecho frecuente en niños sanos y en la enfermedad de Hodgkin pediátrica (Santon A y col. 1998). La presencia de este tipo de coinfección ha sido también descrita, aunque de forma menos frecuente, en la población inmunocompetente y

en pacientes infectados por el VIH (Cheung ST y col.1996, Chen HL y col. 1996, Knecht H y col. 1996, Yao QY y col.1996, Dolcetti R y col.1997).

En nuestro estudio, considerados todos los linfomas que expresan EBERs, la proporción de la cepa delecionada y no delecionada (o salvaje) fue semejante (46,6% y 40%), siendo escasa la presencia de coinfecciones (4,4%). En otras series el porcentaje de cepas del VEB con la deleción del extremo 3' del gen LMP-1 en los LNH asociados al SIDA es algo mayor entre el 50% y el 78% (Knecht H y col. 1993). En nuestra serie destaca una presencia frecuente de la cepa salvaje en los LPSNC (66,6%), y sin embargo en todos los casos de LB asociados al VEB se identificó la cepa delecionada siendo esta asociación significativa en el estudio estadístico ($p=0,0049$).

En nuestro estudio se observó una alta asociación del tipo 2 del VEB con la cepa delecionada (del-LMP-1). Teniendo en cuenta que el VEB tipo 2 tiene un menor poder oncogénico que el tipo 1 (Rickinson AB y col.1987, Rowe M y col.1991) la asociación del tipo 2 del VEB con deleción en el gen de LMP-1 podría aumentar el potencial oncogénico de este tipo de virus. La mayor presencia de la cepa del-LMP-1 en los LB podría relacionarse con la mayor incidencia en este tipo de linfoma del VEB de tipo 2.

Los LNH estudiados en nuestra serie que presentaron coinfecciones por el VEB tipo 1 y 2 tenían mayor presencia de las cepas no delecionadas del gen LMP-1. En los casos con infección por el VEB tipo 1 existe un porcentaje semejante de cepas delecionada y salvaje.

Relacionando grupos de riesgo con la presencia de del-LMP-1 existe un porcentaje más alto de presencia de la cepa del-LMP-1 en los paciente homosexuales. Es posible que una mayor promiscuidad sexual determine una posibilidad mayor de infectarse por dichas cepas.

5.13.- Patrones de latencia en los LNH asociados al SIDA.

Los LB y Lt-B usualmente muestran un patrón de latencia tipo I (LMP-1 - / EBNA 2 - / EBERs +) y menos frecuentemente un tipo II (LMP-1 + / EBNA 2 - / EBERs +). Mientras que los LDCG suelen mostrar un patrón de latencia tipo I, II o III (LMP-1 + / EBNA 2 + / EBERs +) (Davi F y col. 1998).

Estos patrones de latencia concuerdan con los fenotipos aparecidos en nuestro trabajo. Así, en los LB asociados al VEB encontramos un fenotipo LMP-1 - / EBERs + el 66,6% de casos mientras que el 33,3% muestran un fenotipo LMP-1 + / EBERs +.

Los LPSNC y los LDCG CD-30 + todos los casos (100%) tenían un fenotipo LMP-1 + / EBERs +.

El 33,3% de los LDCGNH asociados al VEB presentaron un fenotipo LMP-1 - / EBERs + y fenotipo LMP-1 + / EBERs + el 66,6%.

El fenotipo LMP-1 + / EBERs + fue el más frecuente en los LI asociados al VEB 71,4% mientras que solo el 28,5 de ellos presentaban fenotipo LMP-1- / EBERs +.

5.14.- Mecanismos patogénicos en los LNH asociados al SIDA.

Se han postulado principalmente dos mecanismos patogénicos implicados en el desarrollo de linfomas en los pacientes con infección por el VIH: La estimulación antigénica crónica (Ng VL y col. 1998) y la infección por el VEB (Carbone A y col. 1996, Gaidano G y col. 1996). En ambos mecanismos subyace un trastorno de la inmunovigilancia; así la posibilidad del desarrollo de linfomas es mayor cuanto menor es el número de células CD-4/ μ l (Pluda y col. 1993). La asociación entre niveles bajos de células CD-4 y LNH asociados al SIDA es particularmente llamativa en los casos de LDCG, LDCGA CD-30 +, LPSNC y LPC. Mientras que en los LB se observa un sistema inmune con un número de células CD-4 relativamente preservado (Pedersen C y col. 1991, Roithman S y col 1991, Pluda JM y col. 1993, Carbone A y col. 1996, Gaidano G y col. 1996, Camilleri-Bröet S y col. 1997, Karcher DS y col. 1997).

A menudo se demuestra hiperestimulación antigénica en pacientes infectados por el VIH detectándose hipergammaglobulinemia y linfadenopatía generalizada persistente (Pelicci PG y col . 1986, Karp JE y col. 1991). Dicha hiperestimulación produce expansiones policlonales de linfocitos B que podrían derivar en expansiones oligoclonales (premalinas). Posteriormente la acumulación de lesiones genéticas o alteraciones

inducidas por proteínas virales conducirían al crecimiento de una población clonal de linfocitos B que darían lugar al desarrollo de linfomas (Gaidano G y col. 1995).

Los resultados aportados por nuestro trabajo, apoyan la hipótesis previamente planteada por Gaidano y col que sugieren 2 mecanismos implicados en el desarrollo de LNH en pacientes con SIDA.

En el primer grupo se incluyen los LB y los LDCGNH. En ellos el mecanismo fundamental podría ser la hiperestimulación antigénica crónica que favorecería el desarrollo de expansiones clonales de linfocitos mediante alteraciones moleculares del gen c-myc y del gen Bcl-6.

En el segundo grupo patogénico estaría constituido por los LI, LDCG CD-30 + y LPSNC. En este grupo la expansión clonal estaría estrechamente asociada a la infección por el VEB.

Los LB asociados al SIDA como los linfomas de Burkitt de la población VIH negativa albergan traslocaciones cromosómicas del gen c-myc entre la banda 8 q 24 y genes de las inmunoglobulinas, además, presentan alteraciones del gen Bcl-6 (Chaganti RS y col. 1983, Groopman JE y col. 1986, Subar M y col. 1988, Ballerini P y col, 1993, Gaidano G y col. 1993). Estas traslocaciones se han relacionado con la hiperestimulación antigénica de linfocitos B en pacientes VIH positivos en relación a diferentes posibles mecanismos como:

a) La alta proporción de mutaciones somáticas en las regiones hipervariables de los genes de las inmunoglobulinas son necesarias para desarrollar su papel en la selección y estimulación producida por los antígenos (Jain R y col. 1994).

b) El que el grupo de genes de las inmunoglobulinas relacionados con estos linfomas asociados al SIDA muestren un uso preferente de la familia VH4 la cual esta implicada en la generación de clones autoreactivos de linfocitos B (Pascual V y col. 1992, Berek C y col. 1993, Riboldi P y col. 1994, Bessudo A y col. 1996).

c) El hecho de que numerosos linfomas no-Hodgkin asociados al SIDA produzcan anticuerpos contra autoantígenos (Ng VL y col. 1994, Riboldi P y col. 1994).

d) Por último sabemos que el VIH puede actuar sobre macrófagos y su mutagénesis (Shiramizu B y col. 1994 y 1997). Estos macrófagos que portan el material genético del VIH proliferarían de forma clonal y secundariamente podrían influir contribuyendo a la proliferación de los linfocitos que les rodean, los cuales serian susceptibles de posteriores alteraciones genéticas como son las traslocaciones cromosómicas del gen c-myc o las alteraciones del gen Bcl-6 (Herder BG y col. 1994).

El genoma del VEB se identifica, en algunos estudios, hasta en un 30% de los LB asociados al SIDA (Gaidano G y col. 1998). La infección por el VEB en estos tumores se considera que es un factor de predisposición para el posterior desarrollo de linfomas en el contexto de la linfadenopatía generalizada persistente (Shibata D y col. 1991). Las

células neoplásicas de este grupo de LB, generalmente, no expresan EBNA-2 y LMP-1, que son claves para inducir la transformación de linfocitos B (Carbone y col. 1993). Esta observación sugiere que el VEB no es el principal factor en la patogenia de estos linfomas aunque puede ser un agente coadyuvante (Gaidano G y col. 1998).

El hecho de que en nuestro trabajo se detecte una alta incidencia de expresión de Bcl-6 en los LB y en los LDCGNH (69,2% y 70%) y una frecuente sobre expresión de p53 en los LDCGNH (40%) junto a una baja incidencia de la expresión de la proteína LMP-1 en estos dos tipos de linfomas (15,3% y 20%) sugiere que en estos casos el VEB no debe ser un agente etiológico fundamental. Aunque el hecho de que en un número no despreciable de ellos se detecte la presencia de EBERs (46,1% y 30%) apoya la posibilidad de que el VEB sea un agente favorecedor de su desarrollo.

Un dato indirecto del papel de la sobre estimulación antigénica en la etiología de estos dos tipos de linfomas es su preferente localización en ganglio linfático (Boyle MJ y col.1990, Carbone A y col.1995). En nuestra serie el 76,9% de los LB y el 60% de los LDCGNH se localizan en los ganglios linfáticos.

La observación en algunos trabajos de un descenso en el número de LB en enfermos con SIDA (Kaplan LD y col. 1995) también se confirma en nuestro estudio en el que el número de casos de LB es menor constituyendo únicamente el 26,5% de los LS frente a una incidencia del 30% en la mayoría de las series publicadas (Lowental DA y col.

1988, Knowles DM y col. 1988, Ziegler JL y col. 1989, Pedersen C y col. 1991, Beral V y col. 1991, Carbone A y col. 1995).

Los LDCG parece que son proliferaciones linfoides inducidas por el VEB en un contexto de respuesta T citotóxica alterada (Rowe M y col. 1991). De hecho, está demostrado que la disminución de linfocitos T citotóxicos específicos contra el VEB y el incremento en la carga viral se correlaciona con la progresión de estos linfomas (Kertein MJ y col. 1997). El papel de las condiciones inmunitarias del paciente en la progresión de los linfomas ha sido demostrado en modelos experimentales animales. Utilizando ratones con inmunodeficiencia combinada severa a los que se inocula linfocitos de sangre periférica de donantes positivos para el VEB o extractos de muestras procedentes de tejidos afectados de enfermedad de Hodgkin los animales desarrollaron distintos tipos de enfermedades linfoproliferativas después de la inoculación. El análisis de estas proliferaciones linfoides demostró, en todos ellos, la existencia de material genético del VEB (Rowe M y col. 1991, Kapp V y col. 1993).

Virtualmente todos los LPSNC asociados al SIDA albergan infección por el VEB. Esta parece ser la única alteración genética detectada en este tipo de linfomas (MacMahon EM y col. 1991, Camilleri-Bröt S y col. 1995 y 1997).

Los LDCG sistémicos y LPSNC muestran, también, en una alta incidencia expresión de antígenos transformantes del VEB (Carbone A y col. 1993, Hamilton-Dutoit SJ y col. 1991 y 1993, Camilleri-Bröt S y col. 1997, Gaidano G y col. 1998). El efecto

oncogénico de la proteína LMP-1 esta ampliamente demostrado (Izumi K y col. 1994, Liebowitz D y col. 1993 y 1998).

En nuestro estudio, los LPSNC, LDCG CD-30 + y LI mostraron una estrecha relación con el VEB. Estos 3 grupos de linfomas expresan LMP-1 en el 100% de los LPSNC, 100% de los LDCG CD-30 + y el 66.6% de casos en los LI. La hibridación "in situ" para EBERs detectó una amplia presencia de material genético del VEB en el 100% de los LPSNC, en el 100% de los LDCG CD-30 + y en el 93,3% de los LI.

Otro hecho que destaca en nuestro estudio es la alta expresión de p53 en los LDCGNH y en los LPSNC. La alta expresión de p53 en los LDCGNH puede deberse a que los Lt-B y los LDCGNH muestran un gran polimorfismo y ambos grupos son difíciles de diferenciar morfológicamente. Al no haber realizado el estudio molecular del gen c-myc no podemos valorar si estos LDCGNH que sobre expresan p53 son en realidad Lt-B con polimorfismo en la morfología de las células en el contexto de una inmunodeficiencia severa (Gaidano G y col. 1995). Las mutaciones del gen p53 y la sobre-expresión de la proteína aparecen en los LNH asociados al SIDA con o sin infección de los clones tumorales por el VEB, lo que sugiere que no hay una directa correlación entre las alteraciones en el gen p53 y la infección por el VEB en los LNH asociados al SIDA (Ballerini P y col. 1993, Gaidano G y col. 1993).

En otros estudios previos no se han encontrado alteraciones moleculares del gen p53 en los LPSNC asociados al SIDA (Camilleri-Bröet S y col. 1995).

Otro oncogén cuya expresión se detecta con relativa frecuencia es Bcl-2 principalmente en los LPSNC y en los LDCG CD-30 +, este hecho puede estar en relación con la conocida inducción de LMP-1 sobre Bcl-2 (Camilleri-Bröet S y col. 1993).

Si consideramos que en los LB y LDCGNH el mecanismo principal que mantiene la proliferación neoplásica son las alteraciones genéticas de c-myc y Bcl-6, la terapia antivírica en estos enfermos no generaría ningún beneficio, siendo subsidiarios de terapias genéticas o quimioterapia.

Por el contrario, en los LDCG CD-30 +, LI y LPSNC podría ser de utilidad la terapia antiviral contra el VEB introducida precozmente cuando los niveles de linfocitos CD-4 comienzan a disminuir o cuando la proliferación linfoide ya se ha establecido.

