

"The Death of Seneca", 1684-85. Luca Giordano.



Carga viral del Virus Epstein Barr en sangre total como biomarcador diagnóstico en los desórdenes linfoproliferativos en pacientes inmunocompetentes

**Brady Beltrán Gárate¹, Ausberto Chunga², Luis Riva¹, Domingo Morales³,
Pilar Quiñones³, Alejandro Yabar³.**

RESUMEN

La cuantificación de la carga viral en sangre del Virus Epstein Barr (VEB) ha demostrado ser útil como marcador diagnóstico y pronóstico en específicos tipos de linfomas asociados al virus.

59 pacientes con desórdenes linfoproliferativos fueron reclutados al diagnóstico y se les realizó un estudio de carga viral para la determinación del DNA del VEB en sangre total. Se incluyeron: 46 Linfomas difuso de Células Grandes B Difuso, 3 Linfomas Hodgkin, 3 Linfomas nasal T/NK, 4 Leucemia/lymphoma T del Adulto (ATLL), 1 Linfoma T periférico no especificado, 1 Linfoma T paniculítico y 1 Linfoma Hidroa vaciniforme-like. Los resultados arrojaron: 13 casos positivos (rango 0.25-

¹ Oncólogo, Servicio Oncología Médica, Hospital Edgardo Rebagliati Martins.

² Patólogo clínico, Unidad de Banco de Órganos, Hospital Edgardo Rebagliati Martins.

³ Anatomopatólogo, Departamento de Anatomía Patológica, Hospital Edgardo Rebagliati Martins.

46,400 copies/ul): 7 fueron LCGBD, 2 Linfomas T/NK nasal, 2 ATLL, 1 Linfoma Hodgkin y 1 Linfoma Hidroa vaciniforme-like. 11/13 casos positivos tuvieron estudio de EBER-CISH en tejido tumoral, el cual fue positivo en todos los casos. El estudio sugiere que la cuantificación en sangre total del DNA del VEB correlaciona con la presencia del virus en células tumorales y podría ser útil como biomarcador diagnóstico.

Palabras clave:

VEB, carga viral, desórdenes linfoproliferativos.

ABSTRACT

Quantification of viral blood load for EBV has demonstrated to be useful as marker in diagnosis and prognosis in different specific lymphomas related to virus. 59 patients with diverse lymphoproliferative disorders were recruited at diagnosis to evaluate viral load of EBV DNA in whole blood. We included: 46 Diffuse large B cell Lymphoma (DLBCL), 3 Hodgkin Lymphoma, 3 T/NK nasal type lymphoma, 4 Adult T Leukemia/lymphoma (ATLL), 1 T cell lymphoma unspecified, 1 T panicullitic lymphoma and 1 Hydroa vacciniform-like Lymphoma. Results showed: 13 cases were positive (range 0.25-46,400 copies/ul): 7 were DLBCL, 2 T/NK nasal type Lymphoma, 2 ATLL, 1 Hodgkin Lymphoma y 1 Hidroa vaciniforme-like lymphoma. 11/13 positive cases had EBER-CISH in tumoral tissue and it was positive in all cases.

This study suggests quantification in total whole blood for EBV DNA correlates with the presence of EBV in tumoral cells and it could be a useful diagnostic biomarker.

Key words:

EBV, viral load, lymphoproliferative disorders.

INTRODUCCIÓN

Los síndromes linfoproliferativos son procesos neoplásicos que se originan en el tejido linfoide tanto central como periférico. Presentan diversas variedades morfológicas, inmunológicas, genéticas y clínicas, expresión de la variedad citológica y de la diversidad de la función inmune que corresponde a estas estructuras¹.

La actual clasificación de los síndromes linfoproliferativos corresponde a la de la Organización Mundial de la Salud (OMS)^{2,3} que establece formas anatomoclínicas estudiadas mediante criterios morfológicos, inmunofenotípicos, genéticos y clínicos, estableciendo la célula de origen de cada uno de estos procesos.

