

**INFECCIÓN POR EL VIRUS DE EPSTEIN BARR EN
PACIENTES PEDIÁTRICOS Y ADULTOS AFECTOS DE
LINFOMA DE HODGKIN: ESTUDIO EPIDEMIOLÓGICO Y
ALTERACIONES ASOCIADAS
DEL CICLO CELULAR Y LA APOPTOSIS**

Tesis doctoral presentada por

Francisco Almazán Castro

para optar al grado académico de
DOCTOR EN MEDICINA

Trabajo dirigido por

Dr. Carlos Rodrigo Gonzalo de Liria

Tesis del programa de Doctorado adscrita al Departament de Pediatria,
Obstetricia i Ginecologia, Medicina Preventiva i Salut Pública de la Facultat de
Medicina de la Universitat Autònoma de Barcelona

Francisco Almazán Castro
Doctorando

Carlos Rodrigo Gonzalo de Liria
Profesor Titular de Pediatría

Badalona 2014

“Sólo aquellos que se arriesgan a ir muy lejos, pueden llegar a saber lo lejos que pueden ir”

T.S. Elliot

“En medio del invierno, me pareció que había, dentro de mí, un invencible verano”

Albert Camus

“Sólo con el corazón se puede ver bien. Lo esencial es invisible para los ojos”

Antoine de Saint-Exupéry

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer y dedicar este trabajo en primer lugar a mi familia.

A mis padres. Gran parte de lo que soy y de cómo soy os lo debo a vosotros, a los genes que me transmitisteis y a vuestro esfuerzo por darme la mejor educación. Sé perfectamente lo que sentiréis al tener este libro entre las manos, al escucharme defendiendo este trabajo, lo mismo que yo sentiría al escuchar a mis hijos. Esto es un pequeño agradecimiento por todo lo que me habéis dado. Os quiero.

A mis hermanos, Roger y José, sois mis hermanos y sois mis mejores amigos, y con eso está todo dicho. I love'u. I por supuesto a Ester y a Ani, mis queridas cuñadas, y a David, mi nuevo sobrino.

A mis amigos, los buenos amigos, esos que a lo largo de los años persisten. A mi tercer hermano Marian, como no a Rosa, a mi queridísimo amic Ferran, a Eva, a Ramón, ya lo veis, ahora sí seré doctor..

Y, muy especialmente, a tres personas. Bien, tres que son cuatro.

A Laura. Eres mi luz, mi alegría, mi paz, mi felicidad. Me has reenseñado a amar, me has hecho mejor persona. Tú eres la que mejor sabe cuánto me ha costado, pero lo hemos conseguido. Esto es para ti. Te quiero.

Y a mis hijos, a Eric y Martina, sois el regalo más bonito que me ha dado la vida, os quiero como no os podéis ni imaginar, y al tercero que está en camino, ¡estamos deseando verte y abrazarte!

Pero mi tesis es un trabajo de investigación médica. Vosotros, familia, amigos, os alegraréis por mí, podréis intuir que esto debe ser algo importante. Pero los que de verdad entenderéis la magnitud de esto, porque sabéis lo que es nuestro trabajo, las horas que dedicamos a nuestra profesión, lo difícil que es hacer un trabajo así, sois mis compañeros.

Quiero empezar dedicando este trabajo a las enfermeras y auxiliares de nuestra planta, a todas evidentemente pero en especial a las antiguas del lugar. Me cuidasteis cuando llegué, era vuestro niño (es que los hombres en pediatría somos especie en extinción, hay que cuidarlos!!) y hemos ido creciendo juntos. Nuria, Rosa, Marcela, Paz, Charo, Mercedes, Carmina, Rachel, Maica, Yolanda, Isa, Soco, Coral, Neus, Pilar, Kiti, Loli, Lucia... Gracias por ser como sois, por vuestro trabajo y por vuestro cariño.

A Helen, nuestra querida secre, nuestra secre, psicóloga, casi-abogada, informática, confidente... Gràcies pels xiclets, i per recordar-me totes les coses que algú tan despistat com jo de tant en tant s'oblida, i per la teva paciència... Es una sort tenir una secretaria i una persona com tu amb nosaltres.

A los residentes, de forma muy especial, a los que estáis, a los que vendrán y a los que acabasteis para empezar nuevos caminos. Con el tiempo, poco a poco, vamos sintiendo la necesidad de enseñar, de devolver lo que a mí me dieron cuando llegué a este hospital.

Enseñar a amar esta profesión, a que os sintáis orgullosos y privilegiados por vuestro trabajo. Es un lujo y una gran responsabilidad. Responsabilidad, compromiso, búsqueda de la excelencia, esfuerzo, y disfrutar con el trabajo. Tan importante como los conocimientos, esos son los valores que intentamos transmitirlos.

Y esto yo lo aprendí de mis profesores, y a ellos les dedico mi tesis muy especial, muy entrañablemente. A mis profesores, a los que fueron mis adjuntos cuando yo llegué. Me enseñasteis todo eso, un estilo, una filosofía. Me enseñasteis a ser médico y a ser persona. Dr. Natal, Dr. Javier, Dr. Rodrigo, Dr. Pintos, Dr. Del Alcázar, Dr. Bel, Dr. Coroleu, Dra. Brossa, Montse Rogé, Mercé Artigues, Joaquim Alonso, Lluís Mateu, Pilar García, Eli Trias. Rigurosidad. Responsabilidad. Compromiso con los pacientes. Esfuerzo. Dedicación. Amor a la medicina. Gracias a todos.

A mis compañeros, a todos, con mención especial para Montse mi coR (aquí estem, qui ens ho havia de dir quan vem començar i j) a María, Mimar, Marc, Dolors, Agus, Toni, las tres Martas, Carlos, porque sois mi segunda familia y la verdad es que estoy encantado de trabajar con vosotros.

A los profesionales de otros servicios, sin los cuales esta tesis no habría sido posible. Águeda Hernández, José Luis Mate, compañeros del servicio de hematología, gracias a todos

A Nuria Pardo y Montse Torrent, por su colaboración y ayuda en la realización de este trabajo.

A todos los compañeros del servicio de Oncohematología pediátrica del Hospital Materno Infantil Vall d'Hebrón, donde completé mi formación y donde me siento como si fuese mi segunda casa, es un placer seguir aprendiendo y trabajar con vosotros.

En este punto tengo que hacer dos agradecimientos especiales.

A Carlos Rodrigo, mi primer adjunto, mi jefe y el director de mi tesis. Me dijiste el primer día que llegué al hospital, allá por el 97 "has hecho la mejor elección de tu vida al venir aquí". Me quedé sorprendido, pensé "vale, veremos". Y unos 4 años después, en mi cena de despedida de residente, me lanzaste un proverbio chino, algo así como "el que pesca en río pequeño, pesca peces pequeños y el que pesca en río grande...". Y me quedé. Al principio con ensayos clínicos, después adjunto de urgencias, más tarde adjunto de planta, y finalmente la hematooncología. Confiaste en mí para que fuese el responsable de la unidad cuando podías haber apostado por gente más experimentada (tengo que decirte que elegiste bien). Sabes que siempre te estaré profundamente agradecido por aquello, y también por haberme ayudado tanto con esta tesis. Eternamente gracias.

Al Dr. Javier. Soy incapaz de decirle Germán, lo siento, no me sale, será que es demasiado grande el respeto que le tengo. En gran parte por su culpa estoy aquí, no solo hoy defendiendo la tesis, sino dedicándome a este bendito negocio de la hematooncología. Me contagió la pasión, el conocimiento, el espíritu necesario para luchar contra lo que luchamos, el carácter, la responsabilidad, el ansia de saber... me inculcó irreversiblemente el veneno de esta profesión, y solo puedo darle las gracias y decirle que fue un honor y un placer trabajar con usted.

Para acabar, dos últimos agradecimientos.

A mis pacientes. Los que me enseñan y me recuerdan cada día lo que es la vida con su fuerza, con su entereza, con sus risas, con sus lagrimas, con sus ganas de luchar, con su espíritu, con su naturalidad. La vida es un regalo, que se tiene que disfrutar cuando todo va bien y por la que hay que luchar cuando se complica, apretar los dientes, no rendirse y luchar. Y ganar. Eso es lo que me regalan cada día.

Para todos ellos va dedicada esta tesis, para los que se han curado y nos dan un abrazo cuando vienen a los controles en consultas externas y también, especialmente, para los que nos dejaron. Ylenia, Luis Ángel, Elena Erik, Marcel, Oriol, siempre estáis en nuestro recuerdo.

I l'última dedicatoria és per la Marga. Ets la millor companya de feina que podria tenir, ets la meva amiga i ets un exemple per mi, tant professional com personal. Estic molt feliç de tenir-te al meu costat. Això es per tu.

Badalona, 2 de junio de 2014

0. GLOSARIO	19
1. INTRODUCCION	21
1.1. Ciclo celular.....	23
1.1.1. Ciclinas y protein cinasas dependientes de ciclinas (cdk).....	24
1.1.2. Cdk inhibidores (cdki): familia Cip/Kip.....	24
1.1.3. Puntos de control de ciclo celular.....	25
1.1.4. Control extracelular del ciclo celular	26
1.2. Apoptosis en el cáncer.....	26
1.2.1. Vía intrínseca de activación de apoptosis	26
1.2.2. Proteinas reguladoras de la vía intrínseca: familia Bcl-2.....	27
1.2.3. Vías extrínseca de activación de la apoptosis	27
2. VIRUS DE EPSTEIN BARR (VEB)	29
2.1. Infección y patrones de latencia	31
2.2. Detección de marcadores del VEB en los tejidos.....	33
2.2.1 Detección de antígenos víricos (técnicas inmunohistoquímicas)	33
2.2.2 Detección de ácidos nucleicos	34
2.2.3 Guías para el diagnóstico de la infección por el VEB	35
2.2.4 Detección de ADN del VEB en suero	36
3. LINFOMA DE HODGKIN CLASICO (LHc)	37
3.1. Epidemiología descriptiva	41
3.2. Histopatología.....	42
3.3. Biología molecular del LHc.....	43
3.3.1 Origen de las células de Hodgkin y Reed Sternberg (HRS)	43
3.3.2 Activación de la vía de transcripción NF-kB.....	45
3.3.3 Disregulación de expresión de los microRNA.....	46
3.3.4 Interacción entre células HRS y microambiente.....	46
3.3.5 VEB y relación etiopatogénica con el LHc.....	49
3.3.6 Presente y futuro del LHc	51

3.4. Disregulación del ciclo celular y de la apoptosis en el LHc	51
3.4.1 Expresión aberrante de ciclinas y cdk	51
3.4.2 Alteraciones de la vía supresora tumoral p53 (p14-Hdm2-p53-p21).....	53
3.4.3 Inactivación de la vía supresora Rb (p16-ciclina D-CDK4/6- Rb).....	53
3.4.4 Inactivación de la vía supresora p27 (p27- ciclina E-CDK2)	54
3.4.5 Alteraciones de las vías de señalización y disregulación de apoptosis y ciclo celular	54
3.4.6 VEB y relación con ciclo celular y apoptosis en el LHc	55
3.4.7 Correlación entre alteraciones del ciclo celular y de la apoptosis con repercusión clínica.....	56
4. ESTUDIOS DEMOGRÁFICOS	57
4.1. Estudios en población general.....	59
4.1.1 Países desarrollados	59
4.1.2 Países en vías de desarrollo.....	61
4.2. Estudios en población pediátrica.....	61
4.2.1 Países desarrollados	61
4.2.2 Países en vías de desarrollo.....	62
5. ESTUDIOS EPIDEMIOLÓGICOS	65
5.1 Factores de riesgo de LHc	67
5.1.1 Genéticos y familiares	67
5.1.2 Factores infecciosos.....	68
5.1.3 Edad, nivel socioeconómico y ambiente infantil	68
5.1.4 Inmunodeficiencias	68
5.1.5 Exposiciones ocupacionales y ambientales.....	69
5.2 Relación entre VEB y LHc	69
5.2.1 Mononucleosis infecciosa y LHc.....	69
5.2.2 VEB y subtipos histológicos.....	70
5.2.3 VEB y zona geográfica	71
5.2.4 VEB y edad, sexo y raza	71
5.2.5 VEB y pronóstico.....	71

6. JUSTIFICACIÓN.....	73
7. OBJETIVOS	77
7.1 Análisis epidemiológico del LHc en nuestro medio	79
7.2 Caracterización de las alteraciones del ciclo celular y de la apoptosis en el LHc	79
8. PACIENTES Y MÉTODOS	81
8.1. Datos epidemiológicos.....	83
8.2. Técnicas diagnósticas	85
8.2.1 Revisión histológica y construcción de las matrices tisulares.....	85
8.2.2 Técnicas inmunohistoquímicas	87
8.2.3 Técnicas de hibridación in situ.....	88
8.2.4 Técnicas de amplificación genética (PCR).....	89
8.3. Metodología estadística	90
8.4. Aspectos éticos	90
9. RESULTADOS.....	91
9.1 PARTE I: RESULTADOS EPIDEMIOLÓGICOS	93
9.1.1 Estudios de concordancia de las técnicas diagnósticas de la infección por el VEB.	94
9.1.2 Infección por VEB	95
9.1.3 Distribución del LHc por sexo	99
9.1.4 Distribución del LHc por subtipo histológico.....	100
9.1.5 Distribución del LHc en función del estadio	102
9.1.6 Distribución del LHc en función de la respuesta al tratamiento.....	105
9.1.7 Supervivencia según edad.....	105
9.1.8 Supervivencia en función del VEB.....	107
9.2 PARTE II: RESULTADOS DE CICLO CELULAR Y APOPTOSIS.....	109
9.2.1 Proteínas de ciclo celular y apoptosis.....	109
9.2.1.1. Ciclina D1	109
9.2.1.2. Ciclina E	109

9.2.1.3. Ciclina A	110
9.2.1.4. Ciclina B1	110
9.2.1.5. P16	112
9.2.1.6. P21	112
9.2.1.7. P27	113
9.2.1.8. P53	114
9.2.1.9. Bcl-2	114
9.2.1.10. Bcl-xl	114
9.2.1.11. Bax	115
9.2.2. Relaciones entre proteínas de ciclo celular y apoptosis	116
9.2.2.1. Relación entre ciclina E y p27	116
9.2.2.2. Relación entre ciclina A y p27	116
9.2.2.3. Relación entre ciclina B1 y p27	117
9.2.2.4. Relación entre ciclina A y p53	117
9.2.2.5. Relación entre ciclina B1 y p53	117
9.2.2.6. Relación entre ciclina D1 y p16	118
9.2.2.7. Relación entre p53 y bcl2	118
9.2.2.8. Relación entre p53 y bax	119
9.2.3. Análisis de supervivencia en función de las proteínas de ciclo celular y de la apoptosis.....	119
10. DISCUSIÓN.....	121
10.1. Análisis metodológico: población de estudio	123
10.2 Análisis metodológico: técnicas de diagnóstico de la infección por el VEB.....	123
10.3 Análisis de aspectos epidemiológicos	124
10.4 Análisis de alteraciones de ciclo celular y apoptosis	129
11. CONCLUSIONES	143
12. BIBLIOGRAFÍA	147

13. APÉNDICE	169
13.1 Tablas de contingencia de comparación de las técnicas diagnósticas de infección por el VEB	170
13.2 Supervivencia en función del VEB	173
13.3 Tablas de contingencia: relaciones entre proteínas de ciclo celular y de apoptosis con edad y con el VEB.....	175
13.4 Supervivencia en función de las proteínas de ciclo celular y de la apoptosis.....	188

0. GLOSARIO

ADN	Ácido desoxirribonucleico
AI	Apoptosis index
AP1	Activation protein 1
APAF	Apoptotic protease activating factor
APAF1	Apoptotic protease activating factor 1
APC	Anaphase promoting complex
ATF2	Activating transcription factor 2
BCL-2	B cell lymphoma 2
BCR	B cell receptor
CCL20	Chemokine (C-C motif) ligand 20
Cdc20	Cell division cycle protein 20
CDK	Cyclin-dependent protein kinases
CDKI (CKI)	cdk inhibitors
CM	Celularidad mixta
CTL	Cytotoxic T lymphocytes
DFI	DNA fragmentation index
DL	Deplección linfocítica
EBER	Epstein Barr encoded RNA
EBNA	Epstein Barr virus nuclear antigen
EGF1	Early growth response protein 1
EN	Esclerosis nodular
ERK	Extracellular-signal-regulated kinases
FAK	Focal activated kinase
FISH	Fluorescence in situ hybridation
FLIP	FLICE inhibitory protein
GWAS	Genome wide association study
HLA	Human leukocyte antigen
HHV	Human herpesvirus
HRS	Células Hodgkin y Reed Stenberg
HTLV-1	Human T-lymphotropic virus-1
IF	Interfollicular
IHC	Inmunohistoquímica
IKBA	NFKB inhibitor alpha
IKBE	NFKB inhibitor epsilon
IKK	I κ B kinase