En todos los grupos de LNH asociados al SIDA se observan algunos casos en los que existen expresión conjunta de LMP-1 y EBERs con BCL-6, LMP-1 y EBERs con p53 o LMP-1 y EBERs con BCL-6 y p53. La coincidencia de varias lesiones genéticas dentro de un mismo linfoma podría relacionarse con la existencia de diferentes clones neoplásicos. Este hecho estaría en consonancia con la teoría de que los LNH asociados al SIDA derivan de expansiones policlonales mantenidas de linfocitos B lo que comporta la existencia de múltiples

reordenamientos que determinarían una inestabilidad genética este hecho junto a otros factores asociados al huésped daría lugar a la selección de determinados clones celulares (Gaidano G y col. 1995). En estos casos nos encontraríamos ante clones tumorales que acumulan distintas alteraciones genéticas. En la evolución de estos procesos linfoproliferativos alguno de estos clones se haría dominante.

Por otra parte, también es posible que las células tumorales con alteraciones moleculares previas puedan sufrir una sobre infección por el VEB. En este caso la infección por el VEB podría no modificar el crecimiento tumoral o bien por el contrario propiciar una ventaja para el crecimiento de dichos clones neoplásicos que están infectados por el virus. Así la detección de genoma y/o productos del VEB en la mayoría de las células tumorales no significaría obligatoriamente que la infección viral es previa al establecimiento del clon neoplásico. (Niedobitek G. 1995).

CONCLUSIONES

6.- CONCLUSIONES.

1.- Los LNH asociados al SIDA afectan fundamentalmente a los varones en todos los grupos de riesgo salvo en la forma de transmisión heterosexual en que la proporción hombre/ mujer es 1:1.

2.- Los LB y los LDCGNH asociados al SIDA se localizan preferentemente en ganglio linfático, mientras que los LI lo hacen en territorios extraganglionares, siendo estas relaciones estadísticamente significativas.

3.- Los pacientes con LPSNC se caracterizan por tener bs niveles más bajos de células CD-4 por μL de todos los grupos de LNH asociados al SIDA en el momento del diagnóstico. Mientras que el número de células CD-4 por μL más conservado se observa en los casos de LB. En ambos grupos la relación tiene significado estadístico.

4.- Los LNH asociados al SIDA son mayoritariamente neoplasias de linfocitos B que expresan el receptor CD40.

5.- La proteína Bcl-6 se asocia de forma significativa con los LB y siendo su expresión, también, muy frecuente en los LDCGNH.

6.- La sobre expresión de p53 no está estadísticamente relacionada con ninguno de los tipos de LNH asociado al SIDA aunque es más frecuente en los linfomas con morfología de células grandes no hendidas.

7.- Los LPSNC, los LI y los LDCG CD30+ desarrollados en pacientes con SIDA se asocian de forma estadísticamente significativa a la infección por el VEB. Este dato sugiere que en estos casos el VEB podría ser un paso decisivo en su génesis.

8.- La incidencia de infección por el VEB de tipo 2 es mayor en los LNH asociados al SIDA que en la población control, resultado que apoya el que dicha cepa parece requerir un estado de inmunodeficiencia para establecer la infección.

9.- En los LNH asociados al SIDA se observa una mayor incidencia de la infección por la cepa portadora de la delección de 30 pb en el extremo 3' del gen LMP-1 que la detectada en la población sana. Esta asociación tiene significado estadístico en el caso de los LB.

10.- La presencia de coinfecciones con distintas cepas del VEB es muy infrecuente en este tipo de linfomas indicando que la infección viral debe ocurrir antes de la expansión clonal.

11.- Las cepas del VEB de tipo 2 que se detectan en los LNH asociados al SIDA frecuentemente son portadoras de la delección de 30 pb del gen LMP-1, sugiriendo que dicha delección podría aumentar la capacidad transformante de la cepa de tipo 2.

12.- Nuestros resultados confirman la ausencia de Bcl-6 en los casos LMP-1 positivos apoyando el efecto freno que ejerce esta proteína sobre el gen BCL-6. Además, el hecho de que la mayoría de los LI asociados al SIDA que expresan LMP-1 son Bcl-2 negativos sugiere que podrían existir vías de prevención de la apoptosis independientes de Bcl-2 en estas neoplasias.

FIGURAS

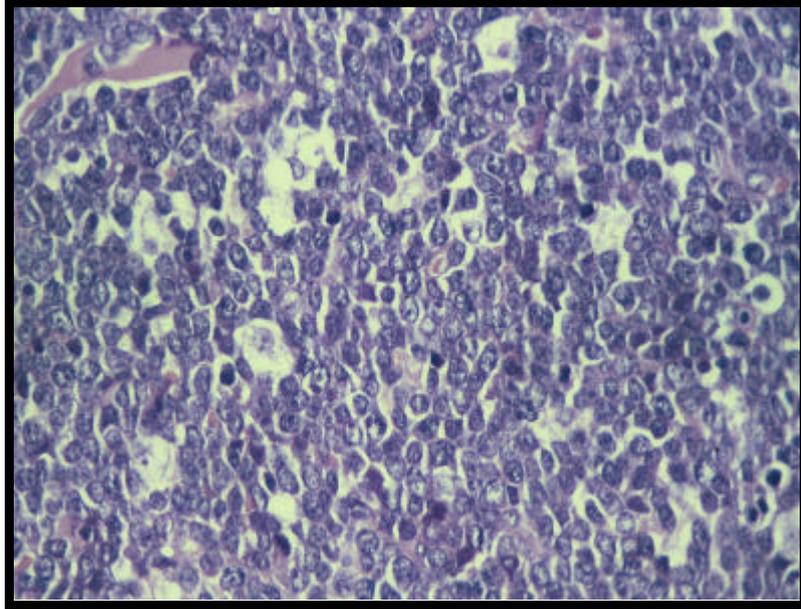


Figura 1. Linfoma Burkitt. Se observa patrón en cielo estrellado. Las células son de pequeño tamaño y sus núcleos no hendidos muestran de 2 a 5 nucleolos.

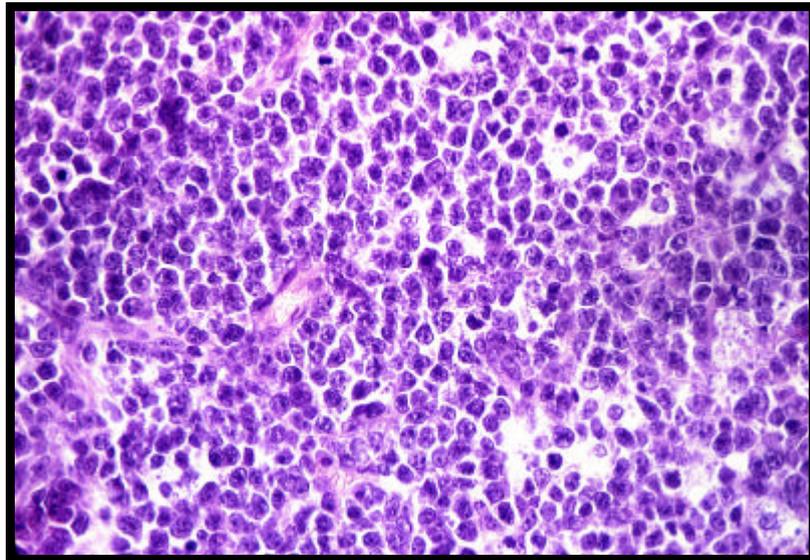


Figura 2. Linfoma tipo Burkitt. Células de pequeño tamaño junto a otras de mayor tamaño que muestran núcleos con 1 ó 2 nucleolos. Algunas células presentan diferenciación plasmocitoide.

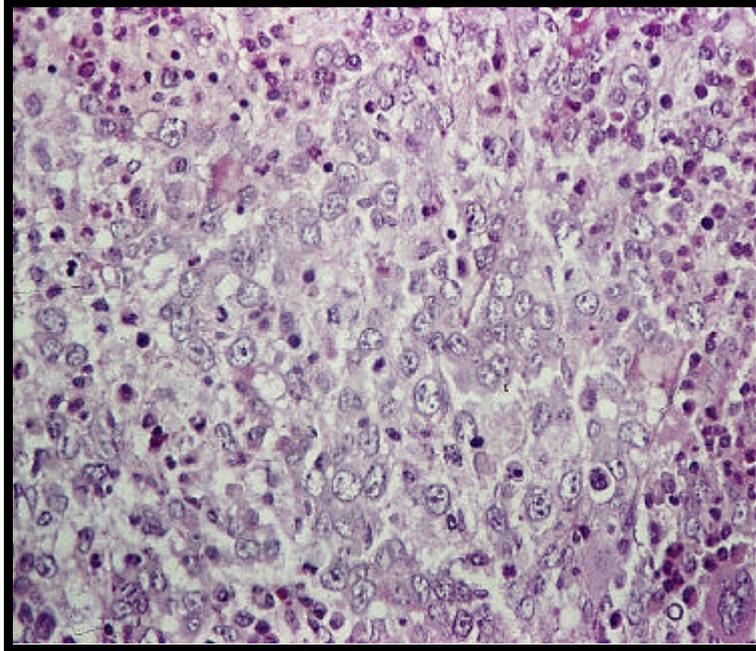


Figura 3. Linfoma difuso de células grandes no hendidas. Células grandes con núcleos no hendidos y patrón de crecimiento cohesivo.

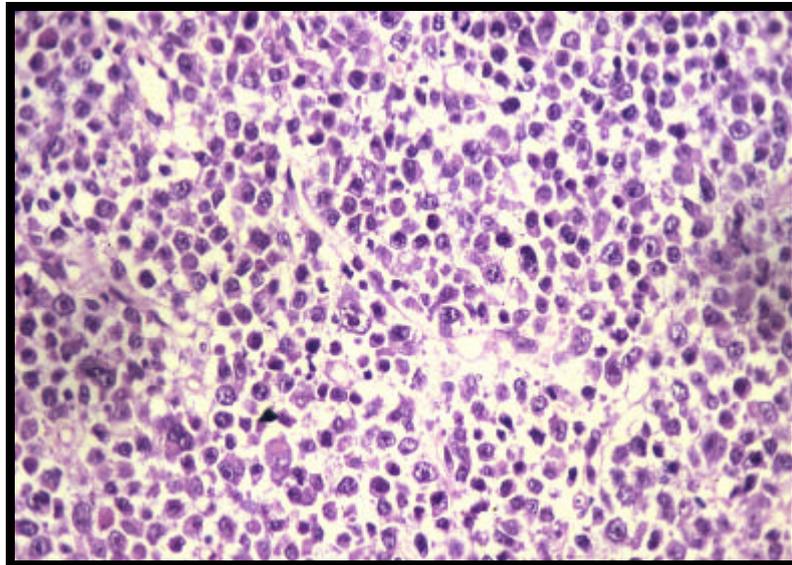


Figura 4. Linfoma inmunoblástico. Inmunobláastos con diferenciación plasmocitoide.

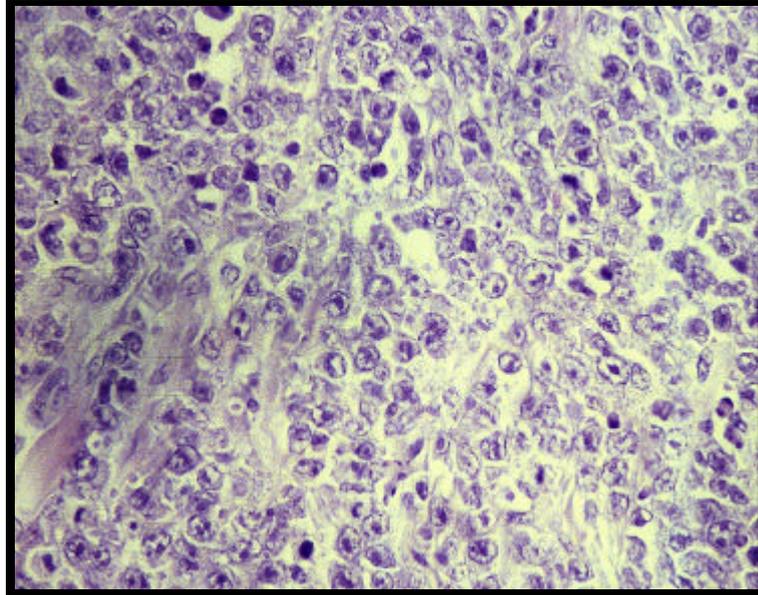


Figura 5. Linfoma inmunoblástico. Presencia de células multinucleadas tipo Reed-Sternberg.

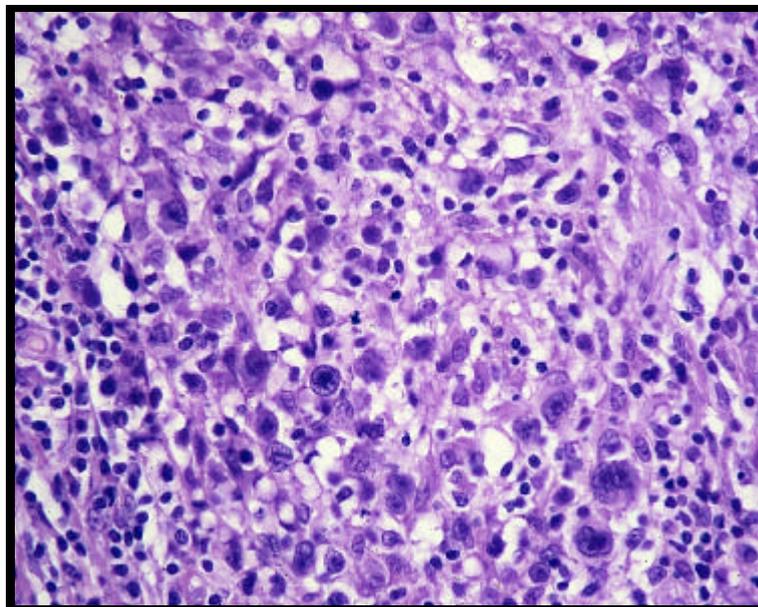


Figura 6. Hígado. Linfoma difuso de células grandes anaplásico CD-30+. Células grande pleomórfica con abundante citoplasma y núcleo irregular.

