

Asociación del virus de Epstein Barr (EBV) y el Linfoma de Hodgkin (LH): estudio comparativo de población pediátrica y adulta

Anahí Vijnovich Baron^{1*}, Elena De Matteo^{**}, Paola Chabay^{**},
Marta Dragosky^{*}, Jose Porta^{*}, María V Preciado^{**}

¹Centro de Patología, ^{**}Htal de Niños Ricardo Gutierrez, ^{*}Htal de Oncología Marie Curie

Dra. Anahí Vijnovich-Baron: Centro de Patología, Av Pueyrredon 1017, 10 "A"
(1118 AAA) Buenos Aires, Argentina. Tel/fax: 54-11-4962-4548
E-mail: avijnovich@intramed.net.ar

Fecha de recepción: 15-10-01
Fecha de aprobación: 20-11-01



ARTÍCULO
ORIGINAL

HEMATOLOGÍA, Vol. 6 N° 1: 8-12
Enero-Abril, 2002

RESUMEN

El LH presenta una curva bimodal en la distribución por edades que no se encuentra en otros linfomas. El 1er pico corresponde a adultos jóvenes en países económicamente desarrollados y a niños en países subdesarrollados, mientras que el 2º pico corresponde siempre a adultos (>50 años). La asociación del LH con el EBV ha sido documentada en diversos trabajos. Nuestro objetivo es analizar comparativamente la presencia de dicho virus en casos de LH en niños y adultos.

Material y Métodos: biopsias de pacientes con LH: 79 ganglios de niños, 65 ganglios de adultos y 1 pieza de esplenectomía, todas fijadas en formol e incluidas en parafina. Detección de proteínas virales LMP-1 por inmunohistoquímica y EBER-1, -2 por Hibridización *in situ*.

Resultados: Distribución por edades y sexo: niños: 2 a 15 años (mediana 8) 76,5% varones, adultos: 16 a 80 años (mediana 38), 51% varones. Detección de EBV: a) población pediátrica: 42 casos + (53%) con ambas técnicas. 67% correspondieron al subtipo histológico celularidad mixta (CM) ($p=0,01$), uno de ellos se diagnosticó como CM interfolicular. En los menores de 7 años se halló EBV en el 74% de los casos ($p=0,006$); b) población adulta: en 18 casos se detectó genoma de EBV por hibridización *in situ* (27%), siendo el 55,5% para la CM y el 33% para la EN.

Conclusiones: 1) La asociación del LH con EBV es más frecuente en niños que en adultos (53% vs 27%) 2) La subpoblación de menores de 7 años presentó una altísima asociación (74%). 3) La presencia del virus en los dos grupos estudiados comparte el patrón epidemiológico descripto para países económicamente desarrollados. 4) Con respecto a los subtipos histológicos, tanto en niños como en adultos predominó el EBV en los casos de CM, destacándose en los adultos la presencia de 1 caso de LH rico en linfocitos y uno diagnosticado en bazo. 5) En los pacientes adultos la asociación de LH y EBV mostró diferencias entre los provenientes de hospital público (38%) y medio no hospitalario (20%).

Palabras clave: Estudio comparativo, Linfoma Hodgkin, EBV pediátrico, adulto

INTRODUCCIÓN

En la mayoría de los tumores las causas de su origen no pueden ser determinadas con toda exactitud, pero se sabe que el fenotipo maligno es el resultado de la acumulación de varios cambios genéticos discretos, que en algunos casos se asocian con infección viral como participante del proceso de transformación¹.

En la última década se avanzó notablemente en el conocimiento sobre la Enfermedad de Hodgkin. Cabe destacar el descubrimiento de que la célula de Reed-Sternberg (RS) es linfoide, de fenotipo B en la mayoría de los casos, y de carácter clonal por lo que en realidad la EH sería un verdadero linfoma². El Linfoma de Hodgkin (LH) comprende dos entidades diferentes: el Predominio Linfocítico Nodular y el Hodgkin Clásico. Estos difieren entre sí en sus características clínicas, epidemiología, composición de la celularidad acompañante, inmunofenotipo, genética, asociación al EBV e historia natural de las mismas. Recientemente ha sido publicada la Clasificación de Tumores de Tejidos Linfoides y Hematopoyéticos de la Organización Mundial de la Salud. En esta se confirma la categorización de la clasificación REAL de cuatro subtipos dentro del Hodgkin Clásico: Rico en Linfocitos, Esclerosis Nodular, Celularidad Mixta y Depleción Linfocítica las que muestran diferentes características morfológicas, presentación clínica, y frecuencia de asociación al EBV, pero comparten el mismo inmunofenotipo^{3,4}.