ISH	In situ hybridation
JAK-STAT	Janus kinase/signal transducers and activators of transcription pathway
KSHV	Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus
LH	Linfoma de Hodgkin
LHc	Linfoma de Hodgkin clásico
LHPLN	Linfoma de Hodgkin de predominio linfocítico nodular
L&H cells	lymphocytic and histiocytic cells
LMP	Latent membrane protein
MAPK	Mitogen-activated protein kinases
MdM2	Mouse double minute 2 homolog
MI	Mononucleosis infecciosa
MIB1	E3 ubiquitin-protein ligase
miRNA	Micro RNA
MPF	Mitosis promoting factor
NASBA	Nucleic acid sequence based amplification
NF-kB	Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells
NFKBIA	Nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B cells inhibitor, alpha
NFKBIE	Nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor, epsilon
NLPHL	Nodular lymphocyte predominant Hodgkin's lymphoma
PBS	Solución buffer fosfato salino
PCNA	Proliferating Cell Nuclear Antigen
PCR	Polymerase chain reaction
PI3K-AKT	Phosphatidylinositide 3-kinases, Protein Kinase B
PL	Predominio linfocítico
PTEN	Phosphatase and tensin homolog protein
RANK	Receptor activator of nuclear factor kappa B
RB1	Retinoblastoma protein
RT-PCR	Revers transcription polymerase chain reaction
SKP2	S-phase kinase-associated protein 2
SNP	Single nucleotide polymorphism
TMA	Tissue microarray
TNF	Tumor necrosis factor
TNFAIP3	Tumor necrosis factor, alpha-induced protein 3
TNFR	Tumor necrosis factor receptor
TRAF	TNF receptor associated factors
TUNEL	Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling
VEB	Virus de Epstein Barr

1. INTRODUCCIÓN

1.1. CICLO CELULAR

“Donde aparezca una célula tiene que haber existido una célula previa, del mismo modo que los animales sólo pueden surgir a partir de otros animales y las plantas a partir de otras plantas”.[1]

“All of today’s DNA, strung through all of the cells of the earth, is simply an extensión and elaboration of that first molecule. In a fundamental sense, we cannot claim to have made progress, since the method used for growth and replication is essentially unchanged” [2]

El ciclo celular es una secuencia ordenada de procesos durante la cual se produce la duplicación exacta y sin errores del ácido desoxirribonucleico (ADN) de los cromosomas (fase S) y la posterior división, también exacta, en 2 células hijas (fase M).

Así, el ciclo celular eucariota se divide en cuatro fases secuenciales: G1, S, G2 y M. Las tres primeras se denominan en conjunto *Interfase*.

La célula dispone de unos “puntos de control” que controlan el progreso dentro del ciclo celular. Estos puntos de control evalúan y aseguran que en cada momento existen las condiciones adecuadas para que la célula pueda replicarse, y que dicha replicación se desarrolle de forma correcta.

En la primera fase, **fase G1**, se produce la replicación de los centriolos, empieza a producirse el aumento del citoplasma y aumentan en conjunto todas las estructuras celulares. Aquí ya existe un primer punto de control.

A continuación la célula entra en **fase S**, en la que se da la síntesis (duplicación) del ADN. En esta fase existe un segundo punto de control que asegura que la duplicación de los cromosomas ocurre únicamente una vez en cada ciclo celular.

Posteriormente la célula entra en **fase G2**, en la que se condensan los cromosomas y se preparan las estructuras necesarias para la mitosis. De nuevo en esta fase nos encontramos un tercer punto de control, en el que se evalúa si la duplicación se ha realizado correctamente y se puede pasar a la fase M.

Las fases G1 y G2, que proporcionalmente ocupan gran parte del tiempo en el que se desarrolla el ciclo celular, no son meros períodos de espera o fases de descanso que permitan crecer a la célula. Son puntos cruciales de control que permiten comprobar a la célula el medio interno y externo. Así, en situación de “ayuno” las células no recibirán factores de crecimiento y se quedarán “hibernando” en G1. Lo mismo ocurrirá si la célula detecta una lesión en el ADN: en este caso también habrá un stop en G1 al efecto de reparar el daño y continuar el ciclo, o bien programar el suicidio apoptótico si el daño es irreparable.

Por último, en la **fase M**, fase de mitosis, se dividirá la célula original en 2 células hijas con idéntica dotación cromosómica. [3, 4]

1.1.1. Ciclinas y protein cinasas dependientes de ciclinas (cdk)

El avance en el ciclo celular depende de 2 grupos de proteínas, las **ciclinas** y las protein cinasas dependientes de ciclina (**cdk**, *cyclin-dependent protein kinases*). Las cdk son enzimas que ejercen su acción fosforilando a determinadas proteínas. Las ciclinas son subunidades reguladoras de las cdk. La unión de las cdk con las ciclinas forma el complejo cdk-ciclina, activando la función cinasa de las cdk. Este complejo cdk-ciclina activo es el que permite el progreso del ciclo celular.

Existen varios tipos de ciclinas que son activas en distintas fases del ciclo celular. Cada una de ellas tiene especial afinidad para determinadas cdk. Así, se ha comprobado que las ciclinas D1, D2 y D3 (cdk 4 y cdk 6) y ciclina E (cdk 2) regulan principalmente la fase G1 y G1/S, la ciclina A (cdk 2) regula la fase S y las ciclinas A y B (cdk 1) regulan principalmente la fase M [5, 6]

1.1.2. Cdk inhibidores (cdki): familia Cip/Kip

Las **cdki** (*cyclin-dependent kinase inhibitors*) son una familia de proteínas polipeptídicas inhibidoras de cdk. Estas proteínas actúan uniéndose a las ciclinas e impidiendo por lo tanto la unión cdk-ciclina y la progresión del ciclo celular. Son proteínas supresoras tumorales, y los genes que las codifican son genes supresores tumorales. Por lo tanto, mutaciones en dichos genes pueden suponer una pérdida de control del ciclo celular y un riesgo de proliferación celular.

En esta familia encontramos a **p21**, **p27** y **p57**. Estas actúan a nivel de todos los cdk.

Dentro de las cdki existe una serie de proteínas que actúan de forma específica a nivel de G1, son la familia **INK4**. Estas actúan interponiéndose entre ciclina D y cdk 4/cdk 6. La más representativa de esta familia y mejor estudiada es **p16**. Otras son **p15**, **p18** y **p19** [6] (Figura 1).

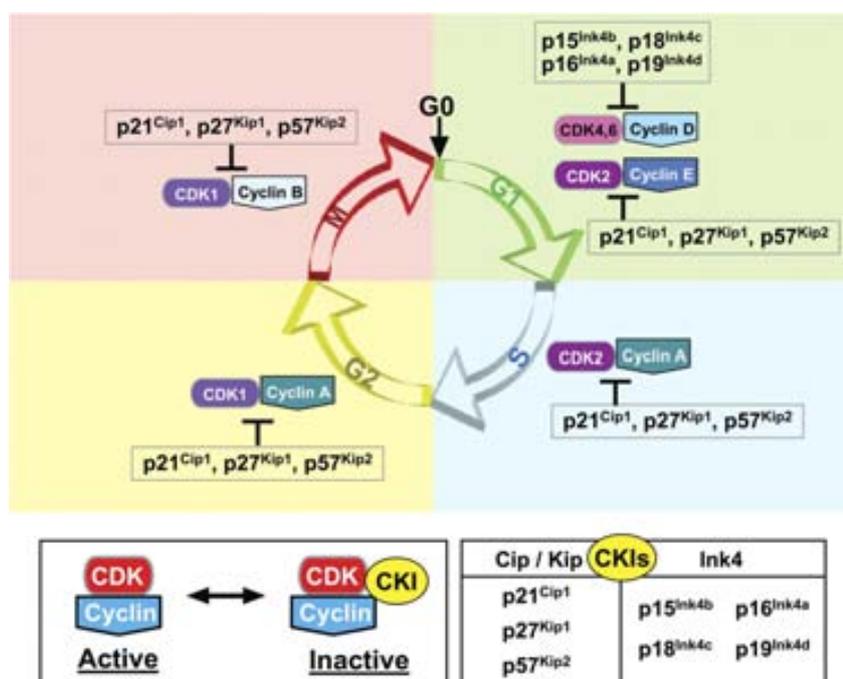


Figura 1: Ciclo celular y regulación [9]

1.1.3. Puntos de control de ciclo celular

Existen puntos de control en los que se revisa a la propia célula y el medio externo. Estos sistemas de control o “checkpoints” actúan mediante señales intracelulares negativas, que provocan el stop del avance del ciclo si detectan que las condiciones no son las ideales. Defectos a nivel de estos puntos de control pueden dar lugar a defectos del ADN que no podrán ser reparados.

Estos puntos de control son los siguientes:

- **Punto de restricción**, al final de la fase G1. Regulado por las ciclinas de fase G1 (cdk4 y 6/ ciclinas D), que actúan sobre el complejo E2F-Rb fosforilando a Rb (inactivándolo) y provocando la liberación de E2F (factor de transcripción). Esto inducirá la síntesis proteica y el avance en el ciclo.

El regulador inhibidor en este punto será p16. La acción de p16 viene controlada por el medio extracelular. El déficit de nutrientes, mitógenos y factores de crecimiento provocará un acúmulo de p16, que se unirá a cdk4 y 6/ciclina D, bloqueándolos y consiguiendo que la célula se mantenga en G1 y evitando de esta forma la progresión del ciclo celular.

Además inducirá la liberación de otra potente ckdi como p27.
- Primer punto de control: justo antes de fase S, aun en G1. Regulado por el complejo cdk2-ciclina E, inductor de ciclo celular por el mismo mecanismo descrito previamente sobre el complejo E2F-Rb.

En este caso existen 2 genes supresores tumorales que actúan bloqueando el ciclo celular en caso de lesión de ADN que son p53 y p21, y una tercera proteína supresora tumoral que es ARF. Ante una lesión en el ADN, p53 se activa separándose de Mdm2. Este aumento de p53 libre provoca también el aumento de p21, que se unirá a cdk2-ciclina E, bloqueando el ciclo celular. ARF es otro supresor tumoral que actúa uniéndose y bloqueando a Mdm2 y provocando la liberación y elevación de p53.
- Segundo punto de control: al final de G2 (antes de M). En este punto se revisa de nuevo que el medio extracelular sigue siendo adecuado y que el material genético se ha duplicado de forma correcta y sin errores.

Los reguladores aquí son las ciclinas M, o “Factor Promotor de la Mitosis” (cdk1 y ciclina A yB), cuya activación dependerá de los genes supresores p53 y p21 que actuarán como reguladores negativos.
- Tercer punto de control: en fase M. Aquí el control viene mediado por el conjunto **APC** (*anaphase promoting complex*)-cdc 20 (*cell-division cycle protein 20*). Si detectan cualquier error envían señal negativa y la célula queda frenada en metafase, antes de pasar a la anafase, suspendiéndose por lo tanto la mitosis. [7, 8]

1.1.4. Control extracelular del ciclo celular

Existen diferentes vías de control extracelular. Estas vías son rutas de transducción de señal que estimularán la proliferación celular. Por ejemplo la vía **Ras-MAPK**, constituida por una oncoproteína (Ras) y una cinasa (MAPK, *mitogen activated kinasa*) actúa inducida por mitógenos a nivel de G1, liberando el control negativo del ciclo y permitiendo la progresión del ciclo celular.

Otras vías son la vía **FAK** (*focal activated kinasa*), la vía **PI-3 quinasa**, etc.

1.2. APOPTOSIS EN EL CÁNCER

La apoptosis, o muerte celular programada, fue descrita inicialmente por sus características morfológicas, que incluían “contracción celular, desestructuración de la membrana, condensación de la cromatina y fragmentación nuclear”. [10]

Este mecanismo “suicida” de destrucción de las células innecesarias o patológicas está mediado por enzimas proteolíticas llamadas caspasas, que se activan a partir de procaspasas, sus precursores inactivos. Éstas, a su vez, se activan por otras caspasas, produciéndose una cascada proteolítica de caspasas. Este proceso, una vez iniciado, es irreversible y autoamplificable.

La apoptosis es un proceso que se activa mediante diferentes agentes como pueden ser la hipoxia, déficit de factores de crecimiento, radiación, lesión de ADN, disfunción telomérica etc.

Existen múltiples puntos de control de la apoptosis, regulados genéticamente. No obstante, se ha demostrado que diversas mutaciones oncogénicas pueden provocar alteraciones a nivel de éste proceso de muerte celular, y que tienen por lo tanto un papel muy importante a nivel de la carcinogénesis. [11]

p53 fue el primer gen supresor tumoral que se relacionó con la apoptosis. Previamente ya era conocida su acción a nivel de regulación del ciclo celular, pero en 1992 diferentes estudios demostraron que la activación por diferentes agentes (radiación, hipoxia, mitógenos) de p53 tenía un efecto promotor de la apoptosis. Posteriormente se han demostrado que la pérdida de p53, o la mutación de otros componentes de la vía p53 (Mdm-2, ARF, Bax) tiene un efecto oncogénico demostrado en diferentes tumores.

Otras mutaciones oncogénicas que pueden promover la apoptosis pueden ser la activación de c-myc, la oncoproteína E1A, la pérdida de Rb, mutaciones a nivel de p14ARF (alternate reading frame), etc. [12]

1.2.1. Vía intrínseca de activación de apoptosis

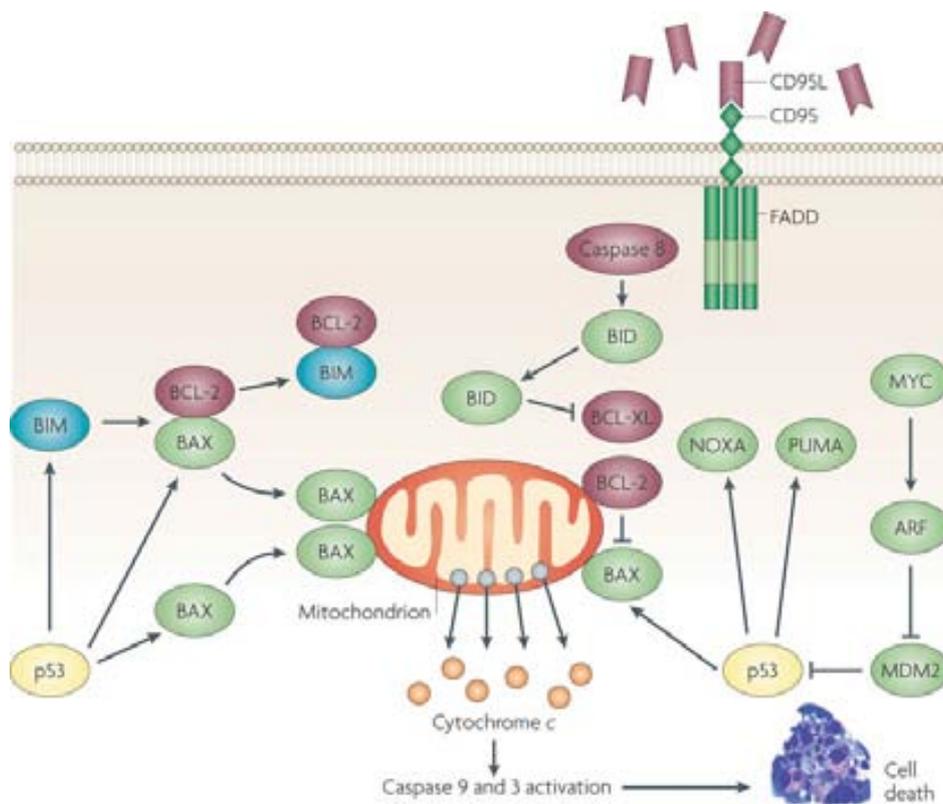
En la activación de la vía intrínseca de la apoptosis es de vital importancia la liberación de citocromo C mitocondrial, que al ser liberado se une a **Apaf 1** (*apoptotic proteasa activating factor 1*) y a la procaspasa 9, formándose el complejo efector de muerte Apaf-1/caspasa-9, o apoptosoma, e induciendo la fase final de la apoptosis.