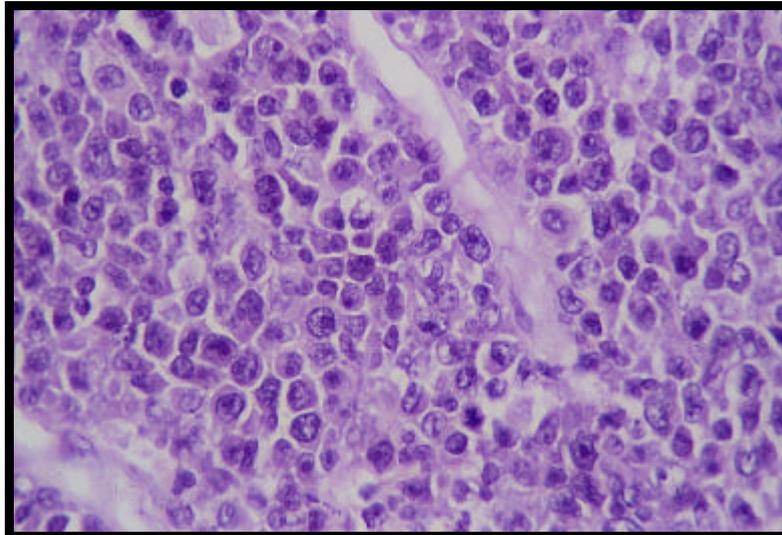


Figura 7. Linfoma primario de sistema nervioso central.

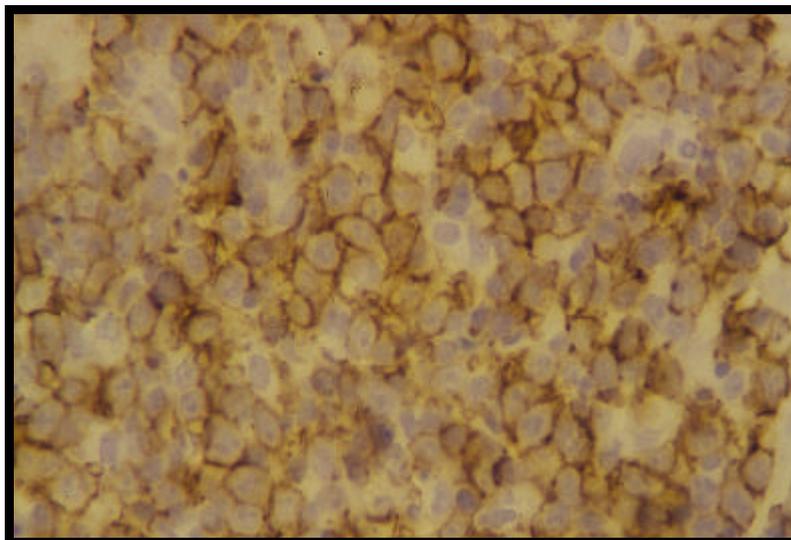


Figura 8. CD-20. Tinción citoplasmática y tinción nuclear en algunas células.

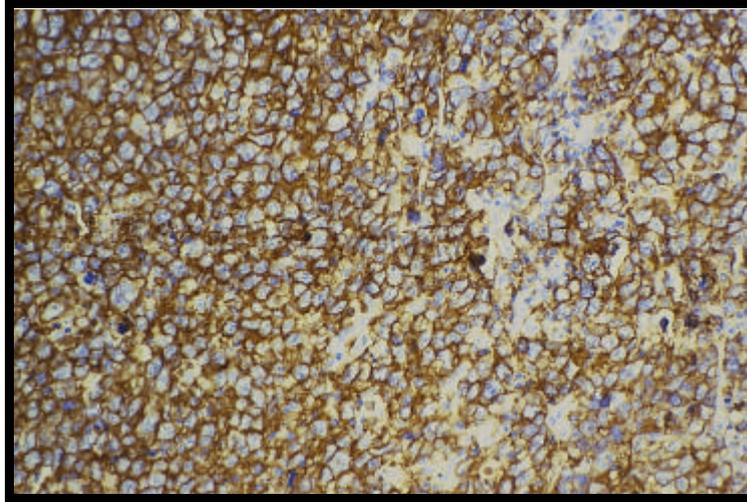


Figura 9. CD-3. Tinción de membrana y citoplasmática.

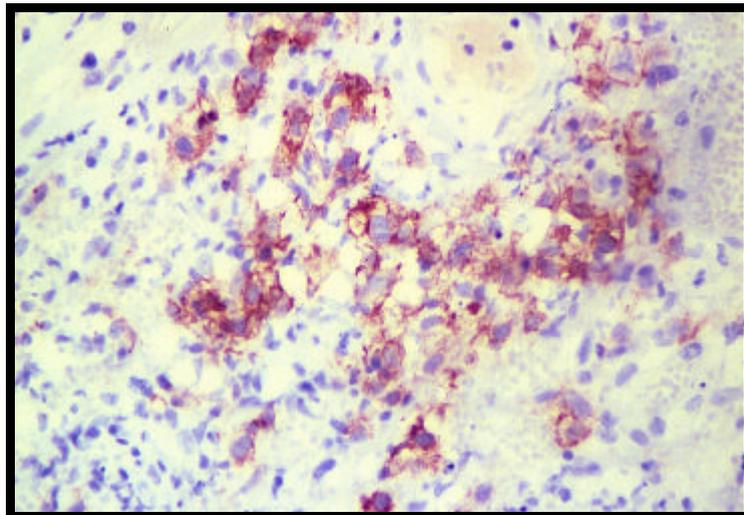


Figura 10. CD-30. Tinción de membrana y citoplasmática. Intensificación a nivel del aparato de Golgi.

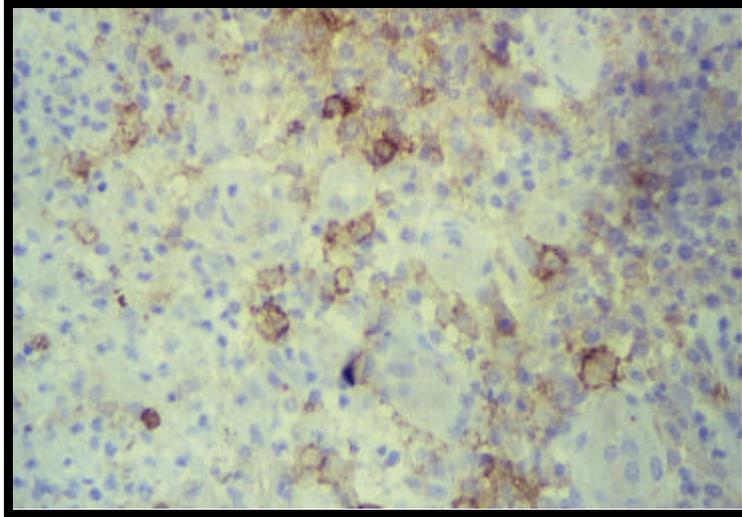


Figura 11. CD-40. Tinción de membrana intensa.

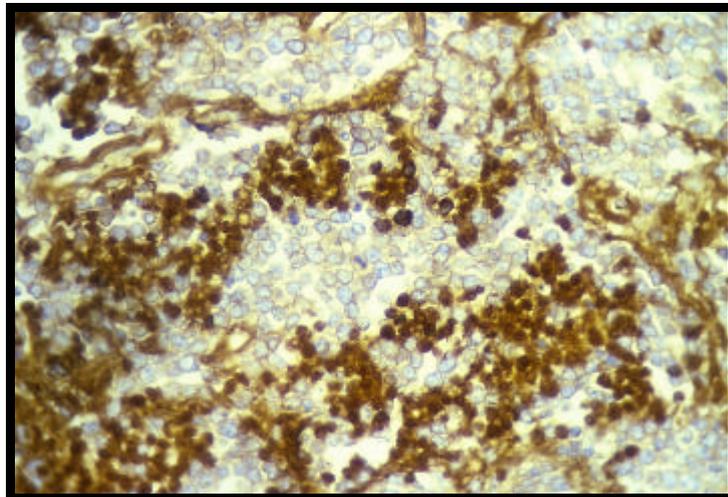


Figura 12. Cadena ligera kappa. Tinción citoplasmática y de membrana.

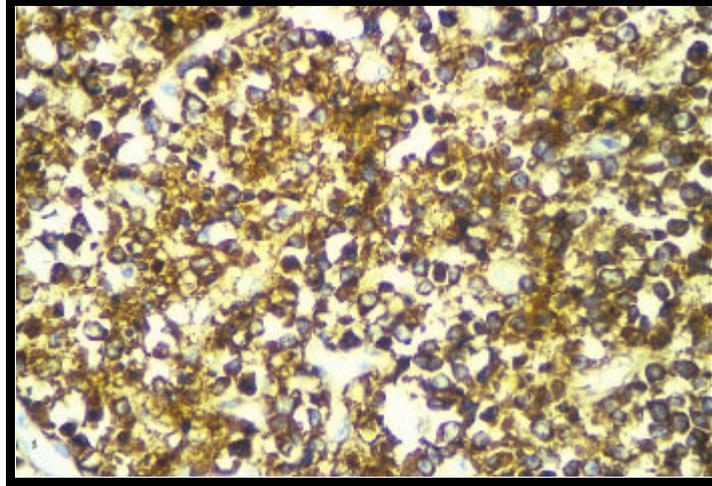


Figura 13. Cadena ligera lambda. Tinción citoplasmática y de membrana.

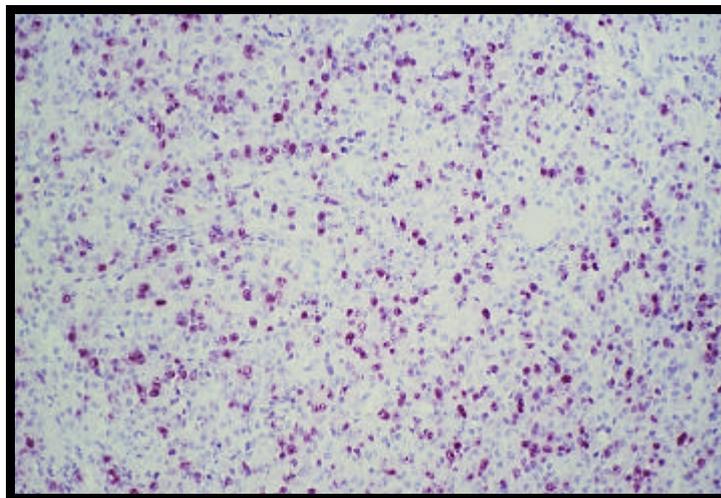


Figura 14. Mib-1. Tinción nuclear.

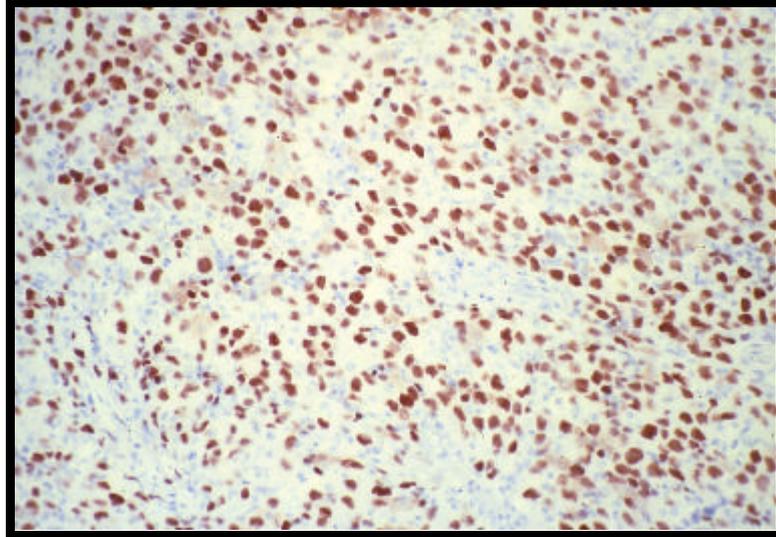


Figura 15. Expresión de p53. Tinción nuclear.

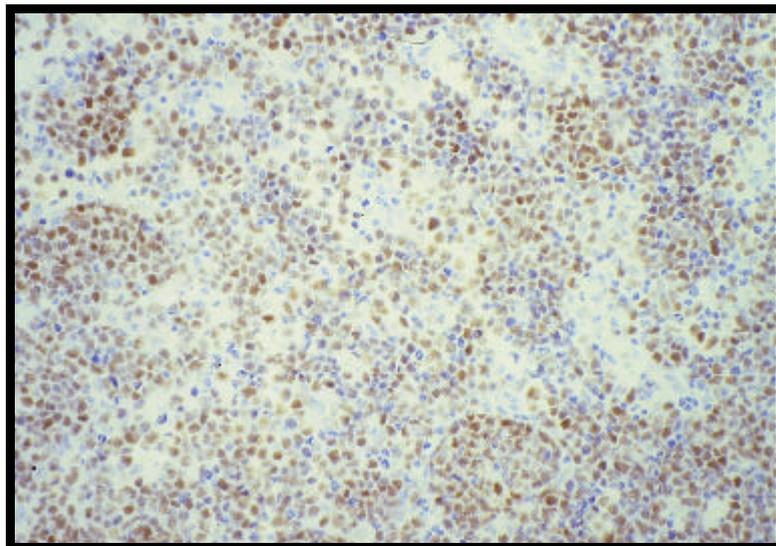


Figura 16. Expresión de Bcl-6. Tinción nuclear.