Estos trastornos se encuentran en incremento en incidencia a nivel mundial que no sólo se atribuye a la epidemia del HIV sino también al aumento de prevalencia de linfomas en mayores de 65 años^{1,2}.

En la etiopatogenia de estos trastornos se incluyen como factores a productos químicos y físicos como es el caso de fenilhidantoína, herbicidas, ciertos solventes colorantes, así como exposición previa a quimioterapia y radioterapia¹. Otro factor causal lo representan virus y bacterias, como el *Helicobacter pylori*, Epstein Barr virus (VEB), el retrovirus HTLV 1/2, el herpesvirus-8, el HIV que actuaría como agente permisivo y recientemente el virus simiano SV-40^{4, 5, 6, 8, 9, 10}.

El Linfoma No Hodgkin más frecuente en el Perú es el Linfoma de Células Grandes B Difuso (LCGBD) que representa el 56% de todos los tipos histológicos de acuerdo a un estudio retrospectivo de 1.034 casos de nuestro hospital colectados desde 2002 al 2006 (data no publicada).

La infección del Virus Epstein Barr (VEB) ha sido relacionada con varias entidades linfoproliferativas como el Linfoma de Burkitt¹¹, el Linfoma T/NK extranodal¹², el Linfoma/Leucemia NK agresivo¹³, la granulomatosis linfomatoide¹⁴, el Linfoma angioinmunoblástico de células T¹⁴, el Linfoma de Hodgkin¹⁵ y el Linfoma de células T hidroa-like¹⁶.

El presente trabajo de investigación pretende definir si la carga viral en sangre total para el ADN del VEB puede ser útil como biomarcador diagnóstico de los desórdenes linfoproliferativos asociados al VEB en inmunocompetentes.

MATERIAL Y MÉTODOS

59 pacientes con trastornos linfoproliferativos fueron diagnosticados entre diciembre 2008 a noviembre 2009 en el Hospital Edgardo Rebagliati Martins y tuvieron la determinación sérica de la carga viral para el VEB al diagnóstico en sangre total. La edad promedio de los pacientes fue 60 años (rango 17 a 90 años). El 58% (34/59) fueron varones.

Los diagnósticos de los pacientes reclutados fueron: 46 LCGBD, 3 Linfomas Hodgkin, 3 Linfoma nasal T/NK, 4 Leucemia/lymphoma T del Adulto (ATLL), 1 Linfoma T periférico no especificado, 1 Linfoma T paniculítico y 1 Linfoma Hidroa vaciniforme-like.

La detección y cuantificación del ADN viral se realizó a través del equipo de PCR a tiempo real (RT) Lyght Cycler 2.0 de Roche y la linealidad del ensayo fue de 100-1000000 copias /uL. Los casos con carga viral positiva fueron sometidos a la detección del VEB en tejido tumoral del taco de parafina.

Para detectar la presencia del VEB se utilizó la técnica de Hibridización in situ visualizada con cromógeno (CISH). Para ello se empleó una sonda PNA EBER conjugada con fluoresceína (DAKO). Después de que los cortes fueron desparafinados se procedió a la incubación con la sonda. La detección de la reacción se realizó utilizando un anticuerpo primario anti fluoresceína. Posteriormente se utilizó el sistema de visualización LSAB+ y el empleo de diaminobenzidina como cromógeno. La reacción se consideró positiva para la presencia del VEB si había expresión en el núcleo de las células tumorales.

RESULTADOS

De los 59 pacientes evaluados: 13 casos fueron positivos (rango fue 0.25-46,400 copias/ul): 7 fueron LCGBD, 2 Linfoma T/NK nasal, 2 ATLL, 1 Linfoma Hodgkin y 1 Linfoma Hidroa vaciniforme-like.