Esta vía puede ser activada por la vía extracelular, pero será regulada por diferentes proteínas. Mutaciones a nivel de estas proteínas tendrán por lo tanto potencial oncogénico.

1.2.2. Proteínas reguladoras de la vía intrínseca: familia Bcl-2

Existen 3 familias de proteínas, que se clasifican en función de los diferentes dominios que presentan. Desde el punto de vista funcional podemos clasificarlas en 2 grupos: proteínas antiapoptóticas (**Bcl-2, bcl-xl**), y proteínas proapoptóticas (**Bax, Bak, Bad, Bim, Bid, Puma, Noxa**). Bcl-2 fue clonado y caracterizado en 1988, y su acción no empezó a ser bien establecida hasta unos años después, siendo uno de los oncogenes más conocidos y estudiados.

Posteriormente se han podido identificar las restantes proteínas descritas, hasta un total de 16 que conocemos en la actualidad. (Figura 2).



Nature Reviews | Cancer

Figura 2: Apoptosis y cáncer. [13]

Se conocen en profundidad sus mecanismos de acción y como están interrelacionadas. No obstante, la decisión última de iniciación o no de la apoptosis resulta de una compleja integración de señales internas y externas pro y antiapoptóticas, así como de un “cross-talk” entre diferentes vías de señalización. [4, 12]

1.2.3. Vías extrínseca de activación de la apoptosis

A nivel molecular las vías de muerte celular mejor conocidas son las que afectan a los “death receptors”, incluyendo a Fas/CD 95, TNFR1, DR3, DR4, DR5. Éstas son proteínas de

membrana de la familia de los TNF que activan la apoptosis al producirse la unión receptor-ligando.

Así, es conocido que mutaciones a nivel del receptor Fas/CD95 pueden generar la aparición de enfermedades linfoproliferativas por defecto de la apoptosis a nivel de las células linfoides.

Otra vía clásica de señalización es la vía PI-3 quinasa. Esta vía se activa por Ras y es inhibida por el gen supresor tumoral PTEN. La aparición de mutaciones activadoras de Ras o pérdida de PTEN se detectan frecuentemente en diferentes tumores.

A su vez, existen proteínas inhibidoras reguladoras de la apoptosis, “puntos de control”, tanto intracelulares como extracelulares, que pueden bloquear esa unión ligando-receptor, como por ejemplo FLIP (FLICE inhibitory protein). Estas proteínas pueden ser también reguladas por otras vías, como por ejemplo por la vía NF- κ B que promueve una acción antiapoptótica y activa a la vez genes implicados en la cascada inflamatoria. [12]

En resumen, existe una compleja maquinaria celular, regulada por vías de señalización extra e intracelulares que regularán el ciclo celular y la apoptosis. La aparición de alteraciones en cualquiera de estos puntos tendrá un importante potencial oncogénico, por lo que la investigación sobre el ciclo celular y la apoptosis es muy importante de cara al diagnóstico, el pronóstico y la terapia del cáncer.[12] (Figura 3)

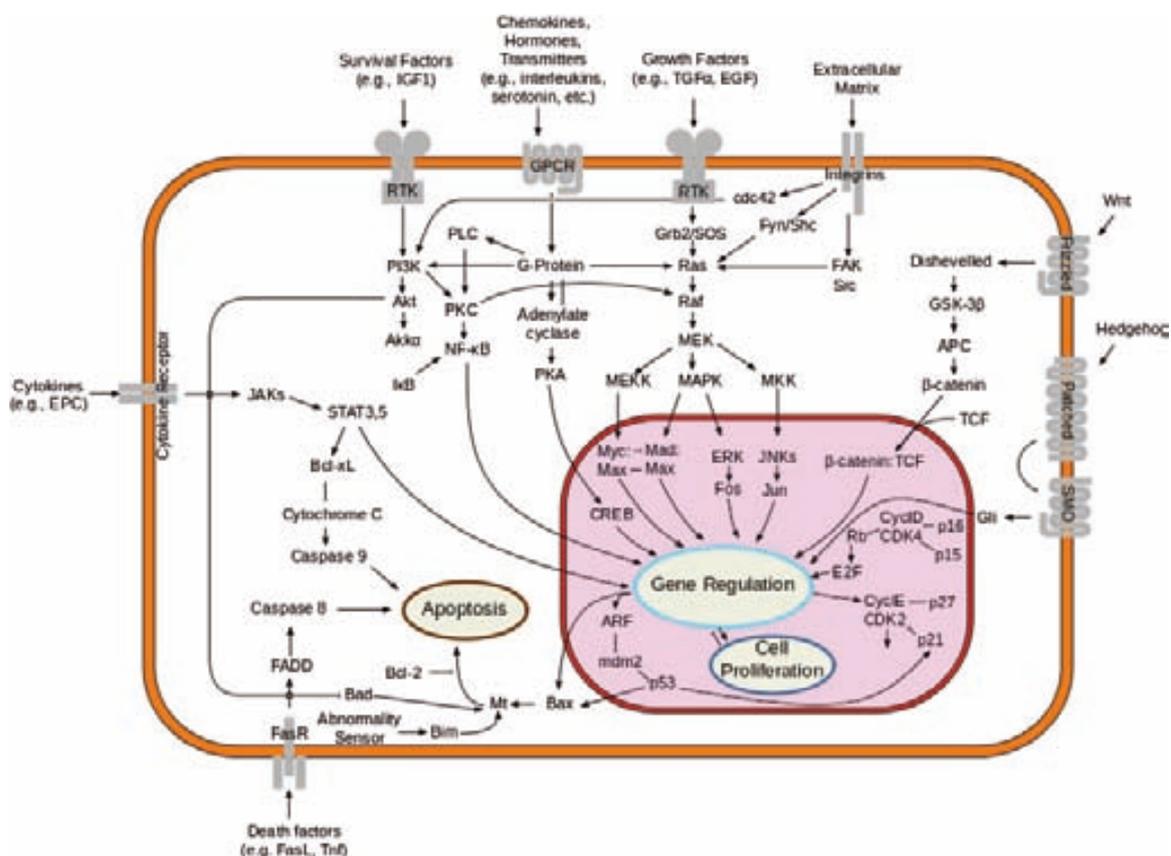


Figura 3: Circuitos celulares. Vías de señalización, regulación de ciclo celular y apoptosis. [14]

2. VIRUS DE EPSTEIN BARR

2.1. Infección y patrones de latencia

El virus de Epstein Barr (VEB) es un herpesvirus humano de la subfamilia de los *gammaherpesviridae*. Es un virus de doble cadena de ADN que comprende aproximadamente 170 kilobases y que codifican más de 85 genes [15, 16].

La infección por VEB suele ser asintomática y ocurrir en la infancia; cuando ocurre de forma más tardía, en la adolescencia, puede dar lugar a un trastorno linfoproliferativo benigno y transitorio que será el responsable del cuadro clínico conocido como mononucleosis infecciosa (MI).

Es un virus linfotrópico que se transmite por la saliva y que infecta al 90% de la población mundial. [17]

El ciclo vital del VEB es bifásico, al igual que otros herpes virus, pudiendo establecer infecciones latentes (persistentes) y replicativas (productivas, líticas). Durante la fase replicativa existirá una extensa transcripción del genoma vírico, con una amplia expresión de proteínas víricas. En cambio su expresión será muy restringida durante la fase de latencia. [18]

Tras la primoinfección inicial en los órganos linfoides orofaríngeos, el virus se establecerá en forma de infección latente y de forma indefinida en los linfocitos B de memoria, en forma de episoma (ADN circular), integrándose su ADN en el núcleo de la célula infectada. Posteriormente realizará episodios de reactivación, con replications líticas episódicas en las células B y en las células epiteliales, mecanismo esencial para su diseminación célula a célula y huésped a huésped.[19, 20]

Se han establecido diferentes patrones de expresión del material genético del VEB.

En la fase de infección latente manifiesta el **patrón III de latencia**, o programa de crecimiento. Este programa engloba la expresión de seis antígenos nucleares del VEB (EBNA-1, EBNA-2, EBNA-LP, EBNA-3A, EBNA-3B Y EBNA-3C), tres proteínas de membrana latentes (LMP-1, LMP-2A y LMP-2B), dos pequeños RNAs no codificantes (EBER-1 y EBER-2), y los transcriptos de la región BamH1A [21].

Este patrón se asocia con la transformación de la células B (inmortalización) mediante Pax 5, que actúa como activador específico de la transcripción de células B. Así, las células B naïve infectadas entran en el centro germinal, donde proliferan y se expanden clonalmente, aumentando por tanto el pool de célula infectadas por VEB.

Posteriormente adoptarán el **patrón de latencia II** (programa por defecto), que se caracteriza por expresar únicamente EBNA1, LMP-1, LMP-2A, LMP-2B, EBER-1 y EBER-2.

Por último el virus entra en fase totalmente latente, permaneciendo en los linfocitos B de memoria, con disminución muy importante de su expresión proteica, siendo únicamente LMP-2A la proteína expresada. [22, 23]

Únicamente cuando éstos se dividen expresará EBNA-1, permitiendo al genoma viral replicarse conjuntamente con el de su huésped. Es lo que algunos consideran el **tipo I de latencia**. [24] (Figura 4).

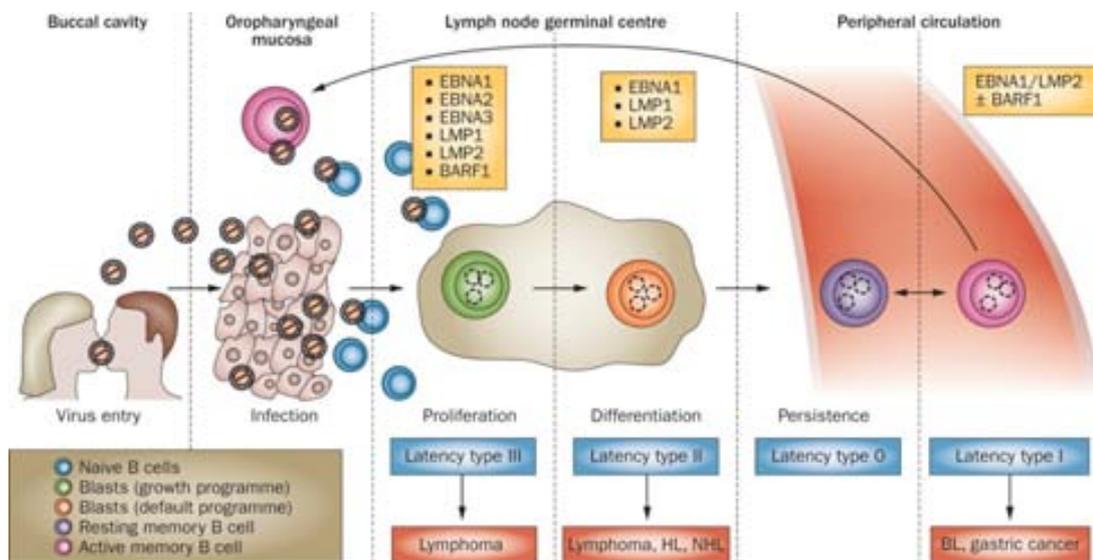


Figura 4: Latencia del VEB y tumores asociados [25]

El VEB se ha relacionado con el desarrollo de neoplasias malignas de células B y de células epiteliales. Estas incluyen al linfoma de Burkitt, carcinoma nasofaríngeo, Linfoma de Hodgkin, así como cánceres en pacientes inmunocomprometidos, como en la enfermedad linfoproliferativa post trasplante, linfoma asociado a SIDA, carcinoma gástrico. [26-29]

Estos tumores presentarán diferentes patrones de latencia, que de alguna forma aun no bien establecida, podrían explicar la relación entre el VEB y dichos tumores. Así por ejemplo, en el caso del linfoma inmunoblástico, el VEB presenta un patrón de latencia III, en cambio presentará patrón de latencia II en el carcinoma nasofaríngeo, en los linfomas de célula T y en el linfoma de Hodgkin y patrón de latencia I cuando se asocia al linfoma de Burkitt, asemejándose al patrón que presentan los linfocitos B de memoria. [30-35]

Los genes del VEB y las funciones que en la actualidad se les reconocen, son los siguientes: [21, 36]

- **EBNA-1** es el responsable del mantenimiento del genoma, se une al episoma y provoca la replicación del DNA viral. También desempeña un papel a nivel de la regulación de la transcripción de las otras proteínas latentes nucleares. Además puede provocar por un lado la disminución de la protein-tirosin fosfatasa-Kappa, que es un gen supresor tumoral, así como el aumento de CCL20 que provocará un efecto de atracción al microambiente de células T reguladoras (Treg). [19, 37]
- **EBNA 2 y 3** son reguladores transcripcionales. EBNA-2 puede activar a algunos genes virales, como LMP1 Y LMP2. EBNA-3 también pueden jugar un papel a nivel de la transformación de las células B, y concretamente EBNA-3C permite escapar a los puntos de control del ciclo celular. [35]

- **LMP-1** es el mayor efector de cambio celular, la principal proteína oncogénica del VEB. Puede imitar o actuar como un receptor CD40 activo, vía de señalización que mediante la vía TRAF activará a NF- κ B. La activación de esta vía de señalización provocará la inhibición de la apoptosis, mediante la sobreexpresión de bcl-2 y de otros genes. También puede mediar en la activación de otras vías de señalización como AP1 (mediante JNK/c-Jun), ATF2 (mediante p38/MAPK), y en la activación de la vía Jak-STAT. Mediante la activación de estas vías de señalización provocará un cambio en la expresión génica del VEB. [21, 34, 38-40]
- **LMP-2A** es una proteína que tiene la capacidad de puede sustituir la función de BCR, por lo que las células precursoras B infectadas por el VEB que expresan LMP2A podrían sobrevivir sin BCR. Además puede activar la vía Notch, provocando la alteración de los niveles de factores de transcripción E2A y EBF, y favorecer la expresión de genes asociados con la inducción del ciclo celular y la inhibición de la apoptosis. (Ki67, ciclina A, PCNA, bcl-xl, survivina). Por último, puede desempeñar también un papel importante en la disminución de la expresión de marcadores de célula B [41-43].
- **LMP-2B**: su función es insuficientemente conocida
- **EBER 1 y 2**: pueden desempeñar algún papel patogénico en el linfoma de Burkitt. Trabajos recientes sugieren que podría actuar suprimiendo la transcripción de p21cip/waf y aumentando la resistencia a la apoptosis mediante la acción inhibitoria sobre p53, EGR1. Este mecanismo podría ser un evento de gran importancia en el desarrollo de estos linfomas.[44]
- **BARTs**: su función, así como la de los miRNA aun está por definir. [45]

Así, LMP1 y LMP2A, mediante CD40 y BCR respectivamente, contribuyen a la selección y supervivencia de las células B del centro germinal infectadas por el VEB, además de la ya explicada contribución a la pérdida de expresión de fenotipo B en las células HRS VEB positivas. [46, 47] (Figura 5).