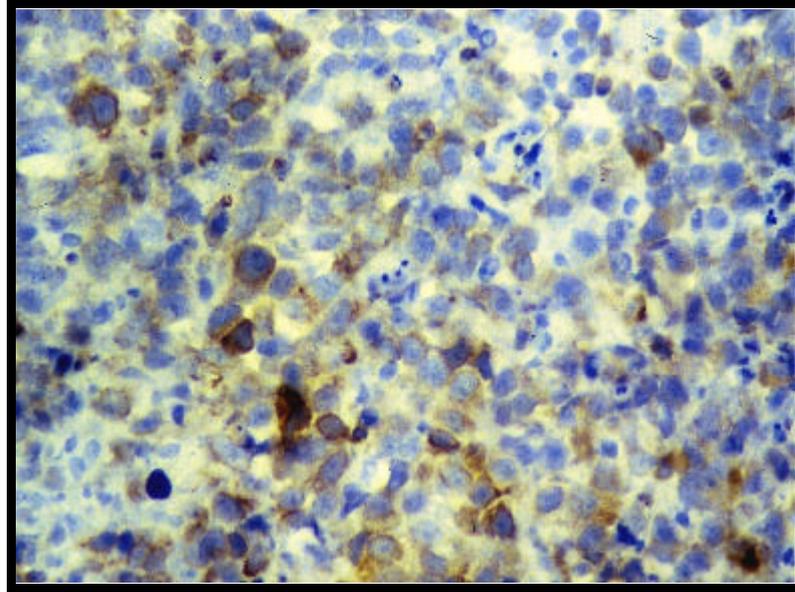


Figura 17. Expresión de Bcl-2. Tinción citoplasmática.

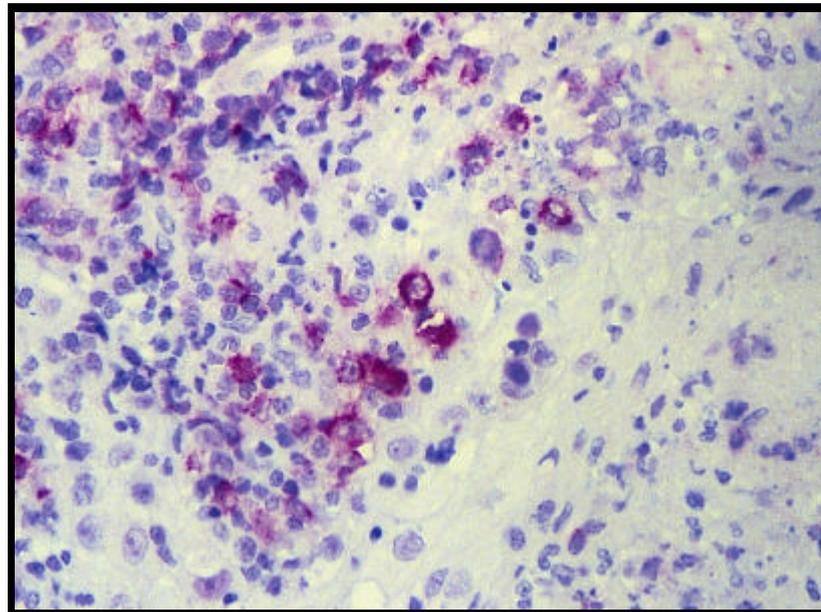


Figura 18. Expresión de LMP-1. Tinción de membrana.

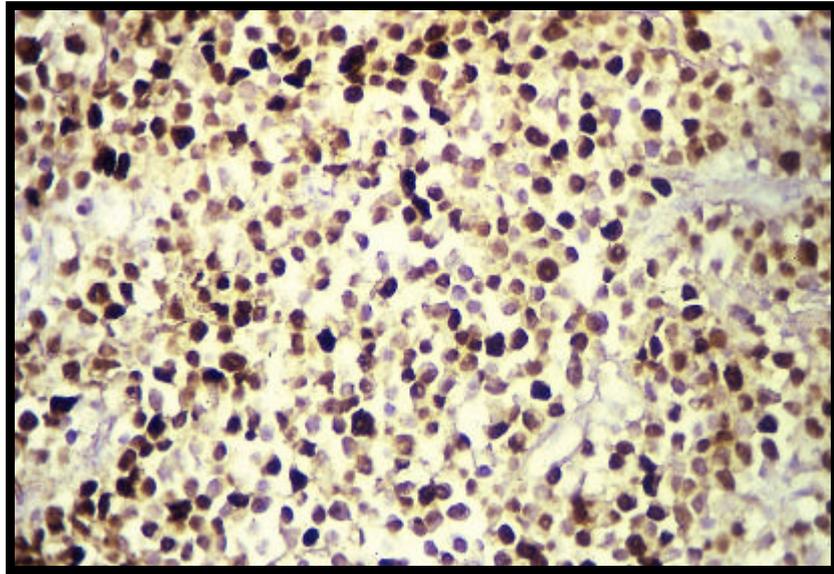


Figura 19. Hibridación “in situ” para EBERs. Tinción nuclear.

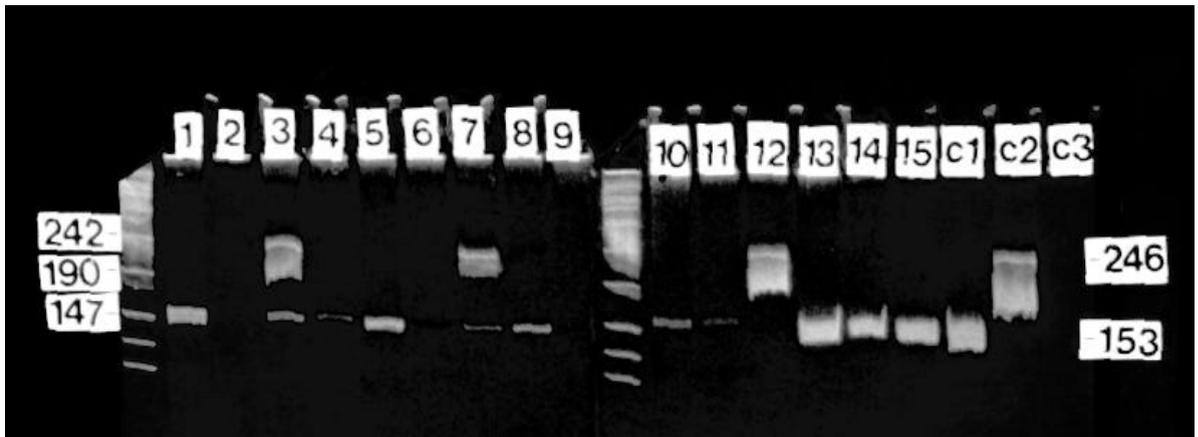


Figura 20. PCR para la tipificación del VEB. C-1: Fragmento de 153 pb correspondiente al control de tipo 1 del VEB (B 95.8). C-2: Fragmento de 246 pb correspondiente al control de tipo 2 del VEB (P3HR1). C-3: Control blanco. Las muestras 3 y 7 presentan coinfecciones por el VEB tipo 1 y 2. La muestra 2 no presenta producto de amplificación del gen EBNA-3C del VEB. Marcador de peso molecular VIII de Boehringer Mannheim.

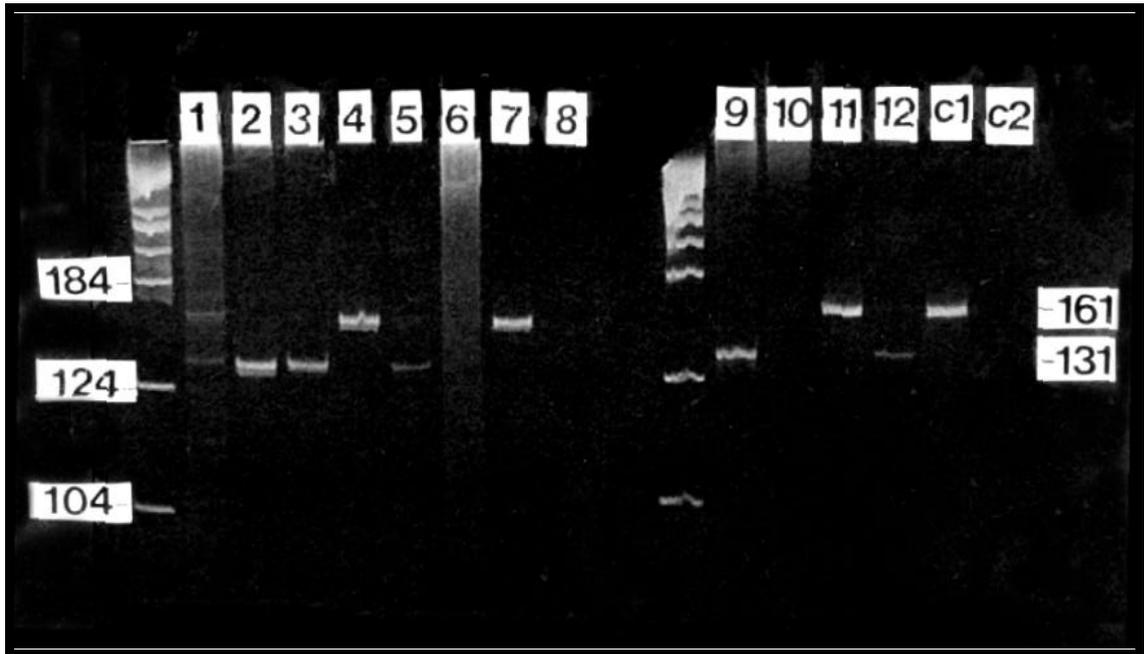


Figura 21. PCR para la detección de la deleción de 30 pb en el oncogén LMP-1 del VEB. Marcador de peso molecular V Boehringer Mannheim. C-1: Fragmento de 161 pb correspondiente al control no delecionado (B 95.8). C-2: Control blanco. Carreras 4, 7 y 11 muestras sin deleción del gen LMP-1. Carreras 2, 3, 5, 9 y 12 fragmentos de 131 pb que indican la existencia de una deleción de 30 pb en el gen LMP-1. Carrera 1 presencia de infección doble por cepas del VEB delecionada y no delecionada.

BIBLIOGRAFÍA

8.-Bibliografia.

Adams JM, Harris AAW, Pinkart CA, et al. The c-myc oncogene driven by immunoglobulin enhancers induces lymphoid malignancy in transgenic mice. *Nature* 1985; 318: 533-538.

Andris JS, Johnson S, Zolla-Pazner S, Capra JD. Molecular characterization of five human anti-human immunodeficiency virus type 1 antibody chains reveals extensive somatic mutation on typical of an antigen-driven immune response. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; 88: 7783-7787.

Ahmed T, Wormser GP, Stahl RE, et al. Malignant lymphomas in a population at risk for acquired immune deficiency syndrome. *Cancer* 1987; 60: 719-723.

Bacchi CE, Bacchi MM, Rabenhorst SH, et al. AIDS-related lymphomas in Brazil. Histopathology, immunophenotype and association with Epstein-Barr virus. *Am J Clin Pathol* 1996; 105: 230-237

Baer R, Bankier AT, Biggin MD, et al. DNA sequence and expression of the B-95-8 Epstein-Barr virus genome. *Nature (London)* 1984; 310: 207-11.

Ballerini P, Gaidano G, Gong Jz, et al. Multiple genetic lesions in acquired immunodeficiency syndrome-related non-Hodgkin lymphomas. *Blood* 1993; 81: 166-176.

Bastard C, Tilly H, Lenormand B et al: Translocations involving band 3q27 and Ig gene regions in non-Hodgkin's lymphomas. *Blood* 1992; 79: 2527-2531.

Bellas C, Santon A, Manzanal AI, et al. Pathological, immunological and molecular features of Hodgkin's disease associated with HIV infection. *American Journal of Surgical Pathologic* 1996; 20: 1520-1524.

Benjamin D, Knobloch TJ, Abrams J, et al. Human B cell IL-10: B cell lines derived from patients with AIDS and Burkitt's lymphoma constitutively secrete large quantities of IL-10. *Blood* 1992; 80: 1289-1298.

Beral V, Peterman T, Berkelman R, Jaffe H. AIDS-associated non-Hodgkin lymphoma. *Lancet* 1991; 337: 805-809.

Berek C, Ziegner M. The maturation of the immune response. *Immunol Today* 1993; 14: 400-404.

Berfield M, Kokenyesi R, Kato M, et al. Biology of the syndecans: a family of transmembrane heparan sulfate proteoglycans. *Annu Rev Cell Biol* 1992; 8: 365-393.

Bessudo A, Cherepakhin V, Johnson TA, et al. Favored use of immunoglobulin VH4 genes in AIDS-associated B-cells lymphomas. *Blood* 1996; 88: 252-260.

Bhatia K, Huppi K, Spangler G, et al: Point mutations in the c-myc transactivation domain are common in Burkitt's lymphoma and mouse plasmocytoma. *Nature Genet.* 1993; 5: 56-61.

Bhatia K, Spangler G, Gaidano G, et al. Mutations in the coding region of c-myc occur frequently in acquired immunodeficiency syndrome-associated lymphomas. *Blood* 1994; 84: 883-888.