El EBV tiene capacidad de producir latencia en linfocitos-B, expresando al menos diez genes de latencia: EBER-1, -2 (Epstein-Barr encoded RNA); EBNA-1, -2, -3a, -3b, -3c, -4 (Epstein-Barr nuclear antigen) y LMP-1, -2 (Latent membrane protein). De todos ellos LMP-1 es la única considerada oncogé-

nica. Su capacidad de transformar líneas de fibroblastos de ratón *in vitro* determina que estas células a su vez sean tumorigénicas en ratones atímicos. Se ha postulado que la proteína LMP-1 actuaría mimetizando a proteínas de la familia de los receptores de factor necrotizante de tumores (TNF), tales como el CD40. LMP-1 mimetizaría a un receptor CD40 activado que emite en forma continua, a través del factor TRAF-3, una señal positiva de crecimiento celular⁵.

El EBV cumple un rol etiológico en la mononucleosis infecciosa, así como también es ampliamente reconocida su asociación con ciertas neoplasias como el linfoma de Burkitt, el carcinoma nasofaríngeo y los Linfomas No-Hodgkin en inmunosuprimidos^{6,7}.

La asociación del LH con el EBV ha sido sugerida sobre la base de numerosas evidencias epidemiológicas.

- A nivel serológico se ha observado que algunos pacientes con LH, cierto tiempo antes del diagnóstico de la enfermedad, presentan un aumento del título de anticuerpos anti antígenos de cápside viral (VCA) del EBV⁸.
- Mediante técnicas moleculares como *Southern Blot*^{9,10} e hibridización *in situ* se ha demostrado la presencia de ADN viral de las biopsias ganglionares de LH, pudiéndose además detectar mediante esta última técnica genoma viral selectivamente en células de RS y de Hodgkin (H) en el 30-40% de los casos analizados en estudios de países desarrollados y en el 70-100% en países en desarrollo¹¹⁻¹⁴.
- Por inmunohistoquímica se ha detectado expresión de LMP-1 en células de RS en una proporción igual a la anterior¹⁵.
- Por PCR se detectó y tipificó EBV presente en las muestras observándose ambos tipos virales, EBV-1 y EBV-2, en los LH¹⁶.

Los parámetros de distribución de sexo, edad, tipo histológico y asociación del LH con EBV varían también según localización geográfica y situación socioeconómica. En los países en desarrollo la infección por EBV ocurre en edad temprana ya que más del 90% de los niños están infectados alrededor de los 6 años de edad, mientras que en países desarrollados sólo el 30% a 40% son seropositivos a esa edad¹⁷. En nuestro país la primera infección con EBV generalmente ocurre durante la infancia¹⁸.

OBJETIVO

Analizar comparativamente la presencia de EBV en casos de LH pediátricos y de adultos.

MATERIALES Y MÉTODOS

I. Población y muestras en estudio

Se estudiaron 79 biopsias ganglionares de pacientes pediátricos y 65 biopsias ganglionares y 1 de bazo de pacientes adultos con diagnóstico histopatológico de LH. Las biopsias fueron revisadas por dos anatomo-patólogos y tipificadas según la clasificación de la OMS¹⁹. La distribución por subtipos histológicos se muestra en la Tabla 1. Los pacientes pediátricos son del Hospital de Niños Ricardo Gutiérrez y los adultos del Centro de Patología y del Hospital Marie Curie. El rango de edad de los pacientes pediátricos es 2-15 años, (mediana: 8 años) y de los pacientes adultos 16-80 (mediana: 38 años).