2.2. Detección de marcadores del VEB en los tejidos

2.2.1. Detección de antígenos víricos (técnicas inmunohistoquímicas)

La demostración *in situ* de antígenos codificados por el VEB en las células linfoides proporciona una suficiente evidencia de la infección vírica. Las técnicas iniciales de inmunofluorescencia fueron dirigidas a la detección de EBNA-1, dado que este antígeno se expresaba en todas las formas de infección del VEB. Posteriormente se pasó a la determinación de EBNA-2 y de LMP-1 también por técnicas inmunohistoquímicas (IH) mediante anticuerpos monoclonales, como PE2 para EBNA-2 y S12 y CS.1-4 para LMP-1. Son técnicas de realización prácticamente universal, bien estandarizadas y de alta seguridad. [48, 49]

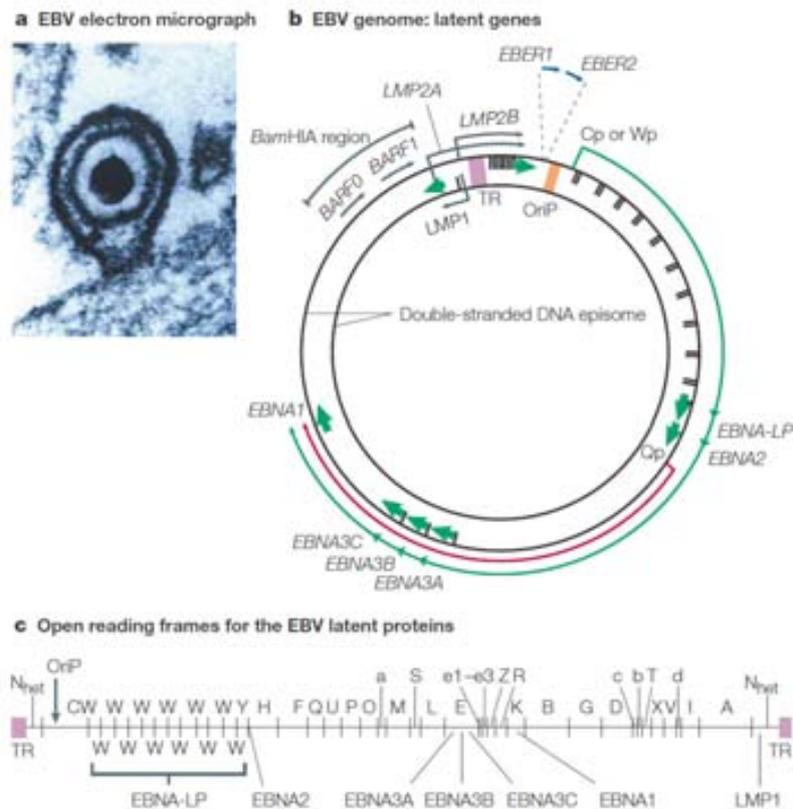


Figura 5: genoma del virus Epstein Barr[35]

LMP-1 da una alta señal localizada en el citoplasma y en la membrana celular. Es una técnica rápida y que puede dar falsos negativos si la preparación de la muestra no es correcta y el tejido no está bien fijado. También se debe tener en cuenta el riesgo de falsos positivos que puede darse al marcar a los eosinófilos y las células plasmáticas, aunque raramente se expresa en linfocitos del microambiente tumoral. [11, 18, 50-52]

2.2.2. Detección de ácidos nucleicos

- Hibridación basada en filtros: se puede detectar DNA y RNA del VEB en tejidos purificados extraídos por técnicas de Dot-blot y Southern blot y por Northern blotting respectivamente. Estas determinaciones deben realizarse preferentemente en tejido fresco o congelado. La técnica de Southern blot de las regiones terminales del genoma nos puede suministrar información referente a la clonalidad del virus y la fase de latencia en la que se encuentra (fase latente o fase replicativa). [53]
- Técnicas de reacción de polimerasa en cadena (PCR): mediante la utilización de diferentes primers, o secuencias promotoras, detectaremos ADN del VEB. Esta técnica puede realizarse tanto en tejido fresco como en tejido parafinado. Tiene una alta o muy alta sensibilidad que permitirá, en función de las condiciones de amplificación, detectar señal del VEB en linfocitos infectados no neoplásicos, por lo que una determinación positiva de PCR para VEB debe ser interpretada con precaución por el riesgo de que sea un falso positivo. Por lo tanto siempre es recomendable que ésta técnica se realice conjuntamente con las técnicas in situ (detección de antígenos o

hibridación), pues permiten identificar la localización celular de la señal positiva de la técnica de PCR. [51, 54]

También pueden realizarse técnicas de RT-PCR (reverse transcription polymerase chain reaction) para detectar transcritos RNA del VEB, que será de utilidad para analizar el patrón de expresión genético del VEB. Ambas técnicas pueden realizarse en células aisladas extraídas del tejido tumoral por técnicas de micromanipulación. Una tercera opción sería la amplificación secuenciada de ácidos nucleicos (NASBA).[30]

- *Hibridación in situ* (ISH): la identificación del origen celular de ácidos nucleicos virales requiere del uso de técnicas de ISH. Los transcritos de EBER son tan abundantes en la infección latente que aportan una gran sensibilidad a la técnica, incluso en muestra en parafina. Esta técnica combina las ventajas de ISH (buena morfología y conservación de la integridad tisular) con una sensibilidad comparable a las técnicas de PCR, proporcionando por lo tanto una diana excelente para la detección y la localización de las células infectadas por el VEB. No obstante no esta exenta de riesgo de falsos positivos (infección de algunos linfocitos B, reacción cruzada con mucina, levaduras o materiales vegetales), o de falsos negativos debidos a degradación del RNA [55] (Figura 6).

2.2.3. Guías para el diagnóstico de la infección por el VEB en el LHc

En la actualidad no existen unas guías de consenso para el diagnóstico de la infección por el VEB. Existe una gran variabilidad en las técnicas utilizadas por los diferentes grupos investigadores, en la preparación de las muestras, en los anticuerpos utilizados, existe un sesgo atribuible a la interpretación que los patólogos hacen de una muestra, etc.

No obstante, entre los años 1990 y 2000 estas técnicas mejoraron y se estandarizaron, y progresivamente la detección de EBER mediante HIS y de LMP-1 mediante IH se fueron estableciendo como las dos técnicas de elección.

Pese a esta tendencia casi universal, no existían trabajos que comparasen o analizaran la seguridad de las mismas, únicamente algunos grupos referían que en sus trabajos observaban una coincidencia prácticamente total en los resultados obtenidos con ambas técnicas. [56, 57] Por este motivo, el grupo de Glaser y Gulley intentó analizar la fiabilidad y seguridad del diagnóstico mediante EBER y LMP-1. Inicialmente realizaron un trabajo en el que evaluaban el grado de acuerdo que existía entre diferentes investigadores al revisar muestras, y observaron que el consenso de interpretación se consideró fácil en un 70% de los casos, intermedio en el 24% de los casos y difícil en un 7% (resultados muy similares para EBER y LMP-1). En este mismo trabajo elaboraron unas guías con recomendaciones para estandarizar la preparación e interpretación de estas técnicas. [58]

Posteriormente realizaron un nuevo trabajo que evaluaba la fiabilidad de los diagnósticos analizando el grado de concordancia en la detección del VEB cuando un mismo investigador la realizaba en momentos diferentes, concordancia entre diferentes investigadores, y el grado de acuerdo entre ambas técnicas. Se consideró que el acuerdo fue entre bueno y muy bueno, con índices Kappa globales de entre 0.60 y 0.78, aunque en función del subtipo

histológico, de si el tumor era VEB positivo o VEB negativo, de la preparación realizada etc. estos índices podían variar considerablemente (alcanzando a valores Kappa de 0,47). Así, concluyen de nuevo que pese a que el grado de acuerdo entre ambas técnicas fue bueno, la comparación entre los resultados obtenidos por los diferentes estudios existentes debe realizarse con precaución.[59]

En cuanto a la utilización de las técnicas de detección de ADN mediante PCR, dado que no son capaces de localizar al VEB, se considera que tienen un riesgo considerable de detectar dicho ADN en linfocitos “inocentes” y no en las células tumorales, es decir, de presentar falsos positivos, por lo que su uso ha ido disminuyendo progresivamente. No obstante, algunos grupos, incluso trabajos recientes, insisten en su utilidad y fiabilidad si son realizadas de forma correcta. [51, 54]

En este caso la dificultad en la interpretación de los resultados se debe a la existencia de diferentes secuencias promotoras del DNA del VEB a estudiar. Cada grupo puede utilizar una o varias de estas sondas, lo que dificultara en gran manera la comparación de los resultados de los diferentes trabajos.

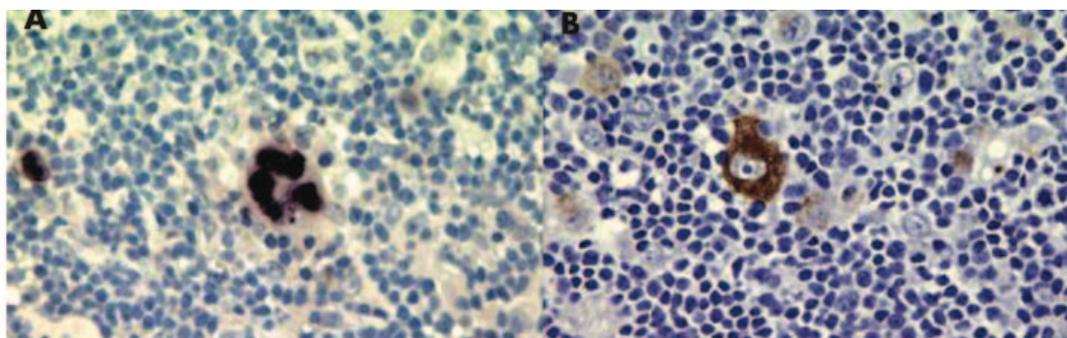


Figura 6: A: Expresión de EBER en el núcleo de célula HRS por ISH. B: Expresión de LMP-1 en la membrana y en el citoplasma de célula HRS VEB+. [60]

2.2.4. Detección de ADN del VEB en suero

Diversos grupos han investigado la detección de ADN del VEB en suero de pacientes afectados de LHc. La identificación de idénticos reordenamientos de inmunoglobulinas en las biopsias y en las muestras de suero demuestran que puede detectarse ADN de las células HRS en sangre periférica mediante técnicas de PCR convencional y cuantitativa. Además, en estudios realizados en niños y adultos afectados de LHc, se ha observado correlación entre carga vírica en suero y/o plasma y respuesta terapéutica, tanto si entran en remisión, con significativa reducción de la carga hasta niveles indetectables, como en casos de mala respuesta o recaída, en los que se observa un rápido incremento de los niveles de ADN en sangre.[61-63]

3. LINFOMA DE HODGKIN CLÁSICO (LHc)

La enfermedad de Hodgkin fue descrita por primera vez en 1832 por Thomas Hodgkin, quien refiere el aspecto post-mortem de siete pacientes que presentaban adenopatías y bazo aumentadas de tamaño.[35] No fue hasta 1900 cuando las células que caracterizan esta entidad fueron descritas por Dorothy Reed y Carl Sternberg[64]. En el año 2001 la World Health Organization (WHO) Lymphoma Classification System designo a la enfermedad de Hodgkin como “Hodgkin Lymphoma”, y lo subdividió en dos tipos, el linfoma de Hodgkin clásico (LHc), y el linfoma de Hodgkin de predominio linfocítico nodular (LHPLN). [65] (Tabla 1)

Jackson & Parker 1944/1947	Rye Conference 1966	WHO 2008	Freq.
Paragranuloma	Lymphocytic predominance	Nodular lymphocyte predominant	≈5%
		Lymphocyte rich	≈5%
Granuloma	Nodular sclerosis	Nodular sclerosis	≈70%
	Mixed cellularity	Mixed cellularity	≈20%
Sarcoma	Lymphocytic depletion	Lymphocyte depleted	<1%

Tabla 1. Clasificaciones históricas y actual del LHc [66]

Se trata de una entidad que presenta unos rasgos clínicos, epidemiológicos y biológicos únicos, por lo que históricamente ha sido objeto de atención por parte de clínicos, patólogos e investigadores. [64]

MacMahon es una figura capital en el estudio del LHc, pues estableció la hipótesis de la causa infecciosa. Su teoría nace a partir de las observaciones de Correa y O’Conor y aplicando los conocimientos que existían gracias al modelo de la polio. Se fundamentaba en la existencia de criterios clínicos (fiebre cíclica con sudoración nocturna), criterios morfológicos (abundante celularidad reactiva que rodeaba a las células malignas) y en datos epidemiológicos (curva bimodal de edad de presentación, diferente edad de presentación en función de criterios geográficos y en función de la clase social, etc.). [67]

MacMahon propuso el paradigma de las “tres enfermedades”, consistente en que el LHc no era una única enfermedad, sino que en realidad se trataba de diferentes enfermedades con distintas etiologías que podían ser definidas a partir de la edad de diagnóstico, estableciendo 3 grupos: 0-14 años, 15-34 años y mayores de 50 años.[68] (Tabla 2)

Posteriormente, ya en 1994, el grupo de Armstrong A, Alexander G y Jarret R (grupo muy activo en el campo de la investigación en LHc y su relación con el VEB) reformulan en modelo de MacMahon planteando que en realidad existirían “4 modelos de LHc” [69, 70] (Figura 7)

Enfermedad	Edad	Subtipo histológico	Sexo	Características
LHc asociado a VEB en niños	<10 años	CM=EN	Hombres> mujeres	Más frecuente en países sub-desarrollados
				Infección temprana, afectación inmunidad
LHc en adulto joven asociado a VEB	15-34 años	Predominantemente CM	Hombres=mujeres	Más frecuente en países desarrollados
				Exposición retrasada al VEB (mononucleosis infecc)
LHc edad avanzada asociado a VEB	>50 años	CM=EN	Hombres>mujeres	Probablemente asociado a inmunosupresión, reactivación del VEB
				Probablemente peor pronóstico que cHL VEB-
LHc no asociado VEB	15-24 años	Predom EN	Hombres=mujeres	Países desarrollados
				Baja exposición a patógenos en infancia

Tabla 2 Modelo de las 4 enfermedades [71]

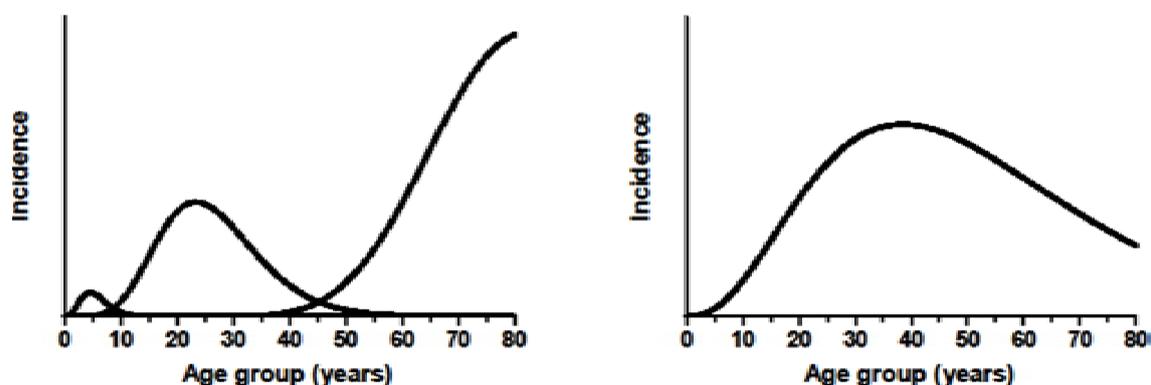


Figura 7. Incidencia de LHc según el modelo de las 4 enfermedades. LHc asociado al VEB (izquierda), LHc no asociado al VEB (derecha) [66]

Estos paradigmas se mantienen vigentes como un modelo teórico de lo que puede ser esta enfermedad y que podría explicar sus diferentes comportamientos.