Biggar RJ, Rabkin CS. The epidemiology of acquired immunodeficiency syndrome-related lymphomas. *Curr Opin Oncol* 1992; 4:883-893.

Birx DL, Redfield RR, Tasato G. Defective regulation of Epstein-Barr virus infection in patients with acquired immunodeficiency syndrome (AIDS) or AIDS-related disorders. *N Engl J Med* 1986; 314: 874-879.

Blackwood EM and Eisenman RN. Max: a helix-loop-helix zipper protein that forms a sequence-specific DNA-binding complex with Myc. *Science* 1991; 251: 1211-1217.

Borich B, Finke J, Hennig F, et al. Distribution and localization of Epstein-Barr virus subtypes A and B in AIDS-related lymphomas and lymphatic tissue of HIV-positive patients. *Journal of Pathology* 1992a; 168:229-236.

Boyle MJ, Swanson CE, Turner JJ, et al. Definition of two distinct types of AIDS-associated non-Hodgkin lymphoma. *Br J Haematol* 1990; 76: 506-512.

Boyle MJ, Sewell WA, Sculley TB, et al. Subtypes of Epstein-Barr virus in human immunodeficiency virus-associated non-Hodgkin lymphoma. *Blood* 1991; 78: 3004,

Buisson M, Morand P, Genoulaz O, et al. Changes in the dominant Epstein-Barr virus type during human immunodeficiency virus infection. *J Gen Virol* 1994; 75: 431

Burkitt D. A sarcoma involving the jaws in African children. *Br J Surg* 1958; 46: 218-19.

Camilleri-Bröet S, Davi F, Feuillard J, et al. High expression of latent membrane protein 1 of Epstein-Barr virus and BCL-2 oncoprotein in acquired immunodeficiency syndrome-related primary brain lymphomas. *Blood* 1995; 86: 432-435.

Camilleri-Bröet S, Davi F, Feuillard J, et al. AIDS-related primary brain lymphomas: histopathologic and immunohistochemical study of 51 cases: the French Study Group for HIV-Associated Tumors. *Hum Pathol* 1997; 28: 367-374.

Carbone A, Tirelli U, Vaccher E, Volpe R, et al. A clinicopathologic study of lymphoid neoplasias associated with human immunodeficiency virus infection in Italy. *Cancer* 1991; 68: 842-52.

Carbone A, Tirelli U, Gloghini A, et al. Human immunodeficiency virus-associated systemic lymphoma may be subdivided into two main groups according to Epstein-Barr viral latent gene expression. *Journal of Clinical Oncology* 1993a; 11: 1674-1681.

Carbone A, Gloghini A, Zanette L., et al. Demonstration of Epstein-Barr virus genome by in situ hybridization in acquired immune deficiency syndrome-related high grade and anaplastic large cell CD-30 + lymphomas. *Am J Clin* 1993b; 99: 289-297.

Carbone A, Gloghini A, Gaidano G, et al. AIDS-related Burkitt's lymphoma. Morphologic and immunophenotypic study of biopsy specimens. *Am J Clin Pathol* 1995a; 103: 561-567.

Carbone A, Gloghini A, Gattei U, et al. Expression of functional CD-40 antigen on Reed-Sternberg cells and Hodgkin's disease cell lines. *Blood* 1995b; 85: 780-789.

Carbone A, Dolcetti R, Gloghini A et al Immunophenotypic and molecular analysis of acquired immune deficiency syndrome-related and Epstein-Barr virus-associated lymphomas. A comparative study. *Hum Pathol* 1996; 27: 133-146.

Carbone A, Gaidano G, Gloghini A, et al. BCL-6 protein expression in AIDS-related non-Hodgkin's lymphomas: inverse relationship with Epstein-Barr virus-encoded latent membrane protein-1 expression. *Am J Pathol* 1997; 150: 155-156.

Carbone A, Gaidano G, Gloghini A, et al. Differential expression of BCL-6, CD 138/syndecan-1 and EBV-encoded latent membrane protein-1 identifies distinct histogenetic pathway in AIDS-related non-Hodgkin's lymphoma. *Blood* 1998; 91: 747-755.

Cattoreti G, Berti E, Schiro R, et al. Improved avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) staining. *Histochem J* 1988; 20: 75-80.

Cattoreti G, Chang CC, Cechova K, et al. BCL-6 protein is expressed in germinal-center B cells. *Blood* 1995; 86: 45-53.

Centers for Disease Control Revision of the definition of acquired immunodeficiency syndrome for national reporting United States. *MMWR* 1985; 34: 373-375.

Cesarman E, Dalla-Favera R, Bentley, et al. Mutations in the first exon are associated with altered transcription of c-myc in Burkitt lymphoma. *Science* 1987; 238: 1272-1275.

Cesarman E, Inghirami G, Chadburn A et al. High levels of p53 protein expression do not correlate with p53 gene mutations in anaplastic large cell lymphoma. *Am J Pathol* 1993; 143: 845-856.

- Cesarmen E, Chang Y, Moore PS, et al. Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus-like DNA sequences in AIDS-related body-cavity-based lymphomas. *N Engl J Med* 1995; 332: 1186-1191).
- Chadburn A, Cesarman E, Jagirdar J, et al. CD-30 (Ki-1) positive anaplastic large cell lymphomas in individuals infected with the human immunodeficiency virus. *Cancer* 1993; 72: 3078-3090).
- Chaganti RS, Jhanwar SC, Koziner B, et al. Specific translocations characterize Burkitt's-like lymphoma of homosexual man with acquired immune deficiency syndrome. *Blood* 1983; 61: 1265-1268.
- Chang RS, Lewis JP, Abildgaard CF. Prevalence of oropharyngeal excretor of leukocyte-transforming agents among a human population. *N Engl J Med* 1973; 289: 1325-1329.
- Chen HL, Lung ML, Chang KH, et al. Tissue distribution of Epstein-Barr virus genotypes. *J Virol* 1996; 70: 7301-7305.
- Chen M, Tsai C, Liang C, et al. 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* 1992; 7: 2131-2140.
- Chen WG, Chen YY, Bacchi CE, et al. 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* 1996; 148:17-23.
- Chen W, Iida S, Louie DC et al. Heterologous promoters fused by BCL-6 chromosomal translocations affecting band 3q27 cause its deregulated expression during B-cell differentiation. *Blood* 1998; 91: 603-7.
- Cheun ST, Lo KW, Leung SF, et al. Prevalence of LMP-1 deletion variant of Epstein-barr virus in nasopharyngeal carcinoma and gastric tumor in Hong-Kong. *International Journal of Cancer* 1996; 66: 711-712.
- Chowdary DR, Dermody JJ, Jha KK, Ozer HL. Accumulation of p53 in a mutant cell line defective in the ubiquitin pathway. *Mol Cell Biol* 1994; 14: 1997-2003.
- Cohen JJ. Epstein-Barr Virus lymphoproliferative disease associated with acquired immunodeficiency. *Medicine* 1991; 70: 137-160.
- Corradini P, Ladetto M, Voena C, et al. Mutational activation of N and K-ras oncogenes in plasma cell dyscrasias. *Blood* 1993; 81: 2708,
- Coté TR, Howe HL, Anderson SP, Martin RJ, Evans BJ. A systematic consideration of the neoplastic spectrum of AIDS: registry linkage in Illinois. *AIDS* 1991; 5: 49-53.

Cote TR, Manns A, Hardy CR, et al. Epidemiology of brain lymphoma among people with or without acquired immunodeficiency syndrome. *J Natl Cancer Inst* 1996; 88: 675-679.

Craig FE, Gulley ML, Banks PM: Posttransplantation lymphoproliferative disorders. *Am J Clin Pathol* 1993; 99: 265.

Dalla-Favera R. Chromosomal translocations involving the c-myc oncogene in lymphoid neoplasia. In: *The causes and consequences of chromosomal aberrations*. Ed Kirsch IR CRC Press. Boca aton. FL 1993: 312-332.

Dalla-Favera R, Ye BH, Cattoretti G et al: BCL-6 in diffuse large cells lymphomas. Important advances in oncology. Edited by VT DeVita, S Hellman, SA Rosenberg. Philadelphia, Lippincott-Raven Publishers, 1996: 139-148.

Davi F, Delecluse HJ, Guiet P, et al. Burkitt-like lymphomas in AIDS patients: Characterization within a series of 103 human immunodeficiency virus-associated non-Hodgkin's lymphomas. *J Clin Oncol* 1998; 16: 3788-3795.

Deacon EM, Pallesen G, Niedobitek G, et al. Epstein-Barr virus and Hodgkin's disease: Transcriptional analysis of virus latency in the malignant cells. *J Exp Med* 1993; 177: 339,

Delecluse HJ, Raphael M, Magard, et al French Study Group of pathology for human immunodeficiency virus-associated tumors. Variable morphology of human immunodeficiency virus-associated lymphomas with c-myc rearrangement. *Blood* 1993; 82: 552-563.

Delecluse HJ, Anagnostopoulus I, Dallenbach F, et al. Plasmablastic lymphomas of oral cavity. A new entity associated with the human immunodeficiency virus infection. *Blood* 1997; 89: 1413-1420.

Devergne O, Hatzivassiliou E, Izumi KM, et al. Association of TRAF1, TRAF2 and TRAF3 with an Epstein-Barr virus LMP1 domain important for B-lymphocyte transformation: role in NF-kB activation. *Mol Cell Biol* 1996; 16: 7089-108.

Dolcetti R, Zancai P, de RE U, et al. Epstein-Barr virus strains with latent membrane protein-1 deletions: prevalence in the Italian population and High association with human immunodeficiency virus-related Hodgkin's disease, *Blood* 1997; 89:1723-1731.

Ellerbrock TV, Lieb S, Harrington PE, y col. Heterosexually transmitted human immunodeficiency virus infection among pregnant women in a rural Florida community. *N Engl J Med* 1992; 327: 1704-1709.

Epstein MA, Achong BG, Barr YM. Virus particles in cultured lymphoblasts from Burkitt's lymphoma. *Lancet* 1965; i:702-3.

- Flenghi L, Ye BH, Fizzotti M et al. A specific monoclonal antibody (PG-B6) detects expression of the BCL-6 protein in germinal center B cells. *Am J Pathol* 1995; 147: 405-411.
- Gaidano G, Ballerini P, Gong JZ, et al. P53 mutations in human lymphoid malignancies: Association with Burkitt lymphoma and chronic lymphocytic leukemia. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; 88: 5413-5417.
- Gaidano G, Hauptschein RS, Parsa NZ, et al. Deletions involving two distinct regions of 6q in B-cell non-Hodgkin lymphomas. *Blood* 1992; 80:1781-1787.
- Gaidano G, Parsa NZ, Tassi V, et al. In vitro establishment of AIDS-related Lymphoma cell lines: phenotypic characterization, oncogene and tumor suppressor gene lesions, and heterogeneity in Epstein-Barr virus infection. *Leukemia* 1993; 7: 1621-1629.
- Gaidano G, Lo Coco F, Ye BH et al. Rearrangements of the BCL-6 gene in AIDS-associated non-Hodgkin lymphomas: association with diffuse large-cell subtype. *Blood* 1994; 84: 387-402.
- Gaidano G, Carbone A. AIDS-related lymphomas: From pathogenesis to pathology. *Br J Haematol* 1995; 90: 235-243.
- Gaidano G, Dalla-Favera R. Molecular Biology of lymphomas. *Cancer: Principles and Practice of Oncology*. Edited by DeVita VT, Hellman S, Rosenberg SA. Philadelphia, Lippincott-Raven, 1997a, pp 2131-2145.
- Gaidano G, Carbone A, Pastore C, et al. Frequent mutation of the noncoding region of the BCL-6 in acquired immunodeficiency syndrome-related non-Hodgkin lymphomas. *Blood* 1997b; 89:3755-3762.
- Gaidano G, Pastore C, Gloghini A, et al: Genetic heterogeneity of AIDS-related small non-cleaved cell lymphoma. *Br J Haematol* 1997c; 98: 726-32.
- Gaidano G, Carbone A, Dalla-Favera R. Pathogenesis of AIDS-related lymphomas. Molecular and histogenetic heterogeneity. *Am J Pathol* 1998; 152: 623-30.
- Gail MH, Pluda JM, Rabkin CS, et al: Projections of incidence of non-Hodgkin's lymphoma related to acquired immunodeficiency syndrome. *J Natl Cancer Inst* 1991; 83: 695-701.
- Gill PS, Levine AM, Meyer PR, et al. Primary central nervous system lymphoma in homosexual men: Clinical, immunologic and pathologic features. *Am J Med* 1985; 78: 742-748.

Gilligan K, Rajadurai P, Resnick L et al. Epstein-Barr virus small nuclear RNAs are not expressed in permissively infected cells in AIDS-associated leukoplakia. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1990; 87: 8790-4.

Gray T, Geny C, Lionnet F et al. Neuropathological study of 135 adult cases of acquired deficiency syndrome (AIDS). *Ann Pathol* 1991; 11: 236-247.

Green I, Espiritu E, Landanyi et al. Primary lymphomatous effusions in AIDS: A morphological, immunophenotypic and molecular study. *Mod Pathol* 1995; 8: 39-45.

Greenblatt MS, Bennett WP, Hollstein M, Harris CC. Mutations in the p53 tumor suppressor gene: clues to cancer etiology and molecular pathogenesis. *Cancer Res* 1994; 54: 4855-4878.