II. Inmunohistoquímica

Las inmunomarcaciones se realizaron sobre las biopsias fijadas en formol e incluidos en parafina. Los cortes fueron montados sobre vidrios pretratados con 3-aminopropyltriethoxy-silane (Sigma). Para la detección de la proteína latente de membrana-1 (LMP-1) las muestras fueron digeridas con Proteasa XIV (Sigma) 30 min. a 37 °C, usando luego como Ac (anticuerpo) primario un pool de 4 Ac monoclonales que reconocen en forma conjunta al menos 3 epitopes de la molécula (CS1-4) (DAKO). La detección se realizó mediante la técnica del complejo streptavidina-biotina conjugada con peroxidasa (complejo ABC) (Vector) y los cortes fueron luego contracolorados con hematoxilina y montados.

III. Hibridización *in situ*

Los cortes de tejido fijados en formol e incluidos en parafina, montados sobre vidrios pretatados con 3-aminopropyltriethoxy-silane (Sigma), se hibridizaron con una sonda compuesta por una mezcla de dos

TABLA I
Distribución de la población por subtipos histológicos

Tipo histológico	Niños		Adultos	
	N	%	N	%
Predominio Linfocítico				
Nodular	2	3	3	4.5
Hodgkin Clásico				
Rico en Linfocitos	9	11	3	4.5
Esclerosis Nodular	25	32	34	51.5
Celularidad Mixta	39	49	25	38
Depleción Linfocitaria	4	5	1	1.5
Total	79	100	66	100

oligonucleótidos de 30 bases cada uno marcados con FITC que son complementarios a EBER-1 y -2 (*Epstein Barr encoded RNA-1 y -2*) (Novocastra) según instrucciones del fabricante. La detección se realizó con un Ac monoclonal anti-FITC conjugado con fosfatasa alcalina, usando como sustrato BCIP/NBT (Novocastra). Todos los cortes fueron luego contracolorados con hematoxilina y montados.

RESULTADOS

Se observó por hibridación *in situ* una marcación nuclear específica para EBER-1 y -2, caracterizada por su localización en la cara interna de la membrana nuclear y alrededor del nucléolo, exclusivamente en células de RS y de H en 42/79 (53%) de biopsias pediátricas y 18/66 (27%) de biopsias de adultos analizadas (Figura 1). Aquellos casos donde además se analizó la expresión de LMP-1 se consideraron como positivas las muestras que presentaron una tinción

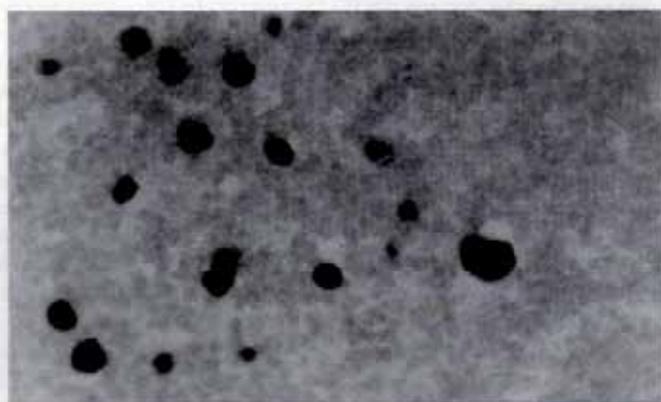


Fig. 1: Hibridación *in situ*. EBER-1 y -2. Tinción nuclear en células mononucleares de Hodgkin y células de Reed-Sternberg. x 40

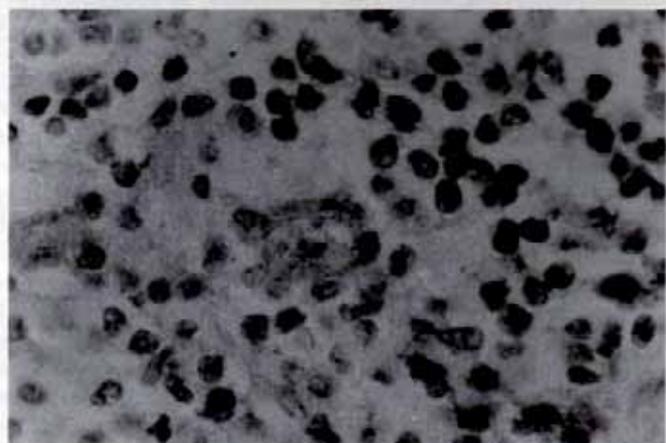


Fig. 2: Inmunohistoquímica. LMP-1. Tinción citoplasmática en células de Reed-Sternberg. x 40