No obstante, se han llevado a cabo algunos trabajos que analizaban el LHc en esos grupos de edad, con un número considerable de pacientes, y que no han conseguido observar las diferencias esperables en función de la presencia del VEB en cuanto a forma de presentación, supervivencia etc. De hecho en la actualidad se acepta, a la vista de los resultados realizados, que las diferentes poblaciones presentan variaciones de estos patrones teóricos, llegando incluso a no presentarse siempre la clásica incidencia bimodal. [57, 72-74]

Así, en la actualidad se considera que en su patogenia probablemente convergen factores infecciosos, déficits inmunológicos y susceptibilidad genética. [75]

3.1. Epidemiología descriptiva

El LH supone el 11% de los linfomas en los países occidentales, 15% si nos referimos a adultos jóvenes (15-24 años). Su incidencia en base a los registros europeos y norteamericanos es de 2.3-3.1 casos/100.000 habitantes/año en sexo masculino y 1.6-2.3 casos/100.000 habitantes/año en sexo femenino. Habitualmente presenta una curva de incidencia bimodal con dos picos de edad: un pico en adultos jóvenes y un segundo pico a partir de los 50 años. (Figura 8)

Es un tumor que presenta una variación racial, con las mayores tasas en raza blanca seguida de hispanos y afroamericanos siendo en asiáticos donde se detecta menor incidencia. [76]

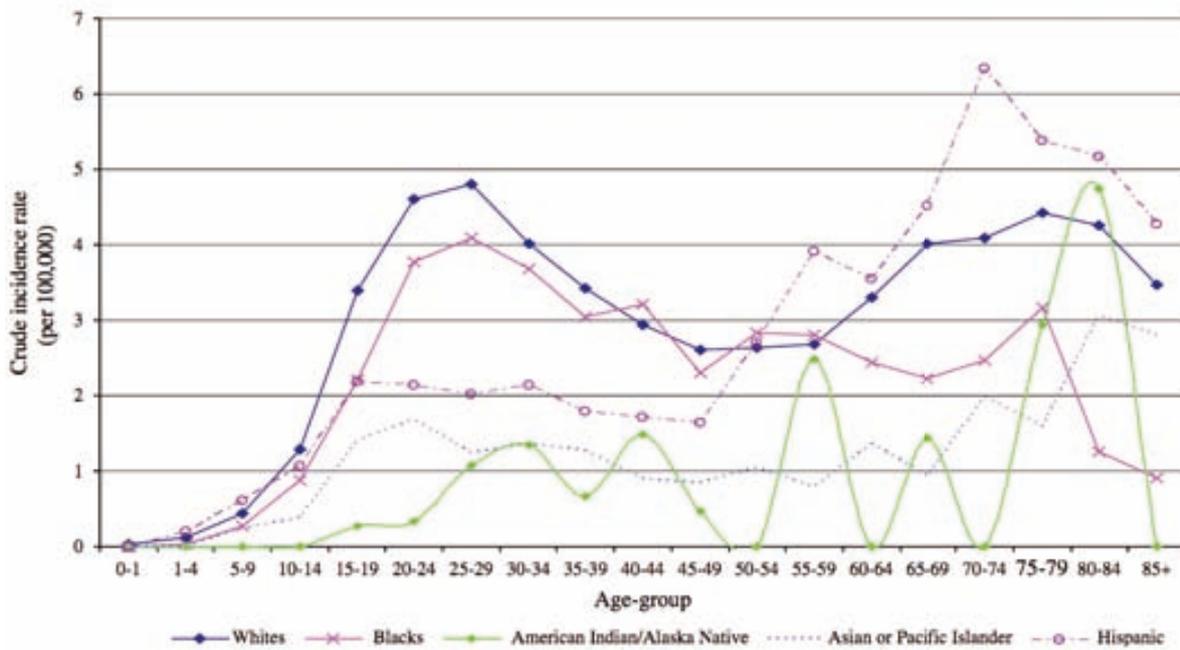


Figura 8: Curvas de incidencia de LHc en EEUU 1994-2003.[64]

Existen numerosos trabajos que demuestran que en la patogénesis del LHc deben estar implicados e interrelacionados factores genéticos, ambientales y relacionados con el estilo de vida. Uno de ellos sería el trabajo realizado en British Columbia, Canadá, entre inmigrantes chinos. Este trabajo demostró que la incidencia de LHc en estos pacientes era mayor que en su población de origen (Hong Kong), pero menor que en la población general de Columbia. [77]

En los últimos años, gracias a los avances en estadiaje y tratamiento se han conseguido importantes mejoras en la supervivencia de estos pacientes, con supervivencias globales a cinco años del 60-70%. Podemos diferenciar dos grupos de edad, pacientes de menos de 50 años que presentarían actualmente supervivencias de alrededor del 85-90%, y pacientes mayores de 50 años que presentarían supervivencias del 50-60%. Es conocido que la edad avanzada es un factor predictivo independiente de mal pronóstico, incluso tras ajustar por subtipo histológico, estadio al diagnóstico, síntomas B o tratamiento realizado. [64, 78]

Como ya hemos visto es un tumor que presenta una curva de incidencia bimodal (en ocasiones trimodal), y que además es diferente entre países desarrollados y subdesarrollados. Correa y O'Connor, en 1971, definieron la existencia de tres patrones epidemiológicos:

- El patrón I, propio de países subdesarrollados y de grupos de bajo nivel socioeconómico, con dos picos de incidencia, el primero en niños y predominantemente de sexo masculino, y el segundo a partir de los 50 años y con predominio del subtipo histológico celularidad mixta (CM).
- El patrón III, propio de países desarrollados y grupos de nivel socioeconómico alto, se caracteriza por baja incidencia en niños, un pronunciado pico de incidencia en adultos jóvenes, con predominio del subtipo histológico esclerosis nodular (EN), y posterior nuevo aumento de la incidencia a partir de los 50 años.
- Por último, el patrón II, propio de países en vías de desarrollo o economías en transición, sería un patrón intermedio, con dos picos de edad, infantil y adultos jóvenes, e igual frecuencia de casos de subtipos histológicos EN o CM. [67] (Figura 9)

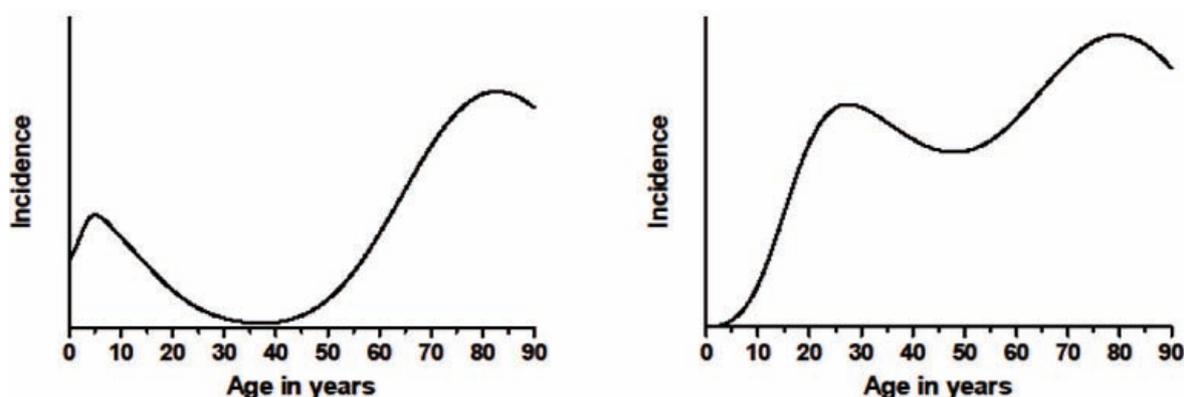


Figura 9: Incidencia de LHC en países en vías de desarrollo (izquierda) y países desarrollados (derecha) [66]

3.2. Histopatología

El LHC es una neoplasia del sistema linfopoyético única desde el punto de vista clínico-patológico. Se caracteriza por una disrupción de la arquitectura normal de los ganglios linfáticos, con una presencia minoritaria de las células características de esta entidad (1-2% del total): unas células grandes y mononucleadas (células de Hodgkin) y otras multinucleadas (células de Reed Sternberg), en medio de un infiltrado inflamatorio no neoplásico compuesto por linfocitos maduros, células plasmáticas y eosinófilos. A las células citadas se les llama de forma conjunta células de Hodgkin y Reed Sternberg (HRS). [79]

Se diferencian 4 subtipos histológicos dentro del LHC: Esclerosis Nodular (EN), que supone aproximadamente el 65% de los casos, Celularidad Mixta (CM), con un 35% de los casos, y Predominio Linfocítico (PL) y Depleción linfocítica (DL) que en conjunto suponen únicamente un 5% del total. Cuando la histología es indeterminada entre los subtipos EN y CM se denomina subtipo interfolicular (IF)[80] Esta clasificación fue confirmada en la última clasificación WHO.[81, 82]

El NLPHL, pese a su baja frecuencia, un 5% del total de los LH, se considera una entidad diferente del LHc, dado que presentan diferencias en aspectos morfológicos, inmunofenotípicos y del microambiente que las rodea. Las células tumorales, que en el LHc como hemos visto son las células HRS, en la variante NLPHL son llamadas actualmente *LP cells (lymphocyte predominant)*, anteriormente llamadas *L&H cells (lymphocytic and histiocytic cells)*. A nivel inmunofenotípico las células neoplásicas de NLPHL presentan un fenotipo BCL6+/CD138-, típico de células de centro germinal, y en cambio LHc es una entidad heterogénea, pues algunas células también son BCL6+/CD138- pero otras presentan inmunofenotipo BCL6-/CD138+, propio de célula B de centro postgerminal e incluso existen casos excepcionales de LHc originarios de células T. Por último, el NLPHL no se asocia al VEB. [83-85] [86, 87].[88-90][91]

Por todo ello nuestro estudio se centrará únicamente en el LHc.

3.3. Biología molecular del LHc

Las células tumorales generalmente retienen los rasgos fenotípicos más característicos de la célula normal de la que se originan. Las células HRS derivan de células B maduras, pero debido a un proceso de reprogramación pierden los marcadores de célula B y además expresa marcadores aberrantes de diferentes células hematopoyéticas. Este fenómeno hace que las células HRS presenten un inmunofenotipo único, diferente de cualquier otra célula del sistema hematopoyético y de cualquier otra célula tumoral. [92]

Además éstas células presentarán una activación anómala de diferentes vías de señalización y de factores de transcripción. La activación de estas vías y factores es secundaria a lesiones genéticas y epigenéticas y a la interacción de las propias células HRS con microambiente en el que se encuentran, y tienen un papel muy importante tanto en la patogénesis del LHc como en la progresión de la enfermedad. [55]

3.3.1. Origen de la célula HRS. Pérdida de fenotipo de célula B

En la actualidad existen pruebas suficientes que demuestran que las células HRS derivan de células B de centro germinal.

Las células B del centro germinal son células B maduras que han sido activadas por antígenos, mediante la unión de los mismos al receptor de la célula B (BCR) y que están implicadas en la respuesta inmune dependiente de células T. Esta activación provocará la migración de las células B al interior de los folículos y su vigorosa proliferación.[92]

Esta proliferación normal de las células B del centro germinal se caracteriza por un proceso de hipermutación somática, en el que se generan múltiples mutaciones, deleciones y duplicaciones, especialmente en los genes de la región variable de las cadenas ligeras y pesadas de las inmunoglobulinas (Ig V genes). Muchas de ellas, como por ejemplo la pérdida de BCR funcional, en condiciones normales provocarán la apoptosis de estas células mutadas. [93, 94]

El escaso número de células tumorales en el LHc y las características excepcionales de las mismas motivó que durante largo tiempo no se conociese su origen. No obstante,

en la actualidad se considera probado que estas células provienen de células B del centro germinal. [92]

El dato más importante y definitivo fue la demostración de que las células HRS presentaban en la mayoría de casos múltiples mutaciones somáticas y reordenamientos clonales a nivel de las cadenas pesadas y ligeras de las Ig, 25% de ellas en la región V. [47, 86, 95, 96]

Así, se considera que las células HRS derivan de células B de centro germinal preapoptóticas, células dañadas que adquieren mutaciones somáticas desfavorables pero que consiguen escapar a la apoptosis gracias a un proceso de reprogramación de su expresión génica. En éste proceso éstas células pierden la expresión de la mayoría de los genes típicos de célula B (pérdida de CD20, CD19, CD79, Ig de superficie, y factores de transcripción OCT2, BOB1, PU1), y adquieren expresión de múltiples genes típicos de otras células del sistema inmune, que también contribuirán a la baja expresión de genes de célula B. [97, 98] Esto hace que las células HRS presenten un inmunofenotipo tan inusual, con marcadores de diferentes líneas hematopoyéticas, como marcadores de células T (CD3, NOTCH1, GATA3), células citotóxicas (granzima B, perforinas), células B (Pax5, CD20), células dendríticas (fascina, CCL17), células NK (ID2), células mieloides (CSFR1) y granulocitos (CD15). Las células HRS siempre expresan el marcador de activación CD30. [92, 95, 99-102]. La supervivencia de las células HRS a la apoptosis es tal vez el punto clave en la oncogénesis del LHc. [47]

Actualmente se conocen múltiples factores que conducen a esta reprogramación fenotípica, que revisaremos a continuación.

Algunos factores de transcripción claves que regulan la expresión de muchos genes específicos de las células B no se expresan, o lo hacen a niveles muy reducidos. Esto incluye como se ha comentado anteriormente a *Oct-2*, *Pu.1*, *Bob1* y el early B cell factor (*EBF*). [100, 103-105]

Los factores de transcripción *E12* y *E47*, codificados por el gen TCF3 (*E2A*), pese a que se expresan en las células HRS, están inhibidos por la potente expresión de sus inhibidores ID2 y ABF1. [100, 106, 107]

Pax 5, factor de transcripción específico de células B, pese a que se expresa en las células HRS, está funcionalmente afectado, por lo que existe una disminución de la expresión de los genes a los que regula. Posiblemente la ausencia o disfunción de otros factores de transcripción de células B podría contribuir a la disfunción del propio Pax 5. [108]

El factor de transcripción de células *T Notch1* es otro regulador negativo de células B que está altamente expresado en las células HRS, y que además promueve la degradación de *E2A* y la inhibición de Pax 5. [109] Se ha observado que la sobreexpresión de *Notch1* es en parte debida a la acción estimuladora de *Hagged1*, producida por las células que rodean a las células HRS. [110, 111]

Otro factor de transcripción que recientemente se ha implicado a ese nivel es *STAT5*, dado que se ha visto que cuando está activo puede contribuir a muchos de los cambios fenotípicos y de expresión génica observados en las células HRS. [112]

Por último, como hemos citado antes, existen algunos casos excepcionales de LHc en los que se ha demostrado la expresión de marcadores de células T. Algunos trabajos experimentales sugerirán que las células HRS, sean originarias de células B o T, adquieren un programa genético similar tras sufrir su transformación maligna. [88, 113]

3.3.2. Activación de la vía de transcripción NF-κB

El NF-κB es un complejo proteico constituido por una familia de factores de transcripción que juega un papel central en numerosos procesos celulares, generalmente relacionados con procesos de proliferación celular, supervivencia celular, apoptosis y procesos inflamatorios. Está constituida por 5 miembros, Rel, RelA (p65), RelB, p50 y p52.

En ausencia de estímulos, NF-κB se mantiene en estado inactivo en el citoplasma unido a sus proteínas inhibidoras IκB alfa, beta y épsilon.

La vía NF-κB es activada por diferentes receptores celulares, como TNF, provocando la activación de IκB quinasa (IKK), que degradarán a las IκB, provocando la liberación del complejo NF-κB, que podrá translocarse al núcleo y activar múltiples dianas génicas. [114-116]

Las células HRS muestran una activación constitutiva de la vía de transcripción NF-κB, tanto de su vía clásica como de su vía alternativa, y éste es probablemente otro de los mecanismos clave en la supervivencia de las células HRS y en la patogénesis del LHC. [117]

La activación de esta vía se produce por diferentes mecanismo. Puede por una parte producirse gracias a la sobreexpresión de receptores de TNF en las células HRS, como CD40, CD30, CD95, RANK.[118, 119]

Por otro lado también puede ser debida a lesiones genéticas que afectan a la propia vía de señalización NF-κB. Actualmente se conocen múltiples lesiones genéticas en esta vía, como ganancias o amplificaciones del gen *REL* que codifica para uno de los factores NF-κB, inactivación del gen *NFκBIA* que codifica para IκB alfa (principal inhibidor de la vía clásica de NF-κB), inactivación de *NFκBIE* (que codifica para el factor inhibidor IκBE) o inactivación del gen supresor tumoral *TNFAIP3* que en condiciones normales codifica para A20 provocando la inhibición de la vía NF-κB e induciendo la apoptosis mediada por TNF. [120, 121] (Figura 10)

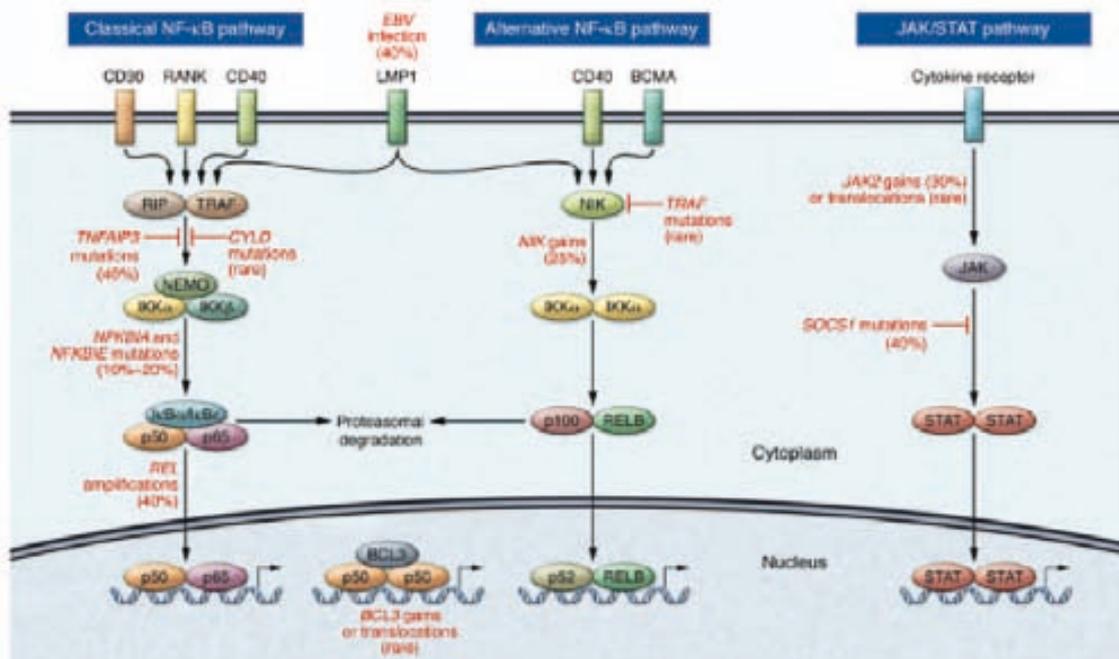


Figura 10: vía de señalización NF-κB (clásica y alterna) y vía Jak/Stat. [55]