Greenspan JS, Greenspan D, Lennett ET, et al. Replication of Epstein-Barr virus within the epithelial cells of oral "hairy" leukoplakia, an AIDS-associated lesion. *N Engl J Med*. 1985; 313: 1564-71.

Groopman JE, Sullivan JL, Mulder C, et al. Pathogenesis of B cell lymphoma in a patient with AIDS. *Blood* 1986; 67:612-615.

Gu W, Cehova K, Tassi U, Dalla-Favera R. Differential regulation of target gene expression by Myc/Max ratio. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1993; 90: 2985-2939.

Gu W, Bhatia K, Magrath IT, et al. Binding and suppression of the Myc transcriptional activation domain by p107. *Science*. 1994; 264: 251-4.

Gutierrez MI, Spangler G, Kingman D, et al. Epstein-Barr virus in nasal lymphomas contains multiple oncogenic mutations in the EBNA-1 gene. *Blood* 1998; 92: 600-606.

Hamilton-Dutoit SJ, Pallesen G, Karkov J, et al. Identification of EBV DNA in tumor cells of AIDS-related lymphomas by in situ hybridization. *Lancet* 1989; 1: 544-555)

Hamilton-Dutoit SJ, Pallesen G, Franzmann MB, et al. AIDS-related lymphomas: histopathology immunophenotype and association with Epstein-Barr virus is demonstrated by in situ nucleic acid hybridization. *Am J Pathol* 1991a; 138: 149-163.

Hamilton-Dutoit SJ, Delecluse HJ, Raphael M, et al. Detection of Epstein-Barr virus genome in AIDS related lymphomas sensitivity and specificity of "in situ" hybridization compared with southern blotting. *J Clin Pathol* 1991b; 44:676-680.

Hamilton-Dutoit SJ, Rea D, Raphael M, et al. Epstein-Barr Virus-latent gene expression and tumor cell phenotype in acquired immunodeficiency syndrome-related non-Hodgkin's lymphoma: Correlation of lymphoma phenotype with three distinct patterns of viral latency. *Am J Pathol* 1993; 143: 1072-85.

- Hammarskjöld ML, Simurd MC. Epstein-Barr virus latent membrane transactivates the human immunodeficiency virus type 1 terminal repeat through induction of NF-kappa B activity. *J Virol* 1992; 66: 6492-6501.
- Hammerschmidt W, Sugden B. Genetic analysis of immortalizing functions of Epstein-Barr virus in human B lymphocytes. *Nature* 1989; 340: 393-397.
- Harris NL, Jaffe ES, Stein H, et al. A revised European-American classification of lymphoid neoplasms: A proposal from the international lymphoma study group. *Blood* 1994; 84: 1361-1392.
- Harris NL, Jaffe ES, Diebold J et al. World Health Organization classification of neoplastic diseases of the hematopoietic and lymphoid tissues: Report of the clinical advisory committee meeting-Airlie House, Virginia, november 1997. *J Clin Oncol* 1999, 17: 3835-3849.
- Hencher B, Shiramizu B, Jewett N, et al. AIDS-associated T cell lymphoma: evidence for HIV associated T-cell transformation. *Blood* 1992; 79: 1768-1774.
- Henderson S, Rowe M, Gregory C et al. Induction of bcl-2 expression by Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 protects infected B cells from programmed cell death. *Cell* 1991; 65:1107-15.
- Henle W, Henle G. The virus as the etiologic agent of infectious mononucleosis. In: Epstein MA, Achong BG, editors. *The Epstein-Barr virus*. Berlin; Springer-Verlag, 1979: 297.
- Herbst H, Steinbrecher E, Niedobitek G, et al. Distribution and phenotype of Epstein-Barr virus-harboring cells in Hodgkin's disease. *Blood* 1992; 80: 484-491.
- Herbst H, Stein H, Niedobitek G. Epstein virus and CD30+ malignant lymphomas. *CRC Crit Rev Oncog* 1993; 4: 191,
- Herrero JA, Mathew P, Paya CV. LMP-1 activates NF-kB by targeting the inhibitory molecule I κ B α . *J Virol* 1995; 69:2168-2174.
- Hockenbery D, Nuñez G, Millman C et al. Bcl-2 is an inner mitochondrial membrane protein that blocks programmed cell death. *Nature* 1990; 348: 334-6.
- Howe JG, Steitz JA. Localization of Epstein-Barr virus-encoded small RNAs by in situ hybridization. *Proc Natl Acad Sci USA* 1986; 83: 9006.
- Hu LF, Zabarovsky ER, Chen F, et al. Isolation and sequencing of the Epstein-Barr virus BNLF-1 gene (LMP-1) from Chinese nasopharyngeal carcinoma. *J Gen Virol* 1991, 72: 2399-2409.

- Hu L, Chen F, Zheng F, et al. Clonability and tumorigenicity of human epithelial cells expressing the EBV-encoded membrane protein LMP-1. *Oncogene* 1993; 8: 1575-1583.
- Hudson GS, Bankier AT, Satchwell SC, et al. The short unique region of the B95-8 Epstein-Barr virus genome. *Virology* 1985; 147: 81-98.
- Ioachim HL, Dorsett B, Cronin W, et al. Acquired immunodeficiency-associated lymphomas: Clinical, pathologic, immunologic and viral characteristics of 111 cases. *Hum Pathol* 1991; 22: 659-373.
- Ioachim HL, Antonescu C, Giancotti F, et al. EBV-associated anorectal lymphomas in patients with acquired immune deficiency syndrome. *Am J Surg Pathol* 1997; 21: 997-1006.
- Izumi K, Kaye K, Kieff E. Epstein-Barr virus recombinant molecular genetic analysis of the LMP-1 amino-terminal cytoplasmic domain reveals a probable structural role, with no component essential for primary B lymphocyte growth transformation. *J Virol* 1994; 68: 4369-4376.
- Jaffe ES. Classification of natural killer (NK) cell and NK-like T-cell malignancies. *Blood* 1996a; 87: 1207-1210.
- Jaffe ES. Primary body cavity-based AIDS-related lymphomas. *Am J Clin Pathol*. 1996b; 105: 141-143.
- Jain R, Roncella S, Hashimoto S, Carbone A, et al. A potential role for antigen selection in the clonal evolution of Burkitt's lymphoma. *J Immunol* 1994; 153: 45-52.
- Jellinger KA, Paulus W: Primary central nervous system lymphomas: An update. *J Cancer Res Clin Oncol* 1992; 119: 7,
- Jigl W, Sieger E, Alliger P, et al. Identification of type A and B isolates of Epstein-Barr virus by polymerase chain reaction. *J Virol Methods* 1990; 30: 319-22.
- Jones MD, Griffin BE. Clustered repeat sequences in the genome of Epstein-Barr virus. *Nucleic Acids Res* 1983; 11: 3919-3937.
- Kanavaros P, Jiwa M, de Bruin PC et al. High incidence of EBV genome in CD-30 positive non-Hodgkin's lymphomas. *Journal of Pathology* 1992; 168: 307-315.
- Kanavaros P, Jiwa M, Van der Valk, et al. Expression of Epstein-Barr virus latent gene products and related cellular activation and adhesion molecules in Hodgkin's disease and non-Hodgkin's lymphomas arising in patients without or pre-existing immunodeficiency. *Hum Pathol* 1993; 24: 725-729.

- Kaplan LD, Shiramizu B, Herndier, et al. Influence of molecular characteristics on clinical outcome in human immunodeficiency virus-associated non-Hodgkin's lymphoma: identification of a subgroup with favorable clinical outcome. *Blood* 1995; 85: 1727-35.
- Kapp U, Wolf J, Hummel M, et al. Hodgkin's lymphoma-derived tissue serially transplanted into severe combined immunodeficient mice. *Blood* 1993; 82: 1247-1256.
- Karcher DS, Dawkins F, Garrett CT et al. Body cavity-base non-Hodgkin's lymphomas (NHL) in HIV-infected patients: B-cells lymphomas with unusual clinical, immunophenotypic and genotypic features. *Lab Invest* 1992; 66: 88a.
- Karcher DS, Alkan S. Herpes-like DNA sequences, AIDS-related tumors, and Castleman's disease (letter) *N Engl J Med* 1995; 333:797-798.
- Karcher DS, Alkan S. Human herpesvirus-8-associated body cavity-based lymphoma in human immunodeficiency virus-infected patients: a unique B-cell neoplasm. *Hum Pathol* 1997; 28: 801-8.
- Karp JE and Broder S. Acquired immunodeficiency syndrome and non-Hodgkin's lymphomas. *Cancer Research* 1991; 51: 4743-4756.
- Kastan MB, Onyekwere O, Sidransky D et al. Participation of p53 protein in the cellular response to DNA damage. *Cancer Res* 1991; 51: 6304-6311.
- Katz BZ, Berkman AB, Shapiro ED. Serologic evidence of active Epstein-Barr virus infection in Epstein-Barr virus-associated lymphoproliferative disorders of children with acquired immunodeficiency syndrome. *Journal of Pediatrics* 1991; 120: 228-232.
- Kaye KM, Izumi KM, Kieff E. Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 is essential for B-lymphocyte growth transformation. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; 90: 9150-4.
- Kaye KM, Devergne O, Harada JN, et al. Tumor necrosis factor receptor associated factor 2 is a mediator of NF-kB activation by latent infection membrane protein 1, the Epstein-Barr virus transforming protein. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93: 11085-90.
- Kelly K, Cocgran BH, Stilis CD, Leder P. Cell-specific regulation of the c-myc gene by lymphocyte mitogen and platelet derived growth factor. *Cell* 1983; 35: 603-610.
- Kerckaert JP, Dewindt C, Tilly H, et al. LAZ3, a novel zinc-finger encoding gene, is disrupted by recurring chromosome 3q27 translocation in human lymphoma. *Nature Genet* 1993; 5: 66-70.
- Kerstein MJ, Klein MR, Holweda AM, et al. Epstein-Barr virus-specific cytotoxic T cell responses in HIV-1 infection. *J Clin Invest* 1997; 99: 1525-1533).

- Khanim F, Yao QY, Niedobitek G, et al. Analysis of Epstein-Barr virus gene polymorphisms in normal donor and in virus-associated tumors from different geographic locations. *Blood* 1996; 88: 3491-3501.
- Kieff E, Liebowitz D. Epstein-Barr virus and its replication. In: Fields BN, Knipe DM (eds): *Virology*. New York, NY, Raven, 1990: 1889.
- Kieff E. Epstein-Barr virus and its replication. In: Fields BN, Knipe DM, Howley PM, eds. *Fields Virology*. 3rd ed. Vol. 2. Philadelphia: Lippincott-Raven, 1996: 2343-96.
- Kingma DW, Weiss WB, Jaffe ES, et al. Epstein-Barr virus latent membrane protein-1 oncogene deletions: correlations with malignancy in Epstein-Barr virus-associated lymphoproliferative disorders and malignant lymphomas. *Blood* 1996; 88: 242-251.
- Klein G. The Epstein-Barr virus and neoplasia. *N Engl J Med* 1975; 193:1353,
- Knecht H, Sahli R, Shaw P, et al. Detection of Epstein-Barr virus by polymerase chain reaction in lymph node biopsies from patients with angioimmunoblastic lymphadenopathy. *British Journal of Haematology* 1990; 75: 610-614.
- Knecht H, Bachmann E, Brousset P, et al. Deletion within the LMP-1 oncogene of Epstein-Barr virus are clustered in Hodgkin's disease and identical to those observed in nasopharyngeal carcinoma. *Blood* 1993a; 82: 2937-2942.
- Knecht H, Bachmann E, Joske DJL, et al. Molecular analysis of the LMP (latent membrane protein) oncogene in Hodgkin's disease. *Leukemia* 1993b; 7: 580-585.
- Knecht H, Raphael M, McQuain, et al. Deletion variants within the NF- κ B activation domain of the LMP-1 oncogene prevail in acquired immunodeficiency syndrome related large cell lymphomas and human immunodeficiency virus-negative atypical lymphoproliferations. *Blood* 1996; 87: 876-881.
- Knowles DM, Chamulak GA, Subar M, et al: Lymphoid neoplasia associated with the acquired immunodeficiency syndrome (AIDS). The New York University Medical Center experience with 105 patients (1981-1986). *Ann Intern Med* 1988; 108: 744-753.
- Knowles DM, Inghirami G, Ubriaco A et al. Molecular genetic analysis of three AIDS-associated neoplasms of uncertain lineage demonstrates their B-cell derivation and the possible pathogenetic role of the Epstein-Barr virus. *Blod* 1989; 73:792-799.
- Knowles DM, Chadburn A. Lymphadenopathy and the lymphoid neoplasms associated with the acquired immune deficiency syndrome (AIDS). In: Knowles DM. *Neoplastic Hematopathology*. Baltimore. Williams and Wilkins, 1992.