TABLA II
Asociación de EBV según el tipo histológico

Tipo histológico	Niños		Adultos	
	N	%	N	%
Predominio Linfocítico				
Nodular	0	0	0	0
Hodgkin Clásico				
Rico en Linfocitos	3	7	1	5.5
Esclerosis Nodular	8	19	6	33
Celularidad Mixta	28	67	10	55.5
Depleción Linfocitaria	3	7	1	5.5
Total	42	100	18	100

específica en membrana y citoplasma de las células de RS y de H (Figura 2). La distribución de la asociación con EBV según el subtipo histológico se muestra en la tabla II

DISCUSIÓN

Las características clínico-patológicas y epidemiológicas de LH sugieren que algún agente infeccioso estaría comprometido en su etiología²⁰.

Los parámetros de distribución de sexo, edad, tipo histológicos y asociación a EBV varían también sobre la base de localización geográfica y situación socioeconómica. Los primeros estudios epidemiológicos hallaron una relación de la incidencia del LH y desarrollo industrial. Tres patrones fueron descriptos: Patrón 1: observado en países no industrializados, en grupos de bajo nivel socioeconómico, con una incidencia global del LH baja, un pico en la infancia temprana y predominio de los subtipos histológicos de CM, DL y PL. Patrón 3: países industrializados, en grupos de alto nivel socioeconómico, con una incidencia global más alta de LH, con un pico en la tercera década, mayor incidencia de sexo femenino y predominio de EN sobre la CM. Patrón 2: intermedio, visto en países con economía en transición con picos en la infancia y segunda década e igual frecuencia de subtipos histológicos de EN y CM[21]. Se ha descripto que el subtipo histológico CM resulta estadísticamente más significativos en cuanto a la asociación de LH y EBV que la edad, género y localización geográfica²⁰.

Estudios previos realizados por nuestro grupo en pacientes pediátricos de nuestro hospital han demostrado un pico en la infancia temprana, con predominio de sexo masculino y subtipo histológico CM¹⁴. Estas características comparten el patrón 1 observado en países no industrializados y se mantienen en este grupo de pacientes estudiados con un predominio de CM (49%) sobre EN (32%). Las características de nuestra población de pacientes adultos es com-

pareable a la de los países industrializados tanto en la edad de presentación, con un predominio de adultos jóvenes (mediana de 38 años), como en el subtipo histológico donde observamos un predominio de EN (61.5%) sobre CM (38%).

El porcentaje de positividad para EBV que muestra este estudio en los pacientes pediátricos mediante inmunohistoquímica e hibridación *in situ*, se asemeja más al encontrado en estudios pediátricos realizados en EEUU, Europa occidental (26% - 50%)^{11, 22, 23}; que al hallado en estudios de otros países latinoamericanos como Honduras, Perú y Costa Rica donde la positividad para EBV es cercana al 90%, aunque cabe señalar que en estos últimos el número de casos analizados es pequeño^{11, 13, 22}. De todas maneras, si tomamos en cuenta exclusivamente el grupo de los pacientes ≤ 7 años el porcentaje de EBV+ en el presente estudio asciende a 74%. La asociación estadísticamente significativa entre el EBV y el subtipo histológico CM demostrada en este grupo de pacientes pediátricos estudiados, fue también encontrada en otros trabajos realizados tanto en países económicamente desarrollados como subdesarrollados en niños en Inglaterra²² Perú¹³, EE.UU. y Honduras², Grecia²³.

La presencia del EBV en los pacientes adultos también comparte el patrón descrito para los países desarrollados (27%), siendo el subtipo CM el que presenta mayor asociación con EBV tal como ha sido descrito por otros autores⁷. Tomando en consideración los datos obtenidos de algunos estudios acerca del subtipo histológico y la relación de la presencia de EBV y el nivel socioeconómico de la población, intentamos relacionar en la población adulta dos grupos provenientes de diferente medio.