Los trabajos que han identificado estas mutaciones refieren frecuencias de entre el 20 y el 70% en los casos de LHc estudiados. No obstante, no existe información referente a que ocurran más de una de estas lesiones. Cabe la posibilidad de que sea necesaria la coexistencia de dos o más de estas lesiones para que se produzca la fuerte actividad que presenta esta vía en el LHc. [100, 117-119]

Otra vía de señalización que presenta alteraciones importantes es la vía de señalización *Jak-Stat*, postulándose que también contribuye de forma fundamental a la proliferación y a la resistencia a la apoptosis de las células HRS. Se han observado un aumento importante de las citoquinas que pueden inducir la activación de la vía, así como altos niveles de STAT3, STAT5 y STAT6 fosforiladas en las células HRS.[122] También se han observado lesiones genéticas que afectan a esta vía, como serían mutaciones inactivadoras de SOCS1, el principal inhibidor de esta vía, o ganancias o amplificaciones de JAK2.[92, 123, 124]. Recientemente se ha descrito que JAK2 se encuentra en la región cromosómica 9p24, donde se encuentran 3 genes más (PD1, PD-L1 y PDL2) que podrían también contribuir al escape de las células HRS de la apoptosis. Así, una única lesión genética, la ganancia de 9p24, podría implicar a al menos 4 genes patológicamente relevantes. [125]

Otras vías de señalización que se han detectado como disreguladas y constitutivamente activas en las HRS serían la *PI3K-Akt*, la vía *Erk*, AP1 y *multiple receptor tyrosine kinases* (MAPK-MED-ERK)[126-131]

3.3.3. Disregulación de expresión de los microRNA

En la actualidad existe un interés creciente en referencia al papel de los *small non coding RNAs* (microRNAs) en el desarrollo del LHc. Se han detectado múltiples cambios epigenéticos en las células HRS, y la pregunta ahora es a que son debidos, y cómo y en que medida estas alteraciones se asocian con expresión alterada de reguladores de la metilación del DNA y/o de las histonas. Se ha detectado disregulación del grupo de proteínas polycomb(PcG), silenciamiento de genes supresores tumorales como CDKN2C (p18-INK4c), CHEK2, RASSF1A, KLF4, silenciamiento de genes de célula B como CD79B, BOB1 y SYK, etc. [110, 132-135]

3.3.4. Interacción entre células HRS y microambiente

El microambiente que rodea a las células HRS es único entre los linfomas, tanto por su complejidad celular (linfocitos T CD4 y CD8, células B, células plasmáticas, eosinófilos, fibroblastos, macrófagos, mastocitos, neutrófilos) como por su representatividad, dado que supone el 98% de la celularidad del LHc.

Este microambiente es vital para la iniciación y progresión de las células tumorales. Las células HRS atraen a estas células mediante secreción de citocinas y quimiocinas. [136-143]. Esto lo demuestra el hecho de la dificultad para conseguir el crecimiento de las células HRS en cultivos o en ratones de experimentación inmunodeficientes, o de detectarlas en sangre periférica. [144]

Este microambiente, a su vez, promovería la supervivencia de las células HRS y las ayudaría a escapar de la citotoxicidad por células T o células NK. Numerosas asociaciones se han

demostrado ya, siendo especialmente importante la interacción con las células T. Las células T son la principal población celular infiltrante en este tumor y las que están en contacto más próximo con las células HRS. Estas células T se unirán mediante sus ligandos CD40L y CD28 a los ligandos CD40 y CD86 de las células HRS y su unión provocará la estimulación de la vía NF- κ B y la inhibición de células T citotóxicas y de células NK mediante células Treg y por las propias células HRS. [140, 141, 145-148] [102, 149] (Figura 11)

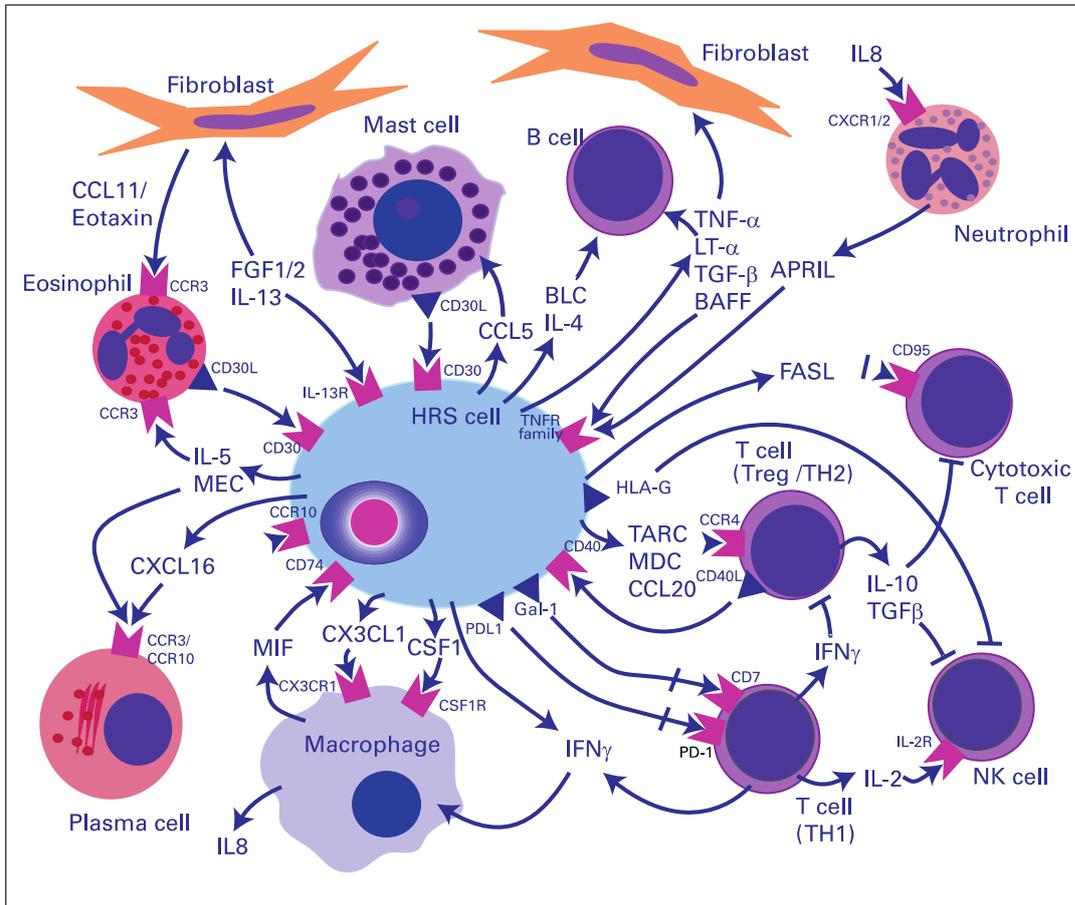


Figura 11: Interacciones entre las células HRS y el microambiente [149]

En resumen, las células HRS derivan de células B del centro germinal pero presentan un fenotipo único, secundario a la pérdida de expresión de los genes de célula B y a la coexpresión de genes típicos de otras células hematopoyéticas. Múltiples vías de señalización, entre ellas NF- κ B y JAK/STAT se encuentran disreguladas en el LHc, permitiendo a las células tumorales escapar de la apoptosis y contribuyendo de forma importante a la patogenia de la enfermedad. Además, las células HRS presentan numerosas alteraciones genéticas y epigenéticas que pueden contribuir a la patogenia de la enfermedad. (Tabla 3)

Por último, la interacción entre las HRS y el microambiente que las rodea también puede desempeñar un papel importante a este nivel, especialmente la interacción entre HRS y las células T. HRS [92]

Gen	Frecuencia en líneas celulares HL	Frecuencia en células HRS	Vía/función
Mutaciones de genes supresores tumorales			
NF-κBIA	2/6	15%	NF-κB
NF-κBIE	1/6	15%	NF-κB
TNFAIP3	5/7	40%(70% si VEB-)	NF-κB
CYLD	1/8	<10%	NF-κB
TRAF3	1/7	<10%	NF-κB
SOCS1	3/5	40%	JAK/STAT
TP53	3/6	10%	Apoptosis, regulación del ciclo celular
CD95	1/3	6%	Apoptosis mediada por FAS
Ganancias y amplificaciones de protooncogenes			
REL	3/4	50%	NF-κB
MAP3K14		25%	NF-κB
JAK2/JMJD2C/ PD-L1/PD-L2	6/6	35%	JAK/STAT, evasión inmune, modificación de histonas
MDM2		60%	Regulación de apoptosis
BCL3	3/5	15%	NF-κB
Translocaciones cromosómicas			
CTIIA	1/2	15%	Expresión de MHC tipo II
BCL6		1%	Regulación de expresión de programa de células B de centro germinal
JAK2		3%	JAK/STAT
BCL3		10%	NF-κB
Ig loci		20%	

Tabla 3: lesiones genéticas somáticas observadas en las células HRS

3.3.5. VEB y relación etiopatogénica con el LHc

En la actualidad, pese a los conocimientos existentes, el papel patogénico del VEB en el LHc sigue siendo cuestionado por algunos investigadores. En primer lugar por el hecho de que el 60% de los LHc se desarrollan sin la presencia del VEB. Otros motivos son el restringido patrón de expresión de los genes del VEB (por ejemplo el gen inductor de proliferación EBNA2 no se expresa), la ausencia de las moléculas de señalización de LMP2A, y la similar activación de la vía NF- κ B en los casos de LHc VEB positivos y LHc VEB negativos.

No obstante, pese a esas preguntas hasta la fecha sin respuesta, además de los datos epidemiológicos ya apuntados y que revisaremos en profundidad posteriormente, existen numerosas observaciones que apoyan el papel etiopatogénico del VEB en el LHc. En primer lugar, el hecho de que en los casos en que se detecta VEB en las células HRS se ha demostrado que la infección es clonal, lo que prueba que la infección ocurrió previamente a la transformación maligna, y que apoya la hipótesis de su acción causal en el LHc.[150]

En segundo lugar, la relación inversa entre la expresión de múltiples receptores de vías tirosin quinazas y del VEB en las células HRS, que podría indicar que el VEB puede realizar sus funciones.[151] En tercer lugar la presencia de mutaciones en los genes de Ig que ocurre de forma casi exclusiva en los casos VEB positivos, indicando que el VEB es necesario para rescatar de la apoptosis a las células B de centro germinal que son portadoras de esta mutación.[152-154] Lo mismo ocurre con los casos de LHc con mutaciones a nivel de Ig V (mutaciones que previenen de la expresión de BCR), que también son mayoritariamente VEB positivos.[155] Por último, el hecho de que mutaciones de genes inhibidores de NF- κ B, en particular TNFAIP3, se produzcan más frecuentemente en casos de LHc VEB negativos sugeriría que estas mutaciones substituirían el papel que realiza LMP1. [47, 156]

Esas son algunas de las evidencias que existen a favor del papel del VEB en el LHc. ¿Cuales serían los mecanismos mediante los cuales el VEB puede contribuir a la aparición y progresión del tumor?

El VEB expresa en el LHc el patrón de latencia II. Este patrón comprende un perfil de proteínas cuyas funciones aun no parcialmente conocidas, pero que serán las que son responsables del potencial oncogénico del virus. Como vimos anteriormente, EBNA1 se encargaría del mantenimiento del genoma viral y de su replicación, LMP1 actuará como oncogén, activando la vía NF- κ B y otras vías de señalización, LMP2A contribuirá a la persistencia de los linfocitos B anómalos y, al igual que los EBER, también sería responsable de las alteraciones del ciclo celular y de la apoptosis.

Existen otro argumento a favor de la relación entre el VEB y el LHc, como es la alta frecuencia de LHc VEB positivos en pacientes afectos de infección por VIH/SIDA o en pacientes sometidos a trasplante medular o trasplante de órgano sólido. [156] En este caso, además, es claramente evidente como el estado inmunitario es determinante en la relación entre el virus y el tumor. Trabajos recientes observan una fuerte asociación entre LHc VEB positivo y HLA tipo I, lo que sugeriría que algunos haplotipos HLA podrían condicionar una débil respuesta específica citotóxica por linfocitos T (CTL) ante la infección por el VEB, lo que provocaría una respuesta subóptima con niveles elevados de VEB y un riesgo elevado

de transformación y de aparición posterior de LHc VEB positivo. Este aspecto se analizará con mayor profundidad más adelante[157]

Por último debemos recordar el concepto oncogénico propio de la virología tumoral conocido como “hit and run”. Es un hecho bien documentado que el genoma viral, ya sea insertado en el ADN celular o correplicándose en forma de episoma puede desaparecer de las células neoplásicas. La adquisición transitoria de genoma viral sería suficiente para inducir cambios en las células en las que se inserta (activación de oncogenes, silenciamiento de genes supresores tumorales etc.), pudiendo desaparecer posteriormente y no ser necesario para el mantenimiento y progresión del proceso neoplásico.[158] (Figura 12)

Los estudios realizados con el VEB en torno a esta teoría ofrecieron resultados inicialmente contradictorios y no concluyentes. [159, 160]

No obstante, en los últimos años, gracias a las nuevas técnicas de secuenciación, se han podido identificar fragmentos de genoma viral en tejidos predislásicos, en fases precoces del desarrollo neoplásico, o incluso se puede descubrir la “firma epigenética”, los cambios epigenéticos generados por el virus en el epigenoma de las células huésped, incluso con una ausencia total de material genético del virus en las células neoplásicas. Este mecanismo se ha observado en los virus de Hepatitis B y C, adenovirus, polyomavirus, papilomavirus, KSHV, HTLV-1 y también en el virus VEB. [161]

Existirían por lo tanto mecanismos genéticos y epigenéticos que activaría el virus, pudiendo desaparecer posteriormente y no ser por lo tanto detectable en las células tumorales. Así, se han observado casos de pacientes afectados de LHc VEB positivo, que presentan una recidiva tumoral tras la remisión, con similares características clínicas, histológicas e inmunohistoquímicas que al debut, pero en los que tras realizarse los estudios diagnósticos del VEB se demostró que el VEB era negativo. [162]

Este concepto, interesante desde el punto de vista patogénico, viene a aportar nuevos elementos de dificultad para la correcta interpretación de los casos LHc VEB negativos que comparten mecanismos fisiopatológicos con los LHc VEB positivos.

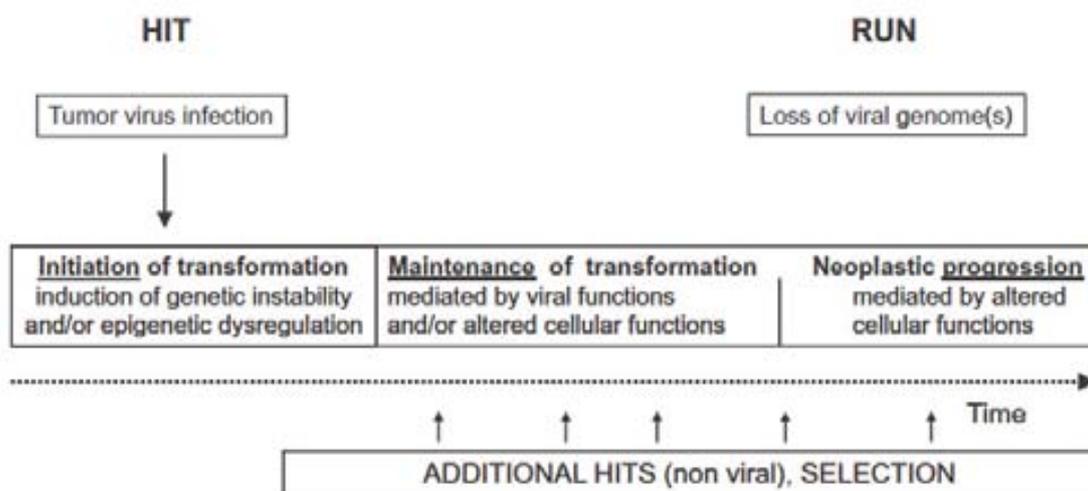


Figura 12: Oncogénesis, teoría hit and run. [161]

3.3.6. Presente y futuro del LHc

La patogénesis molecular del LHc es compleja; no obstante, en los últimos años se han realizado numerosos avances en cuanto a su comprensión. El LHc es una neoplasia clonal de linfocitos B, con células que pierden la expresión de marcadores B debido a un proceso de reprogramación transcripcional. El VEB desempeña un papel muy importante en la patogénesis de un considerable número de casos, contribuyendo a la supervivencia, proliferación y reprogramación de las células HRS. Múltiples factores de transcripción y vías de señalización se encuentran disreguladas en las células HRS, siendo la más importante NF- κ B. La infección por el VEB conduce a la activación de NF- κ B en los casos de LHc VEB positivos, detectándose mutaciones de genes reguladores e inhibidores de NF- κ B en los casos LHc VEB negativos. La interacción entre las células HRS y el microambiente puede ser muy importante para la supervivencia, proliferación y evasión de la respuesta inmune de las células HRS.