- Knowles DM. Molecular pathology of acquired immunodeficiency syndrome-related non-Hodgkin's lymphoma. *Semin Diagn Pathol* 1997; 14: 67-82.
- Knowles DM. Immunodeficiency-associated lymphoproliferative disorders. *Mod Pathol* 1999; 12: 200-217.
- Knutson JC, Sugden B: Immortalization of B lymphocytes by Epstein-Barr virus: what does the virus contribute to the cell? *Adv Viral Oncol* 1989;151: 172,
- Korbjuhn P, Anagnostopoulus I, Hummel M, et al. Frequent latent Epstein-Barr virus infection of neoplastic T cells and bystander B cells in human immunodeficiency virus-negative European peripheral pleomorphic T cell lymphomas. *Blood* 1993; 82:217-223.
- Krajewski S, Tanaka S, Takayama S, et al. Investigation of the subcellular distribution of the bcl-2 oncoprotein: Residence in the nuclear envelope, endoplasmatic reticulum, and outer mitochondrial membranes. *Cancer Res* 1993; 53: 4701-4714.
- Laherty CD, Hu HM, Opiari AW et al. The Epstein-Barr virus LMP-1 gene product induces A20 zinc finger protein expression by activating nuclear factor kappa B. *J Biol Chem* 1992; 267 :24157-60.
- Lair R, Arber DA, Cheng KL, et al. Frequency of bcl-2 expression in non-Hodgkin's lymphomas: A study of 778 cases with comparison of marginal zone lymphomas and monocytoid B-cell hyperplasia. *Mod Pathol* 1998;11: 864-869.
- Larocca LM, Capello D, Rinelli A, et al. The molecular and phenotypic profile of primary central nervous system lymphoma identifies distinct categories of the disease and is consistent with histogenetic derivation from germinal center-related B cells. *Blood* 1998; 92: 1011-1019.
- Law CL, Wörmann B, LeBien TW. Analysis of expression and function of CD40 on normal and leukemia human B cell precursors. *Leukemia* 1990; 4: 732,
- Levine AM, Meyer PR, Begandy MK, et al. Development of B-cell lymphomas in homosexual men. Clinical and immunologic findings. *Ann Intern Med* 1984; 100:7-13.
- Levine AM. Non Hodgkin's lymphomas and other malignancies in the acquired immunodeficiency syndrome. *Semin Oncol* 1987; 14(suppl): 34-39.
- Levine AM, Sullivan-Halley J, Pike MC, et al. HIV-related lymphoma: Prognostic factors predictive of survival. *Cancer* 1991; 68: 2466-2472.
- Levine AM. Acquired immunodeficiency syndrome-related lymphoma. *Blood* 1992; 80: 8-20.
- Levine AM. AIDS-Related Malignancies: The Emerging Epidemic. *J Natl Cancer Inst* 1993; 85: 1382-97.

- Liebowitz D, Wang D, Kieff E. Orientation and patching of the latent infection membrane protein encoded by Epstein-Barr virus. *J Virol* 1986; 56: 233-237.
- Liebowitz D, Kieff E. Epstein-Barr virus. In: Roizman B, Whitley RJ, Lopez C, eds. *The human herpesviruses*. New York: Raven Press, 1993: 107-72.
- Liebowitz D. Epstein-Barr Virus and a cellular signaling pathway in lymphomas from immunosuppressed patients. *N Engl J Med* 1998; 338: 1431-21.
- LoCoco F, Ye BH, Lista F et al. Rearrangements of the bcl-6 gene in diffuse large cell non-Hodgkin lymphoma. *Blood* 1994; 83:1757-1759.
- Lombardi L, Newcomb EW, Dalla-Favera R. Pathogenesis of Burkitt lymphoma: Expression of an activated c-myc oncogene causes the tumorigenic conversion of EBV-infected human B lymphoblasts. *Cell* 1987; 49: 161-170.
- Lowenthal DA, Straus DJ, Campbell SW, et al: AIDS-related lymphoid neoplasia: The Memorial Hospital experience. *Cancer* 1988; 61: 2325.
- Mack KD, et al. HIV insertional characteristics of the protooncogene c-fes in AIDS associated lymphomagenesis. *J Acquir Immune Defic Hum Retrovirol* 1997; 14: A44.
- MacMahon EM, Glass JD, Hayward SD et al: Epstein-Barr virus in AIDS-related primary central nervous system lymphoma. *Lancet* 1991; 338: 969-973.
- Martin A, Flaman JM, Frebourg T, et al: Functional analysis of the p53 protein in AIDS-related non-Hodgkin's lymphomas and polymorphic lymphoproliferations. *British Journal of Haematology* 1998; 101: 311-317.
- Masood R, Bond M, Scadden D et al. Interleukin-10: An autocrine B-cell growth factor for human B-cell lymphoma and their progenitor. *Blood* 1992; 80: 115a.
- Meeker T, Shiramizu B, Kaplan L et al. Evidence for molecular subtypes of HIV-associated lymphoma. Division into peripheral monoclonal, polyclonal and central nervous system lymphomas. *AIDS* 1991; 5: 669-674.
- Migliazza A, Martinotti S, Chen W y col. Frequent somatic hypermutation of the 5' noncoding region of the BCL-6 gene in B-cell lymphoma. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; 92: 12520-12524.
- Migliazza A, Ye BH, Fracchiolli N et al. Mutation of the 5' non-coding region of BCL-6 are common in B cell malignancies and can deregulate BCL-6 expression. *Blood* 1997; 90 (suppl 1): 177a.

Miller G. Epstein-Barr Virus. In B.N. Fields (ed). Virology. Raven Press, New York. 1985: 563-590.

Miller G. Epstein-Barr Virus-Biology, Pathogenesis, and Medical Aspect, in Fields BN, Knipe DM (eds): Virology, New York, NY, Raven, 1990a: 1921.

Miller G. The switch between latency and replication of Epstein-Barr Virus. Journal of Infectious Diseases 1990b; 161: 833-844.

Moorthy RK, Thorley-Lawson DA. Processing of the Epstein-Barr virus-encoded latent membrane protein p63 (LMP). J Virol 1990; 64: 829-837.

Moorthy RK, Thorley-Lawson DA. All three domains of the Epstein-Barr virus-encoded latent membrane protein LMP-1 are required for transformation of Rat-1 fibroblasts. J Virol 1993; 67: 1638-1646.

Moran MJ, Andris JS, Matsumoto Y I, et al. Variable region genes of anti-HIV human monoclonal antibodies non-restricted use of the V gene repertoire and extensive somatic mutation. Mol Immunol 1993; 30: 1543-1551.

Moses AV, Williams SF, Strussenberg JG, et al. HIV-1 induction of CD-40 on endothelial cells promotes the outgrowth of AIDS-associated B-cell lymphomas. Nature Medicine 1997; 3: 1242-1249.

Mosialos G, Birkerbach M, Yalamanchili R, et al.. The Epstein-Barr virus transforming protein LMP1 engages signaling proteins for the tumor necrosis factor receptor family. Cell 1995; 80:389-99.

Nador RG, Cesarman E, Chadburn A, et al. Primary effusion lymphoma: a distinct clinicopathologic entity associated with the Kaposi's sarcoma-associated herpes virus. Blood 1996; 88:645-56.

Nakamura H, Said JW, Miller CW, et al. Mutations and protein expression of p53 in acquired immunodeficiency syndrome-related lymphomas. Blood 1993; 82: 920,

Neri A, Barriga F, Inghirami G, et al. Epstein-Barr virus infection precedes clonal expansion in Burkitt's and acquired immunodeficiency syndrome-associated lymphoma. Blood 1991; 77: 1092-1095.

Ng VL, Hurt MH, Fein CL, et al. IgMs produced by two acquired immunodeficiency syndrome lymphomas cell lines: Ig binding specificity and V_H-gene putative somatic mutation analysis. Blood 1994; 83: 1067-1078.

Ng LV, McGrath MS: The immunology of AIDS-associated lymphomas. Immunological Reviews 1998; 162: 293-298.

Niedobitek G, Young LS, Sam CK, et al. Expression of Epstein-Barr virus gene and of lymphocyte activation molecules in undifferentiated nasopharyngeal carcinomas. *Am J Pathol* 1992; 140: 879-887.

Niedobitek G. Patterns of Epstein-Barr virus infection in non-Hodgkin's lymphomas. (Editorial). *Journal of Pathology* 1995; 175: 259-261.

Ometto L, Menin Ch, Masiero S, et al. Molecular profile of Epstein-Barr virus in human immunodeficiency virus type 1-related lymphadenopathies and lymphoma. *Blood* 1997; 90: 313-322.

Onizuka T, Moriyama M Yamochi T et al. BCL-6 gene product a 92 to 98 kD nuclear phosphoprotein is highly expressed in germinal-center B cells and their neoplastic counterparts. *Blood* 1995, 86: 28-37.

Pagano JS. Epstein-Barr virus. In Kelly WN ed. Text book of internal medicine. 2nd ed. Philadelphia J.B. Lippincott 1992: 1499-1505.

Pallesen G, Hamilton-Dutoit SJ, Rowe M, Lisse I, Ralfkiaer E et al. Expression of Epstein-Barr virus replicative proteins in AIDS-related non-Hodgkin's lymphoma cells. *J Pathol* 1992; 165: 289-99.

Pantaleo G, Graziosi C, Fauci AS: Mechanisms of disease: The immunopathogenesis of human immunodeficiency virus infection. *N Engl J Med* 1993; 328:327-335.

Pascual V, Capra JD. VH4-21 an human VH gene segment overrepresented in the autoimmune repertoire. *Arthritis Rheum* 1992; 35:11-18.

Pedersen C, Gerstoft J, Lundgren JD, et al. HIV-associated lymphoma: histopathology and association with Epstein-Barr virus genome related to clinical, immunological and prognostic features. *Europ J Cancer* 1991; 77: 1416-23.

Pelicci PG, Knowles DM, Arlin ZA, et al. Multiple monoclonal B cell expansions and c-myc oncogene rearrangements in acquired immune deficiency syndrome-related lymphoproliferative disorders: Implications for lymphomagenesis. *J Exp Med* 1986; 164: 2049-2076.

Peng M, Lundgren E. Transient expression of the Epstein-Barr virus LMP-1 gene in human primary B cells induces cellular activation and DNA synthesis. *Oncogene* 1991; 7: 1775-1782.

Peters BS, Beck EJ, Coleman DG, et al: Changing disease patterns in patients with AIDS in a referral centre in the United Kingdom: The changing face of AIDS. *BMJ* 1991; 302-307.

Peterson JM, Tubbs RR, Savage RA, et al. Small noncleaved B cell Burkitt-like lymphoma with chromosome t(8;14) translocation and Epstein-Barr virus nuclear associated antigen in a

homosexual man with the acquired immune deficiency syndrome. *Am J Med* 1985; 79: 141-148.

Pluda JM, Yarchoan R, Jaffe ES, et al. Development of non-Hodgkin's lymphoma in a cohort of patients with severe human immunodeficiency virus (HIV) infection on long-term antiretroviral therapy. *Ann Intern Med* 1990; 113: 276-282.

Pluda JM, Venzon D, Tosato G, et al. Parameters affecting the development of non-Hodgkin's lymphoma in patients with severe human immunodeficiency virus infection receiving antiretroviral therapy. *J Clin Oncol* 1993; 11: 1099-1107.

Purtilo DT, Pacquin LA, Sakamoto K et al. Persistent transfusion-associated infectious mononucleosis with transient acquired immunodeficiency. *Am J Med* 1980; 68: 437,

Raab-Traub N, Flynn K. The structure of the termini of the Epstein-Barr virus as a marker of clonal cellular proliferation. *Cell* 1986; 47: 883-889.

Rabkin CS, Biggar RJ, Horn JW: Increasing incidence of cancers associated with the human immunodeficiency virus epidemic. *Int J Cancer* 1991; 47: 692-696.

Ragni MV, Belle SH, Jaffe PA et al. Acquired immunodeficiency syndrome-associated non-Hodgkin's lymphoma and other malignancies in patients with hemophilia. *Blood* 1993; 81: 1889-1897.

Randhawa PS, Jaffe R, Demetris AJ, et al. The systemic distribution of Epstein-Barr virus genome in fatal post-transplantation lymphoproliferative disorders. *Am J Pathol* 1991; i: 1027-1033).

Raphael M, Audouin J, Tulliez M et al. Anatomic and histologic distribution of 448 cases of AIDS-related non-Hodgkin's lymphomas. Proceedings of the annual meeting of the American Society of Hematology. *Blood* 1993; 82: 386a.

Raphel M, Audouin J, Lamine M et al. Immunophenotypic and genotypic analysis of acquired immunodeficiency syndrome-related non-Hodgkin's lymphoma: Correlation with histologic features in 36 cases. *Am J Clin Pathol* 1994, 101: 773-782).

Reynolds P, Saunders LD, Layefsky ME, Lemp GF. The spectrum of acquired immunodeficiency syndrome (AIDS)-associated malignancies in San Francisco, 1980-1987. *Am J Epidemiol* 1993; 137: 19-30.

Riboldi P, Gaidano G, Schettino EW, et al. Two acquired immunodeficiency syndrome-associated Burkitt's lymphomas produce specific anti-IgM cold agglutinins using somatically mutated V_H4-21 segments. *Blood* 1994; 83: 2952-2961.

Rickinson AB, Young LS y Rowe M. Influence of the Epstein-Barr virus nuclear antigen EBNA-2 on the growth phenotype of virus-transformed B cells. *J Virol* 1987; 61: 1310.

Robinson WEJ, Kawamura T, Gorny MK, et al. Human monoclonal antibodies to the human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) transmembrane glycoprotein gp41 enhance HIV-1 infection in vitro. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; 87: 3185,

Roithmann S, Tourani JM, Andrieu JM. AIDS-associated non-Hodgkin lymphomas. *Lancet* 1991; 338: 884-885.

Rooney C, Howe JG, Speck SH, et al. Influences of Burkitt's lymphoma and primary B cells on latent gene expression by the nonimmortalizing P3J-HR-1 strain of Epstein-Barr virus. *J Virol* 1989; 63: 1531-9.

Rowe DT, Rowe M, Evan GI, et al. Restricted expression of EBV latent genes and T-lymphocyte-detected membrane antigen in Burkitt's lymphoma cells. *EMBO J* 1986; 5: 2599-607.

Rowe M, Young LS, Crocker J, et al. Epstein-Barr Virus (EBV)-associated lymphoproliferative disease in the SCID mouse model: Implication for the pathogenesis of EBV-positive lymphomas in man. *J Exp Med* 1991; 173: 147-158.