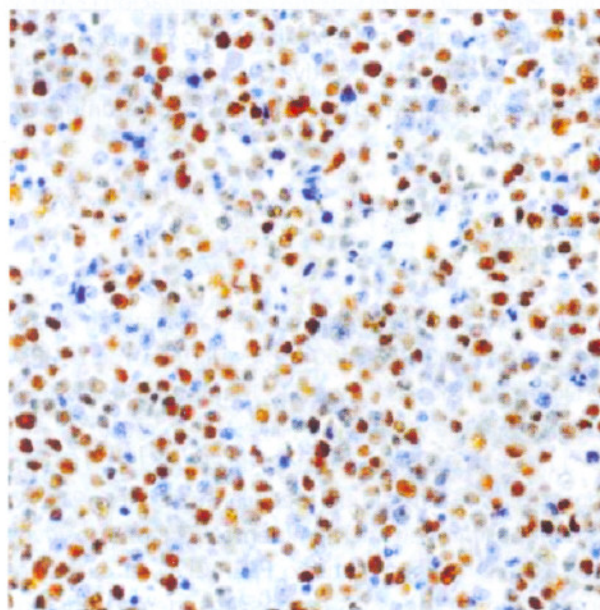
11/13 casos tuvieron estudio de EBER-CISH. 9 fueron positivos para marcaje en las células tumorales y 2 casos fueron positivos en microambiente. 5/7 casos positivos con LCGBD tuvieron estudio EBER-CISH, el cual arrojó positivo en todos los casos. Estos fueron definidos

como LCGBD asociado al VEB del anciano de acuerdo a la nueva clasificación de la Organización Mundial de Salud 2008. Uno de ellos fue evaluado al final el tratamiento y el estudio de carga viral fue negativo. Los dos casos positivos con diagnóstico de ATLL tuvieron el estudio EBER-CISH, el cual fue positivo solo en las células del microambiente. Curiosamente solo 2/3 (66%) casos con diagnóstico de Linfoma T/NK nasal fueron positivas para carga viral, 1 Linfoma Hodgkin y 1/1 (100%) Linfoma Hidroa-vacciniforme.

Tabla 1. Casos con carga viral positiva

Entidad	Nº	Nº positivo	CISH-EBER células tumorales
LCGBD	46	7	5/5 100%
T/NK	3	2	2/2 100%
ATLL	4	2	0/2 0%
Hydroa	1	1	1/1 100%
Hodgkin	3	1	1/1 100%
T periférico	1	0	-
T paniculítico	1	0	-

Gráfico 1. EBER CISH positivo en tejido tumoral



DISCUSIÓN

Este estudio correlacionó la carga viral para el VEB medida en sangre total con la presencia del VEB dentro de las células tumorales.

Dentro de los casos positivos se identificó a cinco casos con diagnóstico LCGBD que también resultaron positivos al estudio EBER CISH. Estos casos de acuerdo a la nueva clasificación de la Organización Mundial de la Salud 2008 corresponden a la nueva entidad denominada: LCGBD asociada al VEB del anciano.

El LCGBD VEB+ del anciano es una entidad que afecta usualmente a mayores de 70 años con estadios avanzados y corta sobrevida. El estudio más grande en esta entidad, fue realizado por Oyama *et al.* que describieron 96 de pacientes con LDCGB asociados al VEB confirmando que la presencia del virus imprime un mal pronóstico. Este autor confirma que la entidad es prevalente en mayores de 70 años, curso agresivo y frecuente compromiso extranodal (pulmón y piel). Incluso se estableció un score de dos variables como son la edad y los síntomas B como factores pronóstico en esta nueva entidad¹⁷. Dicho estudio detectó 156 casos de 1792 pacientes con LDCGBD (8.7%).

Otros linfomas asociados al VEB son el Linfoma Hodgkin, Linfoma T/NK nasal y el Linfoma Hydroa vacinorme-like, los cuales en el presente estudio tuvieron positividad para el VEB en sangre total. Hecho que era de esperarse. Sin embargo, dos casos de ATLL fueron positivos en carga viral pero al estudio CISH, la positividad se presentó en las células no tumorales del microambiente. Este hecho es explicado por la inmunosupresión inducida por el HTLV-1 que originaría una reactivación del VEB.