No obstante, quedan numerosas cuestiones por dilucidar: ¿existe una célula iniciadora de LHc? ¿Cual es su fenotipo? ¿Existen otros virus implicados en los LHc VEB negativos ¿cuales son las dianas de los miRNAs que expresan las células HRS? ¿Como influyen otros factores propios del huésped como el genotipo HLA al riesgo de desarrollar la enfermedad?

3.4. Disregulación del ciclo celular y de la apoptosis en el LHc

3.4.1. Expresión aberrante de ciclinas y cdk

- La sobreexpresión inmunohistoquímica de ciclina D2 en las células HRS es un dato prominente en la mayoría de los LHc (70-80%) y podría contribuir a la proliferación característica de las mismas. Podría guardar relación con las alteraciones de las vías NF- κ B o AP1.[173-176] Es un hallazgo característico de este tumor, puesto que otros linfomas B o adenopatías reactivas se ha demostrado que tienen niveles bajos de ciclina D2.[177, 178]
- Existe discordancia en los trabajos existentes en cuanto a la expresión de ciclina D3 (30-58%) en los LHc y en cuanto a su interpretación. La ciclina D3 es la principal ciclina tipo D que media en la progresión G1 de las células B humanas. Se ha correlacionado positivamente con la expresión de ciclina A, ciclina B1, ciclina D2, MIB1 (KI67), CDK1 y CDK6. En cambio, parece correlacionarse negativamente con ciclina D2, es decir, se expresa de forma predominante en aquellos casos en que ciclina D2 es negativa. [168, 176, 179, 180]
- En cambio la sobreexpresión de ciclina D1, proteína con un reconocido papel en diferentes tumores, incluido linfomas de célula B, es infrecuente en las células HRS (2-20%). Este hecho es algo intrigante y podría sugerir que la ciclina D1 no contribuiría a la proliferación de las mismas. [168, 176, 181]. No obstante algún

trabajo refiere sobreexpresión de esta proteína (72% de los casos) en relación con la activación de la vía de señalización MAPK, con quien se coexpresa. [182, 183]

- Otra ciclina que también esta sobreexpresada en gran numero de los casos es ciclina E (82-90%), junto con su pareja habitual CDK2, y, al igual que ocurre con ciclina D2, también su sobreexpresión es característica del LHc, puesto que en otros linfomas y en adenopatías reactivas suele estar subexpresada [40, 168, 176, 179, 184]. La sobreexpresión de ciclina E y CDK2 podrían ser uno de los puntos clave de las células HRS, puesto que se ha demostrado que pueden contribuir a la inestabilidad cromosómica y a la poliploidia al afectar a los procesos que regulan la duplicación y segregación cromosómica. [185] Se correlaciona positivamente con la expresión de CDK2, MIB1 (Ki67), ciclina A y ciclina B1[185, 186]. Presenta una correlación negativa con p27 que analizaremos posteriormente. Se ha visto coexpresada con ciclina D2 o con ciclina D3, por lo que no parecen ser mecanismos excluyentes de activación de G1.[179]
- La sobreexpresión inmunohistoquímica de las ciclinas A y B1, junto con CDK1 también son un hallazgo prácticamente constante en la mayoría de los LHc (90-95%), y pueden contribuir a explicar las alteraciones detectadas a nivel de mitosis de las células HRS.[168, 176, 187] El complejo ciclina B/CDK1, también llamado mitosis – promoting factor (MPF), es el principal regulador de la transición G2/M, y cumple un importante papel en la condensación cromosómica, rotura de la membrana nuclear y formación del uso. Su activación, determinada y regulada por múltiples estímulos y puntos de control, dará lugar al inicio de la mitosis. Podría ser que las alteraciones observadas en la transición G2/M y durante la mitosis en las células HRS dependieran de una incorrecta degradación proteosómica de ciclina A y ciclina B.[188-190]
- También se ha observado sobreexpresión de CDK6 y 9, que se h correlacionado con la expresión de ciclina D3, ciclina E y Ki67.[191]
- En relación a la apoptosis, Las células HRS presentan sobreexpresión de bcl2, bcl-xl y survivina, junto con pérdida de expresión de Bax y aumento de expresión nuclear de p65/RelA. La mayoría de trabajos parecen coincidir en esos resultados, aunque algunos otros presentan datos discordantes. Esto explicaría la disregulación de la apoptosis, con sobreexpresión de proteínas antiapoptóticas, que presentan estas células [165, 168, 192, 193]

En resumen, gracias a los estudios realizados y pese a las dificultades para interpretar de forma integrada y coherente sus resultados (multiplicidad de trabajos, diversidad de técnicas, problemas de estandarización, escasez de células neoplásicas en los tumores...) podemos decir que las células HRS se caracterizan por expresar de forma incrementada ciclinas

y CDK implicados en la transición G1/S (ciclina D, ciclina E, CDK2, CDK6), así como proteínas reguladoras de la transición G2/M (ciclina A, ciclina B1, CDK1) y moléculas implicadas en el control de la apoptosis (Bcl-2, bcl-xl, survivina, p65/RelA). [40, 168]

3.4.2. Alteraciones de la vía supresora tumoral p53 (p14-Hdm2-p53-p21)

Las alteraciones detectadas en estas vías pueden desempeñar un papel importante en las disfunciones descritas a nivel de ciclo celular y apoptosis de las células HRS.

La alteración en la vía p53 fue inicialmente sugerida porque se observó que p53, Hdm2 y p21 presentaban un patrón de sobreexpresión en las células HRS que contrastaba con la baja expresión presente en el tejido reactivo circundante.[163, 164, 194-196] Un hecho constante fue la observación de que Hdm2 estaba sobreexpresada y además no formaba los complejos habituales con su proteína inhibidora habitual, p14 (ARF), sino que se unía a p53, que aunque podía detectarse como sobreexpresada por técnicas inmunohistoquímicas, quedaba inactivada.[168] Es decir, la expresión aberrante de las proteínas reguladoras de p53, como son p14 y Hdm2 provocaría la inactivación de p53.[197] Esto explicaría como p53, con una tasa de mutaciones mucho menor que en el resto de tumores, estaría inactiva en el LHc.[195, 198]

Además esta inactivación de p53 es corroborada porque se asocia a niveles elevados de MIB1, ciclina A, ciclina B1, ciclina E, CDK6 y p21, lo que traduce que pese a estar sobreexpresada es incapaz de inducir el stop del ciclo celular.[163, 168] Así, la inactivación de p53 afecta a la inducción de los genes transactivados por p53 envueltos en el control de G1/S y G2/M. [3, 199]

Respecto al punto de control G1/S, p53 induce el stop del ciclo celular en condiciones normales mediante la expresión de p21.[3, 40] La mayoría de las células HRS presentan fenotipo p53+/p21+, lo que indica que, dado que p53 está inactivada, es posible que la sobreexpresión de p21 se deba a vías independientes de p53.[200, 201]. Algunos trabajos, no obstante, apuntan a que en las células HRS existe una muy baja expresión de p21. Estos resultados contradictorias podrían ser atribuibles al anticuerpo utilizado para el estudio inmunohistoquímico, muestra utilizada para el estudio (en parafina o tejido congelado), etc. [163, 187, 202-204]

Respecto al punto de control G2/M, p53 en condiciones normales provoca la subexpresión de ciclina B1 y CDK1.[40, 199] De nuevo, la inactivación de p53 podría explicar la sobreexpresión de ciclina B1/CDK1 y la anormal localización nuclear de los componentes del Mito Promoting Factor (ciclina B1 y CDK1), ambos hallazgos característicos en las células HRS.[168, 191]

3.4.3. Inactivación de la vía supresora Rb (p16-ciclina D-CDK4/6- Rb)

La inactivación de esta vía ha sido sugerida a raíz de la frecuente subexpresión de p16 y p18 (la subexpresión de Rb se ha observado con menor frecuencia).[40, 163, 164, 205] En la mayoría de los casos la afectación de esta vía parecería ser debida a la pérdida de p16 de-

bida a hipermetilación o delección de su región promotora, y provocaría la sobreexpresión de ciclinas D. Otros estudios apuntan que la causa podría ser la sobreexpresión de ciclina D, la sobreexpresión de CDK6, o la pérdida de p15 o p18. Pese a que existen resultados discordantes la primera opción parece la mas plausible.[132, 168, 177, 179, 206]

3.4.4. Inactivación de la vía supresora p27 (p27- ciclina E-CDK2)

Esta vía supresora, al igual que ocurre con la vía Rb, también se encuentra inactiva en las células HRS, observándose baja expresión de p27 y sobreexpresión de ciclina E y CDK2, que aumentan al no ejercer p27 su regulación negativa.[176] En la mayoría de los casos la proteína p27 es inactiva, no se detecta en las muestras de LHc.[168] Esta inactivación parece ser debida al aumento de degradación de p27 mediada por SKP2, proteína con acción ubiquitin ligasa sobre p27 y que está sobreexpresada en el 84% de los casos de LHc [168, 203].

Estos hallazgos, prácticamente constante en todas las células HRS explicará la elevada fracción de crecimiento que las caracteriza.[168, 176, 203]

No obstante, en algunos casos se ha observado sobreexpresión de p27 que también se asociaría con sobreexpresión de ciclina A, E, CDK2 y CDK6. Se cree que en estos casos existiría una expresión aberrante de p27 funcionalmente inactiva, que estaría unida a las ciclinas tipo D que la protegerían de la degradación. Estos casos pueden correlacionarse con un comportamiento clínico mas agresivo.[207]

Pero además del importante papel que p53 y el resto de reguladores tienen en el ciclo celular, también están implicados en la regulación de la apoptosis. Así, en caso de reparación inefectiva de lesión a nivel de ADN, p53 debería inducir la apoptosis. Por lo tanto podría ocurrir que p53 fuese incapaz de inducir el stop del ciclo celular pero consiguiese generar una respuesta que activase el programa apoptótico.[180, 192]

No obstante, no se ha encontrado ninguna correlación entre p53 y la expresión de las proteínas bax y bcl2 en LHc [163, 168, 208]. De forma interesante, lo que si se ha observado es que la expresión elevada de p21 y p27 se asocia con un bajo índice apoptótico, sugiriendo que estos CDKI pueden tener un papel protector antiapoptotico.[203]

3.4.5. Alteraciones de las vías de señalización y disregulación de apoptosis y ciclo celular

La activación constitutiva de la vía NF- κ B (p65/RelA) juega un papel muy importante en la disregulación existente a nivel de la apoptosis en el LHc. Esta vía puede ser activada mediante miembros de la familia TNFR (ligando dependiente) y también mediante CD30, CD40, RANK, Notch 1, mediante la proteína LMP-1 del VEB, por mutaciones del gen I κ BA que lleven a la inactivación de I κ BA, o por amplificación de NF κ B/REL locus (forma ligando independiente).[47, 209]

La activación de esta vía estimulará la expresión de proteínas antiapoptoticas como bcl-xl, c-FLIP, TRAF1, c-IAP2, Bfl1/a1, IEX-1, y de proteínas proliferativas como ciclina D2.[173, 175, 210, 211] Además, NF- κ B estimulará la expresión de IL13 y CD40, que juegan un papel muy importante en la proliferación de células B[173]. Se ha observado en estudios en líneas celu-

lares que la introducción de una mutante dominante-negativa de I κ B α en las células HRS, provoca el anclaje irreversible de NF- κ B en el citoplasma y la apoptosis masiva.[117, 175]

La activación constitutiva de la vía Jak-STAT en el LHc también puede influir en el ciclo celular de las células HRS. Concretamente se ha visto que serían STAT 1, 3, 5 y 6 los que son activos y que se asocian con un alto índice de proliferación y alta expresión de cdk1, 2 y 6.[40, 212, 213]

Por ultimo también existen trabajos que evidencian un posible papel del factor de transcripción AP1. [40] AP1 se compone de homo o heterodímeros de las proteínas Jun y ATF. La transcripción de estas proteínas y activación de esta vía puede ser dependiente de MAPK (proteín quinasa activada por mitógenos), mediada por NF- κ B o independiente, mediante un proceso autorregulado propio de las células HRS, y estos procesos afectarán a su vez a la regulación de la proliferación, apoptosis y diferenciación. [214, 215]

3.4.6. VEB y relación con ciclo celular y apoptosis en el LHc

Las proteínas LMP1 y LMP2A del VEB son las principales responsables de las alteraciones que el VEB provoca sobre el ciclo celular y la apoptosis.

Como ya hemos explicado, LMP1 actuará como un receptor activo CD40, activando a NF- κ B mediante la vía TRAF. También mediará en la activación de otras vías como AP1 (vía JNK/c-Jun), ATF2 (vía p38/MAPK) y sobre la vía Jak-STAT. Además, puede inducir la producción de citoquinas IL-6 e IL-10. [114]

A su vez, LMP2A aumentará la expresión de genes asociados a inducción de ciclo celular e inhibición de apoptosis (Ki67, ciclina A, Bcl-xl, survivina) y provocará además la disminución de la expresión de factores específicos de célula B. [43]

Algunos trabajos sugieren la posibilidad de que EBER provoque la supresión de la transcripción de p21 y también la disminución de sus reguladores positivos como p53, EGR1 y STAT1. Además se ha observado que esta supresión de p21 se asociaría con resistencia a agentes quimioterápicos cuyo mecanismo de acción es precisamente la inducción de la apoptosis estimulando la producción de p21. Esto podría indicar que EBER tiene un efecto antiapoptótico al inhibir a p21 probablemente mediante p53, STAT1 y EGR1. [44]

Existen gran numero de trabajos que han analizado extensamente como influye la presencia del VEB en la expresión de proteínas de ciclo celular y apoptosis, y en bastantes ocasiones los resultados son conflictivos o contradictorios. No obstante, tras la revisión de toda la literatura existente podríamos concluir que no parece existir correlación entre el status del VEB y el índice apoptótico mediante el método TUNEL, pero en cambio parece ser que los casos de LHc VEB positivos podrían presentar un perfil inmunohistoquímico específico, con alta expresión de STAT 1 y STAT3 y baja expresión de p53, Hdm2, p27, ciclina E, CDK6 y proteínas bcl-xl. [40, 168, 216]

La figura siguiente muestra, a modo de resumen, únicamente las alteraciones del ciclo celular y de la apoptosis que describió García et al en su trabajo, y la influencia del VEB sobre las mismas. (Figura 13).

Como hemos mostrado existen trabajos que ofrecen resultados diferentes.