Nuestra población adulta se halla conformada por 40 pacientes de medio no hospitalario y 26 pacientes de hospital público. En estos grupos tanto el subtipo histológico como la expresión del EBV mostró diferencia entre ambos, observándose un predominio de la EN (57.5%) en el grupo no hospitalario y predominio de CM (50%) en el de hospital público. Asimismo la asociación del EBV y el LH también mostró diferencias, siendo del 38% en los pacientes hospitalarios y del 20% en los de medio no hospitalario. El número de pacientes hospitalarios, no obstante resulta limitado para arribar a conclusiones definitivas.

Nuestro estudio demuestra que el genoma de EBV no se encuentra en forma pasiva en las células tumorales, sino que además es transcrito y traducido. La expresión del EBV exclusivamente en células de RS y de H, consideradas las células malignas del LH, estaría relacionada con un papel directo del virus sobre el proceso neoplásico. Más aún si se tie-

ne en cuenta que la proteína viral que se expresa, LMP-1, es considerada un oncogen viral.

Sobre este dato varios observadores concluyen que el EBV pueda ser considerado parcialmente responsable de la patogenia del LH, sin embargo su hallazgo en solamente un subgrupo de los casos analizados, genera la posibilidad de que otros factores contribuyan en el desarrollo de la enfermedad^{2, 20}.

El EBV podría jugar un papel en la patogenia del LH mediante la activación de factores antiapoptóticos en linfocitos B pre-malignos del centro germinal, y sus antígenos latentes representar un posible blanco para inmunoterapia²⁴.

SUMMARY

Background: Hodgkin's Lymphoma (HL) has a bimodal age-incidence curve. In developed countries, HL shows low incidence among children and peaks by age 30, meanwhile, in developing countries exhibits the first peak in childhood. In both types of countries there is invariably a second peak above 50 years of age. Epstein Barr virus (EBV) association with HL has been well documented in different reports. Our purpose is to perform a comparative analysis of EBV presence in adult and pediatric HL.

Design: 79 pediatric and 65 adult formalin fixed paraffin embedded lymph node biopsies and 1 spleen were studied for the presence of EBV using EBERs *in situ* hybridization and latent membrane protein-1 (LMP-1) immunohistochemical labeling. The patient's age range and sex distribution were: children 2-15 years (median: 8), 76.5% male and adults 16-80 years, (median: 38) 51% male.

Results: EBV detection: a) pediatric population: 42+ cases (53%), 67% corresponding to mixed cellularity subtype (MC) ($p=0,01$), one of them was diagnosed as interfollicular MC. Particularly in the subgroup younger than 7 years old showed 74% EBV+ cases ($p=0,006$). b) adult population: 18 (27%) EBER+ cases by *in situ* hybridisation. 55.5% corresponding to MC and 33% to nodular sclerosis subtype. Interestingly, 1EBV+ case was a lymphocyte-rich and another one was in the spleen.

Conclusion: 1) EBV-HL association was more common in children than in adults. (53% vs. 27%) which is coincident with previous reports. 2) The subgroup of patients younger than 7 years old showed very high association (74%), 3) EBV presence in both groups was similar to the EBV association of HL reported in developed countries, 4) Both in pediatric and adult groups MC was predominant EBV associated subtype. 5) In the adult population EBV association was different between public hospital (38%) and private practice (20%) groups.

Key words: comparative study, EBV, Hodgkin's Lymphoma, adult, pediatric.