Rowe M, Lear AL, Croom-Carter D, et al. Three pathway of Epstein-Barr virus gene activation from EBNA-1 positive latency in B lymphocytes. *Virology* 1992; 66: 122-31.

Said JW, Tasaka T, Takeuchi S, et al. Primary effusion lymphoma in women: report of two cases of Kaposi's sarcoma herpes virus-associated effusion-based lymphoma in human immunodeficiency virus-negative women. *Blood* 1996; 88: 3124-8.

Saito I, Serenius B, Compton T, et al. Detection of Epstein-Barr virus DNA by polymerase chain reaction in blood and tissue biopsies from patients with Sjögren's syndrome. *Journal of Experimental Medicine* 1989; 169: 2191-2198.

Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular cloning: a laboratory manual*. Second Edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press. 1989.

Sample J, Young L, Martin B, et al. Epstein-Barr virus types 1 and 2 differ in their EBNA-3A, EBNA-3B, EBNA-3C genes. *J Virol* 1990; 64: 4084-4092.

Sample J, Brooks L, Sample C, et al. Restricted Epstein-Barr virus protein expression in Burkitt lymphoma is reflected in a novel EBNA-1 mRNA and transcriptional initiation site. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; 88: 6343-6347.

Sanderson RD, Lalor P, Bernfield M: B lymphocytes express and lose syndecan-1 at specific stages of differentiation. *Cell Regul* 1989; 1: 27-35.

Sandvej K, Peh S, Andresen B, et al. Identification of potential hot spots in the carboxy-terminal part of the Epstein-Barr virus (EBV) BNLF-1 gene in both malignant and benign EBV-associated diseases: High frequency of a 30 bp deletion in Malaysian and Danish peripheral T-cell lymphomas. *Blood* 1994; 84:4053-4060.

Santon A, Manzanal AI, Campos E, Bellas C. Delección in the Epstein-Barr virus latent membrane protein-1 oncogene in Hodgkin's disease. *J Clin Pathol Mol Pathol* 1995; 48: M184-M187).

Santon A, Martin C, Manzanal AI, et al. Paediatric Hodgkin's disease in Spain: association with Epstein-Barr virus strains carrying latent membrane protein-1 oncogene deletions and high frequency of dual infections. *Br J Haematol* 1998; 103: 129-136.

Sarnadharan MG, Popovic M, Bruch L, et al. Antibodies reactive with human T-lymphotropic retroviruses (HTLV-III) in the serum of patients with AIDS. *Science* 1984; 224: 506,

Scheinfeld AG, Nador RG, Cesarman E, et al. Epstein-Barr Virus latent membrane protein-1 oncogene deletion in post-transplantation lymphoproliferative disorders. *Am J Pathol* 1997; 151: 805-813.

Schlossberg D, de. Infectious mononucleosis. Second edition. New York: Springer-Verlag; 1989.

Schnittman SM, Lane HC, Higgins SE, et al. Direct polyclonal activation of human B lymphocytes by the acquired immune deficiency syndrome virus. *Science* 1986; 233: 1084-1086.

Schulz TF, Boshoff CH, Weiss RA. HIV infection and neoplasia. *Lancet* 1996; 348: 587-591.

Sculley TB, Apolloni A, Hurren L, et al. Coinfection with A and B-type Epstein-Barr virus in human immunodeficiency virus positive subjects. *J Infect Dis* 1990; 162: 643-8.

Serraino D, Franceschi S, Tirelli U, Monfardini S. The epidemiology of acquired immunodeficiency and associated tumors in Europe. *Annals of Oncology* 1992; 3: 595-603.

Shi SR, Key ME, Kalra KL. Antigen retrieval in formalin-fixed, paraffin-embedded tissues: an enhancement method for immunohistochemical staining based on microwave heating of tissue sections. *J Histochem Cytochem* 1991; 39: 741-748.

Shibata D, Weiss LM, Nathwani BN, et al. Epstein-Barr virus in benign lymph node biopsies from individuals infected with the human immunodeficiency virus is associated with concurrent or subsequent development of non-Hodgkin's lymphomas. *Blood* 1991; 77: 1527-1533.

Shibata D, Weiss LM, Hernandez AM, et al. Epstein-Barr virus-associated non-Hodgkin's lymphoma in patients infected with the human immunodeficiency virus. *Blood* 1993; 81: 2102-2109.

Shiramizu B, Herndier BG, McGrath MS. Identification of a common clonal human immunodeficiency virus integration site in human immunodeficiency virus-associated lymphomas. *J Cancer Res* 1994; 54: 2069-2072.

Shiramizu B, Herndier BG, Abbey N, McGrath MS. Clonal HIV is present in a wide variety of HIV-associated malignancies and cell separation studies map the clone to tumor-associated macrophages. *J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retroviral* 1997; 14: A50.

Sixbey JW, Nedrud JG, Raab-Traub N et al. Epstein-Barr virus replication in oropharyngeal epithelial cells. *N Engl J Med* 1984; 310: 1225-30.

Sixbey JW, Chesney PJ, Resnick L, et al. Detection of a second widespread strain of Epstein-Barr virus. *Lancet* 1989; 2: 761-765.

Smir BN, Hauke RJ, Bierman PJ, et al. Molecular epidemiology of deletions and mutations of the latent membrane protein 1 oncogene of the Epstein-Barr virus in posttransplant lymphoproliferative disorders. *Lab Invest* 1996; 75: 575-588.

Speck SH, Strominger JL. Transcription of Epstein-Barr virus in latently infected growth transformation lymphocytes. *Advances in Viral Oncology*. Edited by Klein G. New York, Raven Press, 1989: 130-150.

Subar M, Neri A, Inghirami G, et al. Frequent c-myc oncogene activation and infrequent presence of Epstein-Barr virus genome in AIDS-associated lymphoma. *Blood* 1988; 72: 667-671.

Sugden B. An intricate route to immortality. *Cell* 1989; 57: 5-71.

Swerdlow SH. Post-transplant lymphoproliferative disorders: A morphologic, phenotypic and genotypic spectrum of disease. *Histopathology* 1992; 20: 373,

Teitell M, Damore MA, Sullur GG, et al. TCL-1 oncogene expression in AIDS-related lymphomas and lymphoid tissues. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; 96: 9809-9814.

Tenner-Racz K, Racz P, Bofill M et al. HTLV-III/LAV viral antigens in lymph nodes of homosexual men with persistent generalized lymphadenopathy and AIDS. *Am J Pathol* 1986; 123: 9-15.

The non-Hodgkin lymphoma pathologic classification project, National Cancer Institute sponsored study of classification of non-Hodgkin's lymphomas: summary and description of a working formulation for clinical usage. *Cancer* 1982; 49: 2112-2135.

Thomas JA, Hotchin NA, Allday MJ, et al. Immunohistology of Epstein-Barr virus-associated antigens in B cell disorders from immunocompromised individuals. *Transplantation* 1990; 49: 944,

Thorley-Lawson DA. Basic virological aspects of Epstein-Barr virus infection. *Sem Hematol* 1988; 25: 247-60.

Tirelli U, Franceschi S, Carbone A. Malignant Tumours in patients with HIV infection. *BMJ* 1994; 308: 1148-53.

Tirelli U, Errante D, Dolcetti R, et al. Hodgkin's disease and human immunodeficiency virus infection: Clinicopathologic and virologic features in 114 patients from the Italian Cooperative Group on AIDS and tumors. *J Clin Oncol* 1995a; 13: 1758-67.

Tirelli U, Vaccher E, Zagonel, et al. CD30 (Ki-1)-positive anaplastic large-cell lymphoma in 13 patients with and 27 patients without human immunodeficiency virus infection: The first comparative clinicopathologic study from a single institution that also includes 80 patients with other human immunodeficiency virus-related systemic lymphoma. *J Clin Oncol* 1995b; 13: 373-380.

Tsujimoto Y, Gorham J, Cossman J et al. The t(14;18) chromosome translocations involved in B-cell neoplasms result from mistakes in VDJ joining. *Science* 1985; 229:1390-3.

Van Baarle B, Hovenkamp E, Kersten MJ, et al. Direct Epstein-Barr (EBV) typing on peripheral blood mononuclear cells: No association between EBV type 2 infection or superinfection and the development of acquired immunodeficiency syndrome-related non-Hodgkin's lymphomas *Blood* 1999; 93: 3949-3955.

Van der Donk EMM, Schutten M, Osterhaus ADME, et al. Molecular characterization of variable heavy and light chain regions of five HIV type 1 specific human monoclonal antibodies. *AIDS Res Hum Retroviruses* 1994; 10:1039-1049.

Walts AE, Shintaku IP, Said JW. Diagnosis of malignant lymphoma in effusions from patients with AIDS by gene rearrangement. *Am J Clin Pathol* 1990; 94: 170-175.

Wang D, Liebowitz D, Kieff E. An EBV membrane protein expressed in immortalized lymphocytes transforms established rodent cells. *Cell* 1985, 43:831-40.

Wang D, Liebowitz D, Wang F, et al. Epstein-Barr virus latent infection membrane protein alters the human B lymphocyte phenotype: deletion of the aminoterminal, abolishes activity. *J Virol* 1988; 62: 4173-4184.

- Wang F, Gregory CD, Sample C, et al. Epstein-Barr virus latent membrane protein (LMP-1) and nuclear protein 2 and 3C are effectors of phenotypic changes in B lymphocytes: EBNA-2 and LMP-1 cooperatively induce CD-23. *J Virol* 1990; 64: 2309-2318.
- Weinreb M, Day PJR, Niggli F. The consistent association between Epstein-Barr virus and Hodgkin's disease in children in Kenya. *Blood* 1996; 87: 3828-3936.
- Weiss LM, Warnke RA, Skler J, et al. Molecular analysis of the t(14;18) chromosomal translocation in malignant lymphomas. *N Engl J Med*. 1987; 317: 1185-9.
- Weiss LM, Mouahed LA. In situ demonstration of Epstein-Barr viral genomes in viral associated B lymphoproliferations. *Am J Pathol* 1989; 134: 651-659.
- Wijdenes J, Voojls WC, Clement C. et al. A plasmocyte selective monoclonal antibody (B-B4) recognizes syndecan-1. *Br J Haematol* 1996; 94: 318-323.
- Wilkes M, Fortin A, Felix J et al. Value of necropsy in acquired immunodeficiency syndrome. *Lancet* 1988; 8062: 85-88.
- Wright DK, Manos MM. Sample preparation from paraffin embedded tissues. In: *PCR protocols: a guide to methods and applications*. Edited by Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJ. San Diego, Academic Press, 1990: 153-158.
- Wolf H, zur Hausen H, Becker V. EB viral genomes in epithelial nasopharyngeal carcinoma cells. *Am J Clin Pathol* 1993; 244:245,
- Yao QY, Tierney RJ, Croom-Carter D, et al. Frequency of multiple Epstein-Barr virus infection in T-cell immunocompromised individuals. *J Virol* 1996; 70: 4884-4894.
- Yates JL, Warren N, Reisman D, et al. A cis-acting element from the Epstein-Barr viral genome that permits stable replication of recombinant plasmids in latently infected cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1984; 81: 3806-3810.
- Yates JL, Warren N, Sugden B. Stable replication of plasmids derived from Epstein-Barr virus in a variety of mammalian cells. *Nature (London)* 1985; 313: 812-15.
- Ye BH, Lista F, Lo Coco F, et al. Alterations of a novel zinc-finger encoding gene BCL-6, in diffuse large cell lymphoma. *Science* 1993; 262: 747-750.
- Ye BH, Chaganti S, Chang CC, et al. Chromosomal translocations cause deregulated BCL6 expression by promoter substitution B cell lymphomas. *EMBO J* 1995; 14: 6209-6217.
- Yin XM, Oltvai ZN, Korsmeyer SJ. BH1 and BH2 domains of Bcl-2 are required for inhibition of apoptosis and heterodimerization with Bax. *Nature* 1994; 369: 321-323.

Yonish-Rovach E, Resnitzky D, Lotein J, et al. Wild type p53 induces apoptosis of myeloid leukemic cells that is inhibited by interleukin-6. *Nature* 1991; 352: 345-347.

Young LS, Dawson CW, Clark D, et al. Epstein-Barr virus gene expression in nasopharyngeal carcinoma. *J Gen Virol* 1988; 69: 1051,

Young LS, Alfieri C, Hennessy K, et al. Expression of Epstein-Barr virus transformation-associated genes in tissues of patients with EBV lymphoproliferative disease. *N Engl J Med* 1989; 321: 1080,

Zech Y, Haglund U, Nilsson K et al. Characteristic chromosomal abnormalities in biopsies and lymphoid-cell lines from patients with Burkitt and non-Burkitt lymphomas. *Int J Cancer* 1976; 17: 47-56.

Ziegler JL, Beckstead JA, Volberding PA, et al. Non-Hodgkin's lymphoma in 90 homosexual men: relationship to generalized lymphadenopathy and acquired immunodeficiency syndrome (AIDS). *N Engl J Med* 1984; 311: 565-70.

Zimber U, Adldinger AK, Lenoir GM, et al. Geographical prevalence of two types of Epstein-Barr virus. *Virology* 1986; 154: 56-66.

Zlotnik A, Morre KW. Interleukin 10. *Cytokine* 1991; 3: 366-371.

Zur Hausen H, Schult-Holthausen H, Klein G, et al. EBV DNA in biopsies of Burkitt tumours and anaplastic carcinomas of the nasopharynx. *Nature* 1970; 228: 1056,