El rol de la infección del VEB en la patogénesis del LDCGB es aún desconocido. Estudios recientes demostrarían que una inmunodeficiencia selectiva al VEB favorecería la infección crónica de este virus y posteriormente el desarrollo del linfoma¹⁸. El VEB puede infectar linfocitos B no activados y luego convertirlos en formas activadas^{19,20}. Los efectos de la transformación están asociados con la expresión restringida de genes latentes codificados por el VEB como el LMP-1²¹. LMP-1 es una proteína de membrana integral que activa

las proteína antiapoptótica Bcl2²² y funciona como un miembro constitutivo activo de la superfamilia del Receptor del Factor de Necrosis Tumoral (TNFR) activando varias vías de señalización incluyendo el Factor de Transcripción nuclear kappa-B (NF-kB)²³, la cascada MAP kinasa²⁴ y la vía AKT/fosfatidilinositol 3 kinasa²⁵. Las proteínas activadas constitutivamente en estas vías podrían contribuir a las características clínicas de los tumores asociados al VEB.

La determinación de la carga viral con sangre total ha sido recientemente probada por varios autores siendo incluso más práctico que emplear las muestras en plasma o en PBMCs.

Jo *et al.* empleó carga viral de sangre total para VEB y correlacionó con enfermedad extranodal al debut y recaída en LCGBD. Además encontró que los pacientes con carga viral no detectable, luego del tratamiento,

eran pacientes con respuesta completa a diferencia de los pacientes con enfermedad activa, los cuales tenían carga viral detectable en sangre²⁶.

Wing Yang *et al.* publicó un estudio donde encontró que todos los linfomas VEB tuvieron carga viral de plasma positiva, donde se incluyó a 4 casos con LCGBD. El autor concluyó que la carga viral es un biomarcador diagnóstico y pronóstico en los linfomas asociados al VEB²⁷.

Estudios posteriores tendrán que evaluar el rol predictor y pronóstico de la carga viral en este tipo específico de linfoma.