BIBLIOGRAFÍA

1. Nowell P: The clonal evolution of tumor cell populations. *Science* 1976; 194: 23-28.
2. Harris N. Hodgkin's Disease: classification and differential diagnosis. *Modern Pathology* 1999; 12: 159-176.
3. Harris N, Jaffe E, Stein H y col: A revised European American

- classification of lymphoid neoplasms: A proposal from the International Study Group. *Blood* 1994; 84: 1361-1392.
4. Stein H, Hodgkin Lymphoma, Pathology and Genetics. Tumors of Haematopoietic and Lymphoid Tissues Jaffe E, Harris N, Stein H, Vardiman J, 2001, p237-253 WHO, IARC, Lyon.
 5. Rickinson A, Kieff E: Epstein Barr Virus. In: Virology: Fields N, Knipe D, eds. Philadelphia: Lippincott-Raven Press Ltd, 1996; 2397-2446.
 6. Knecht H, Berger C, Rothenberger S, Odermatt B, Brousset P: The role of Epstein Barr virus in neoplastic transformation. *Oncology* 2001; 60: 289-302.
 7. Hsu J.L., Glaser S: Epstein Barr virus-associated malignancies: epidemiologic patterns and etiologic implications. *Clinical Reviews in Hematology Oncology* 2000; 34: 27-53.
 8. Mueller N, Evans A, Harris N, et al: Hodgkin's disease and EBV: Altered antibody pattern before diagnosis. *N Engl J Med* 1989; 320: 689-695.
 9. Weiss L, Mohaved L, Warnke R, Sklar J: Detection of Epstein Barr virus genomes in Reed Sternberg cells of Hodgkin's disease. *N Engl J Med* 1989; 320: 502-506.
 10. Weiss LM, Strickler J, Warnke R, Purtilo D, Sklar J: Epstein Barr viral DNA in tissues of Hodgkin's disease. *Am J Pathol* 1987; 129: 86-91.
 11. Ambinder R, Browning P, Lorenzana I, et al: Epstein Barr Virus and childhood Hodgkin's disease in Honduras and United States. *Blood* 1993; 81: 462-467.
 12. Herbst H, Dallenbach F, Hummel M, et al: Epstein Barr Virus latent membrane protein expression in Hodgkin and Reed Sternberg cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; 88: 4766-4770.
 13. Chang K, Albuja P, Chen Y, Johnson R, Weiss L: High prevalence of Epstein Barr Virus in Reed Sternberg cells of Hodgkin's disease occurring in Perú. *Blood* 1993; 81: 496-501.
 14. Preciado MV, Diez B, Grinstein S: Epstein Barr virus in Argentine childhood Hodgkin Disease. *Leukemia and Lymphoma*, 1997; 24: 283-290.
 15. Pallesen G, Hamilton-Dutoit S, Rowe M, Young L: Expression of Epstein Barr virus latent gene products in tumour cells of Hodgkin's Disease. *Lancet* 1991; 337: 320-322.
 16. Sample J, Young L, Martin B, Chatman T, Kieff E, Rickinson A: EBV types 1 and 2 differ in their EBNA-3A, EBNA-3B and EBNA-3C genes. *J Virol* 1990; 64: 4084-4092.
 17. Preciado MV, De Matteo E, Diez B, Menarguez J, Grinstein S: Presence of Epstein Barr virus and strain type assignment in Argentine childhood Hodgkin's disease. *Blood* 1995; 86: 3922-3929.
 18. Chabay P, Burna V, Moar A, Grinstein S, Preciado MV: Prevalencia de la infección por el virus de Epstein Barr en pacientes pediátricos. *Rev. Hosp. Niños B.Aires* 1999; 41: 88-91.
 19. Harris N, Jaffe E, 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.
 20. Jarrett RF; Mac Kenzie J Epstein-Barr virus and other candidate viruses in the pathogenesis of Hodgkin's disease. *Semin Hematol* (United States), Jul 1999, 36(3) p 260-269.
 21. Harris N, The Many faces of Hodgkin's Disease around the world: What have we learned from its pathology? *Annals of Oncology* 1998; 9: S45- S46.
 22. Weinreb M, Day P, Murray P, et al: Epstein Barr Virus (EBV) and Hodgkin's disease in children: incidence of EBV latent membrane protein in malignant cells. *J Pathol* 1992; 168: 365-369.
 23. Kalmanti M, Kanavaros P, Sakalidou A, et al Expression of the EBV encoded latent membrane protein in Hodgkin's Disease occurring in childhood. *Med Pediatr Oncol* 1993; 21: 579.
 24. Weiss LM Epstein-Barr virus and Hodgkin's disease [In Process Citation] *Curr Oncol Rep* (United States), Mar 2000, 2(2) p 199-204.