En conclusión, basados en esta investigación y apoyados en estudios previos, la carga viral para VEB en sangre total puede ser un buen biomarcador diagnóstico en los desórdenes linfoproliferativos asociados al VEB en inmunocompetentes a excepción del ATLL.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Cortés-Funés H, Díaz-Rubio E, *et al*. Oncología Médica 1999. Libros Principes, Madrid, España.
2. De Vita V, Hellman S, Rosemberg S. Cancer principles and practice of oncology. Lippincot Raven Publisher, Philadelphia, New York, 1996.
3. Harris NI, Jaffe ES, Diebold J, *et al*: World Health organization classification of neoplastic diseases of the hematopoietic and lymphoid tissue, Virginia, november 1997. J Clin Oncol 1999; 17: 3835-3849.
4. Oudejans JJ, Jiwa Nm, adrian JC, van den Brule *et al*. Epstein –Barr virus and its possible role in the patogénesis of B-cell lymphoma. Critical Rew Oncol Hematol 1997;25:127-138
5. Moses A, Nelson J, Bagby Gc: The influence of human immunodeficiency virus –1 on hematopoiesis. Blood 1998;91:1479-1495.
6. Wotherspoon AC, Ortiz-Hidalgo C, Falzon MR *et al*: Helicobacter pilori associated gastritis and primary B cell gastric lymphoma. Lancet 1991; 338:1175-1176.
7. Vílchez Ra, Madden ER *et al*. Association between simian virus 40 in Non-Hodgkin lymphoma. Lancet 2002 Mar 9, 359 (9309):817-823. 10.-Pazdur R, Laurewce R *et al*. Cancer Management: A multidisciplinary Approach. Third Edition. USA, 1999
8. Casanova L, Zaharia M *et al*. Prognostic factors in Primary Nodal Lymphoma Abstract Asco 2001 :1189.
9. Carrasco A: Beltrán B. *et al*. "Clinical and phenotypic characteristics of adult T-Cell Leukaemia / Lymphoma – Report of 36 cases in Lima-Perú". Abstract VI Meeting of the European Haemathology Association Mayo 2001.
10. Solidoro A, Casanova L *et al*. Linfoma del tracto gastrointestinal: Una enfermedad neoplásica del subdesarrollo. Rev Gastroent Perú 1993;13:148-149.
11. Kieff EaR, AB. In Fields Virology. Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins; 2001.
12. Siu LL, Chan JK, Kwong YL. Natural killer cell malignancies: clinicopathologic and molecular features. Histol Histopathol. 2002;17:539-554.
13. Heslop HE. Biology and treatment of epstein-barr virus-associated non-hodgkin lymphomas. Hematology Am Soc Hematol Educ Program. 2005:260-266.
14. Anagnostopoulos I, Hummel M, Finn T, *et al*. Heterogeneous Epstein-Barr virus infection patterns in peripheral T-cell lymphoma of angioimmunoblastic lymphadenopathy type. Blood. 1992;80:1804-1812.
15. Pallesen G, Hamilton-Dutoit SJ, Rowe M, Young LS. Expression of Epstein-Barr virus latent gene products in tumour cells of Hodgkin's disease. Lancet. 1991;337:320-322.
16. Barrionuevo C, Anderson VM *et al*. Hydroa-like cutaneous T-cell lymphoma: a clinicopathologic and molecular genetic study of 16 pediatric cases from Peru. Appl Immunohistochem Mol Morphol. 2002;10(1):7-14.
17. Oyama T, Yamamoto K, Asano N, Oshiro A, Suzuki R *et al*. Age-Related EBV-Associated B-Cell Lymphoproliferative Disorders Constitute Distinct clinicopathologic Group: A Study of 96 Patients. Clin Cancer Res 2007;13(17):5124-5132.
18. K. N. Heller, P. G. Steinherz, C. S. Portlock, C. Münz. EBV-positive lymphoma patients have a selective deficiency in EBV immunity. Journal of Clinical Oncology, 2007 ASCO Annual Meeting Proceedings Part I; 25 (18S): 21032
19. Pattengale PK, Smith RW, Gerber P. Selective transformation of B lymphocytes by E.B. virus. Lancet. 1973;2:93-94.
20. Thorley-Lawson DA. Epstein-Barr virus: exploiting the immune system. Nat Rev Immunol. 2001;1:75-82.
21. Kaye KM, Izumi KM, Kieff E. Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 is essential for B-lymphocyte growth transformation. Proc Natl Acad Sci U S A. 1993;90:9150-9154.
22. 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;65:1107-1115.
23. Kilger E, Kieser A, Baumann M, Hammerschmidt W. Epstein-Barr virus-mediated B-cell proliferation is dependent upon latent membrane protein 1, which simulates an activated CD40 receptor. Embo J. 1998;17:1700-1709.
24. Huen DS, Henderson SA, Croom-Carter D, Rowe M. The Epstein-Barr virus latent membrane protein-1 (LMP1) mediates activation of NF-kappa B and cell surface phenotype via two effector regions in its carboxy-terminal cytoplasmic domain. Oncogene. 1995;10:549-560.
25. Roberts ML, Cooper NR. Activation of a ras-MAPK-dependent pathway by Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 is essential for cellular transformation. Virology. 1998;240:93-99.
26. Wing-Yan A, Pang A, Choy C, Chim C, and Kwong Y. Quantification of circulating Epstein-Barr virus (EBV) DNA in the diagnosis and monitoring of natural killer cell and EBV-positive lymphomas in immunocompetent patients. Blood, Jul 2004; 104: 243 – 249
27. Jo SA, Hwang SH, Kim SY, Shin HJ, Chung JS, Sol MY, Chang CL, Lee EY. Quantitation of whole blood Epstein-Barr virus DNA is useful for assessing treatment response in patients with non-Hodgkin's lymphoma. Int J Lab Hematol. 2010 Feb;32(1 Pt 1):106-13