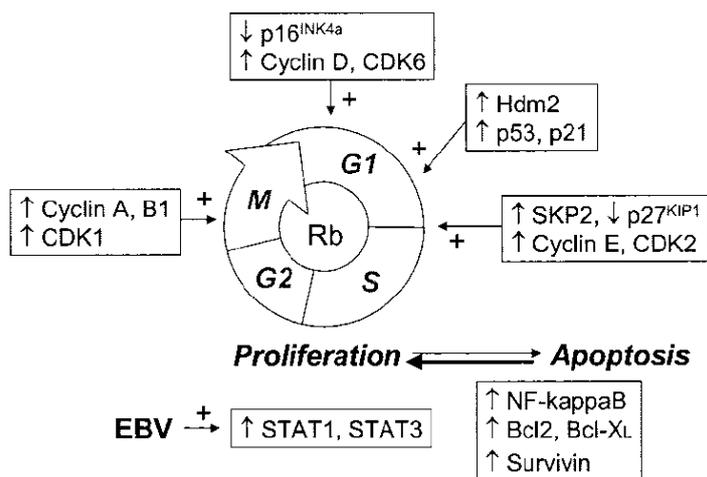


Figura 13: alteraciones del ciclo celular y de la apoptosis presentes en las células HRS [56]

3.4.7. Correlación entre alteraciones del ciclo celular y de la apoptosis con repercusión clínica

Existen varios estudios que han analizado la relevancia clínica de estas alteraciones detectadas mediante técnicas inmunohistoquímicas o estudio de los perfiles de expresión genética.[40, 44, 217]

Algunos trabajos refieren disminución de la supervivencia asociada a alto índice de proliferación (Ki67), elevada expresión del antígeno de proliferación nuclear celular (PCNA), alta expresión de bcl2, bcl-xl, bax y p53, baja expresión de Rb y caspasa 3, y alto índice apoptótico [164, 168, 208, 218-220]

Otros trabajos que realizan estudios de expresión génica observan que los casos de buen pronóstico se caracterizaban por activación de los genes envueltos en inducción de la apoptosis (APAF, bax, bid, caspasa 8, p53, TRAIL) y vías de señalización, incluyendo citocinas y moléculas de transducción (IL-10, IL-18, STAT3), mientras que los casos de mal pronóstico se caracterizan por la activación de genes envueltos en la proliferación celular (Ki67) y por la inhibición de genes supresores tumorales como PTEN y DCC. [76, 168, 220-224]

Algunos trabajos han observado correlación entre subexpresión de p21 y estadios de presentación más avanzados (mayor agresividad) y también correlación entre mayor agresividad y positividad de Ki67 y ToPollalfa[225]

Trabajos recientes también han observado que la supresión de p21 en los LHc VEB positivos se asociaba a peor supervivencia a 2 años, lo que podría indicar que la supresión de p21 permitiría escapar de la apoptosis a las células HRS o ser resistentes a agentes quimioterápicos inductores de apoptosis.[44]

Otro estudio reciente desarrollado en Brasil únicamente en pacientes pediátricos consigue establecer 2 clusters diferenciados de pacientes tras analizar diferentes variables (proteínas, variables clínicas etc.): uno de ellos pacientes de alto riesgo con alteraciones a nivel de ciclo celular y apoptosis, y el otro compuesto por pacientes de bajo riesgo y que son subtipo histológico EN y VEB positivo.[216]

Por último hay que resaltar que en algunos estudios la expresión de LMP1 se correlacionó con buen pronóstico, pero otros trabajos no obtuvieron los mismos resultados.[164, 168, 226, 227]

4. ESTUDIOS DEMOGRÁFICOS

4.1. Estudios realizados en población general

4.1.1. Países desarrollados

Existen múltiples trabajos que estudian diferentes poblaciones como Reino Unido, Alemania, USA, Dinamarca, Chequia, Francia, Holanda, Italia, en los que revisan series de LHc que incluían desde 20 hasta 100-150 pacientes. [150, 229-234]

Un grupo muy activo en el estudio del LHc es el de las doctoras R. Jarret y F. Alexander en Reino Unido. Este grupo ha presentado varios trabajos descriptivos sobre el LHc, pero en 2005 publican un trabajo de referencia, dado que se trata de un extenso estudio poblacional realizado a partir de la Scotland and Newcastle epidemiological study of Hodgkin's disease. [235]

Es un estudio retrospectivo en el que se incluyen 662 casos de LHc de edades comprendidas entre 16 y 74 años (1993-1997) en el que revisan edad, sexo, presencia del VEB y subtipo histológico, y además se hace una revisión histopatológica de cada caso para comprobar si el diagnóstico inicial es correcto.

En cuanto al diagnóstico, se demostró que la revisión histológica fue concordante con el diagnóstico inicial en la mayoría de casos (91%), solo un 4.7% se considero que el diagnóstico era erróneo, aumentando el porcentaje de errores en los pacientes de más de 50 años (errores diagnósticos, cambios en el subtipo histológico...).

Se observó el pico bimodal clásico propio del patrón epidemiológico III, con un pico en adultos jóvenes (16-35 años) y un aumento progresivo de los casos a partir de los 60 años.

En cuanto a subtipos histológicos, la distribución general fue la ya conocida, destacando un importante predominio de EN respecto a CM en adultos jóvenes, que reaparece en el grupo de mayores de 60 años.

En cuanto al VEB, demuestran en su población que el pico de adultos jóvenes suele ser VEB negativo, y en cambio a partir de los 50 años la mayoría de casos son VEB positivos. También realizan estudios serológicos, y observan que este grupo de adultos jóvenes VEB negativos acostumbran a presentar serologías de VEB negativas en mayor proporción que si comparan con controles emparejados por edad, lo que en principio no apoyaría la teoría "hit and run".[159]

Por último, en base a los datos existentes en la literatura y a su experiencia, apoyan la teoría de las "4 modalidades de LHc", con 3 grupos asociados a VEB y un grupo de casos no asociados a VEB.

Otro trabajo en el que revisan un gran número de pacientes es el de Glasser et al, que estudia la variación étnica y racial en los casos de LHc VEB positivo en la población de California. [236] En el revisan diferentes series de LHc de California, incluyendo un total de 1032 pacientes, realizan técnicas histológicas de confirmación del diagnóstico y se estudia la presencia de VEB. En este trabajo observaron un mayor número de casos LHc VEB positivo en pacientes de origen hispanico y asiático que en procedentes de raza negra, independientemente de

factores clínicos o demográficos. Dado que era un trabajo con un gran número de pacientes observaron diversas asociaciones entre VEB, raza, edad, variante histológica, estadio y nivel socioeconómico, como por ejemplo la asociación en los pacientes de raza hispana entre VEB positivos y no haber nacido en Norteamérica o el bajo nivel socioeconómico en mujeres, asociación entre personas de raza negra con estadios avanzados, etc.

Estos dos estudios son trabajos de gran magnitud y se consideran de referencia. A partir de ahí, como hemos explicado inicialmente, existen múltiples trabajos que intentarán reflejar cual es la situación del LHc y el VEB en su ámbito.

Cartwright et al. realiza una exhaustiva revisión en la que recogen los trabajos realizados que investigan la presencia del VEB en el LHc. Así, reflejan que tanto en estudios realizados en Europa como en América del norte se detecta el VEB entre el 27% y 58% de los pacientes. Los estudios realizados en centro y Sudamérica refieren una presencia del VEB de entre un 36% y un 94% de los casos. Claramente la presencia del VEB es más elevada en estudios realizados en África, donde se detecta en el 61-92% de los casos, y por último estudios asiáticos refieren presencia del virus en el 43-65% de los casos, con la particularidad de Japón, donde se encuentra en el 80-94% de los casos. [75, 237]

Analizamos a continuación algunos trabajos realizados en poblaciones comparables a la nuestra.

Trimèche et al. caracteriza una serie de 111 casos de LHc diagnosticados en Bélgica. La prevalencia de infección por VEB fue de 33%, correlacionándose de forma estadísticamente significativa con edad avanzada, subtipo histológico CM y sexo masculino, y observándose una tendencia a asociación con estadio clínico III/IV. [238]

Keresztes et al. realiza un estudio similar en Hungría, estudio retrospectivo en el que se incluyen 109 pacientes afectados de LHc. En este grupo se detecta la presencia de VEB en 43% de las muestras, asociándose también con subtipo histológico CM (especialmente en pacientes 11-20 años y mayores de 50 años), en cambio en los casos de LHc subtipo histológico EN el VEB fue positivo en el 35%, acumulándose los casos negativos en el subgrupo de pacientes de 15 a 30 años. No se detectó relación entre VEB con otras variables como estadio clínico, tratamientos realizados, síntomas B, respuesta al tratamiento, y únicamente se observó una tendencia que no alcanzaba la significación estadística a un mejor pronóstico de los pacientes VEB negativos. [239]

Otros trabajos interesantes podrían ser el de Enblad et al en Suecia, donde revisan 117 pacientes afectados de LHc, observando una positividad del VEB en el 27% de los casos, y que era más frecuente en pacientes de edad avanzada, subtipo CM, con presencia de síntomas B y estadios avanzados de la enfermedad. En este estudio el LHc VEB positivo se asociaba a peor pronóstico. [232]

Delsol et al, en Francia, revisan 107 casos de LHc, observando la presencia del VEB en el 34% de los casos, con una alta concordancia tanto si son determinados mediante EBER como si lo son mediante LMP1. También, como en los trabajos anteriores, el VEB se asoció al subtipo histológico CM. [230]

Por último, Bosch Princep et al., en un estudio realizado en una población muy similar a la nuestra como es Tarragona, recogen de manera retrospectiva 49 pacientes afectados de

LHc, y determinan que el VEB fue positivo en el 40% de los mismos, con una positividad que aumentaba de forma estadísticamente significativa en los pacientes mayores de 55 años y en el subtipo histológico CM. [240]

4.1.2. Países en vías de desarrollo

Pese a que hablaremos con más profundidad de los países en vías de desarrollo centrándonos en la población pediátrica, comentaremos en este apartado dos trabajos. Uno de ellos es el realizado por Chang et al. en Taiwán. En el se pretende demostrar el cambio de patrón epidemiológico del LHc asociado al cambio de status socioeconómico experimentado en este país. Para ello realizan un estudio comparativo en el que se analizan 2 series de pacientes, una de 1982 a 1995 y que incluye 74 casos, y la segunda de 1996 a 2007 con 99 casos. Este trabajo demuestra como aumentan los casos de EN y disminuyen los de CM de forma estadísticamente significativa, como se reduce la edad media (de 42.4 a 36.6 años), y como disminuye la positividad del VEB en los casos de EN y DL. Concluyen por lo tanto apuntando que estos cambios muestran un acercamiento a los patrones habituales que presenta el LHc y el VEB en las sociedades occidentales y en Japón. [241]

Otro estudio interesante es el realizado por Al Salam et al. en los Emiratos Árabes, dado que existen pocos trabajos originarios de estas áreas, y sus datos pueden extrapolarse a muchos países asiáticos que también mostrarán un patrón epidemiológico II. En este trabajo se recogen 88 casos de manera retrospectiva de un período comprendido entre 1988 y 2004, aunque solo se consigue recuperar muestra para realizar el estudio en 45 de los mismos. El VEB fue positivo en el 38% de las muestras, predominando en los subtipos CM. Se expresó más en población pediátrica que adulta. [242]

4.2. Estudios realizados en población pediátrica

4.2.1. Países desarrollados

Existen muy escasos trabajos realizados únicamente en población pediátrica.

Weinreb et al. en Reino Unido estudian 74 casos de pacientes pediátricos afectados de LHc. El VEB está presente en el 50% de los casos (determinado mediante LMP1), y se asocia con estadio IV de presentación y subtipo histológico CM. [243]

Otros que podríamos citar son el de Brousset et al en Francia, y el de Kanavaros et al en Grecia, revisando pequeñas series de 13 y 22 pacientes respectivamente. Kanavaros observa presencia del VEB en el 54% de los casos y asociación con CM, y Brousset por su parte comparan un pequeño grupo de pacientes afectados de LHc y otro grupo de pacientes afectados de linfoma anaplásico. En el grupo de LHc observan la presencia del VEB en el 54% de los casos, y en cambio no está presente en ninguno de los pacientes afectados de linfoma anaplásico. [244, 245]

Existen otros trabajos que analizan de forma comparativa pacientes pediátricos afectados de LHc de diferentes áreas geográficas.

Así, Armstrong et al comparan un grupo de 55 pacientes, 22 originarios de Reino Unido, 25 de Brasil y 9 de Arabia Saudí. Únicamente observan diferencias de presencia del VEB con estudios previos realizados en adultos jóvenes, pero probablemente por el pequeño tamaño muestral no aprecian diferencias significativas entre los 3 grupos ni en presencia del VEB, ni en función de la edad ni del sexo de los pacientes. [246]

Ambinder et al. y Razzouk et al. realizan estudios similares, comparando niños afectados de LHc de Honduras y niños de USA, y población de Brasil y de USA respectivamente. [247, 248]

Podemos analizar con más detalle 2 trabajos realizados en población pediátrica y adulta en Argentina y Brasil, que podrían corresponder a zonas con patrones epidemiológicos II, o según la zona concreta estudiada, patrones I o III.

En el primero de ellos De Matteo et al. realizan un estudio retrospectivo analizando 92 casos pediátricos de LHc (0-16 años) y 81 adultos. Un punto de partida interesante y común a muchos de estos países es la precocidad de la primoinfección por VEB, pues refieren que en Argentina el 90% de los niños menores de 6 años ya ha sufrido la infección por VEB.

En su estudio detectan presencia del VEB asociada a LHc en el grupo pediátrico del 55% y en el adulto del 31%. Dentro del grupo pediátrico el VEB está mucho más presente en el grupo de 2 a 10 años (75% de los casos) que en el de 11-16 años (30% de los casos). Dentro del grupo de adultos se detecta el VEB únicamente en un 14% de los casos en el grupo de 17 a 35 años, y en cambio tanto en el grupo de 36 a 50 años como en el de mayores de 50 años el VEB fue positivo en el 50%. Por subtipos histológicos, resaltar que en el grupo pediátrico el subtipo histológico más frecuente fue CM (52%), y dentro de ellos, el VEB fue positivo en el 77 % de los casos. Concluyen sugiriendo que sus datos apoyan la teoría de que el VEB está directamente envuelto en la patogénesis del LHc en los niños menores de 10 años. [249]

El segundo estudio, realizado en Brasil por Elgui de Oliveira et al, analiza un total de 96 pacientes afectados de LHc, 65 pediátricos y 31 adultos, e intentan estudiar las diferencias de incidencia del VEB escogiendo pacientes originarios de 2 zonas geográficas diferentes, una de perfil socioeconómico alto y la otra más deprimida. Observan una incidencia global de infección por VEB en el 64% de los pacientes, que es más importante en los pacientes pediátricos de origen subdesarrollado (80%) que en los de zona desarrollada (63%). El escaso número de pacientes adultos y el amplio rango de edad que abarcan (desde los 20 a los 80 años) imposibilita obtener más resultados. [250]

4.2.2. Países en vías de desarrollo

En la línea del último trabajo comentado en el apartado anterior, Barros et al. publican recientemente un estudio realizado en población exclusivamente pediátrica en Brasil. Sugieren que en los últimos años puede haberse producido un cambio de patrón epidemiológico en su área, dado que analizan 100 pacientes afectados de LHc en Rio de Janeiro, de entre 3 y 18 años, y la mayoría de casos ocurren en pacientes por encima de los 10 años (73%), identificándose el VEB en un 44% de los casos, sin diferencias entre menores o mayores de 10 años. El subtipo histológico más frecuente es EN (69%), también de forma

uniforme en toda la muestra, y el VEB se asoció de forma independiente con el subtipo CM [251]. Posteriormente el mismo grupo ha realizado determinación de subpoblaciones linfocitarias en el microambiente tumoral detectándose que podría existir un infiltrado linfocitario diferente en los casos VEB positivos y en los casos VEB negativos que podría relacionarse con pronóstico, subtipo histológico etc. Este hallazgo les permite sugerir la hipótesis de que el desarrollo del subtipo CM puede resultar de la exposición temprana a VEB en contexto de un sistema inmunitario defectuoso. [252]

No obstante, Araujo et al. realizan otro estudio demográfico en Brasil, en el que incluyen 90 casos pediátricos de LHc, detectando alta frecuencia de VEB en todos los subtipos, especialmente en CM y DL. [253]

Dinand et al. estudia la prevalencia de VEB en el LHc en niños de India del Norte. Recogen 145 pacientes afectados de LHc diagnosticados entre 1991 y 2003. Se detectó la presencia del VEB en 93% de los casos, asociándose a infancia y nivel socioeconómico bajo. No se detectó relación con respuesta al tratamiento ni supervivencia. [254]

Otro estudio demográfico realizado por Engel et al. en Sudáfrica en 47 pacientes pediátricos afectados de LHc (3- 14 años) mostró una presencia del VEB en el 68% de los pacientes, siendo el subtipo histológico dominante el de EN (89% de los casos). En su estudio se observó una tendencia a un mejor curso evolutivo (mejor supervivencia, sintomatología menos agresiva al diagnóstico) en los casos VEB positivos que en los VEB negativos. [255]

Por último, Zhou et al. describe sus resultados tras revisan 104 pacientes pediátricos y 52 adultos afectados de LHc en China. La incidencia global de detección de VEB en las muestras tumorales fue del 72%, siendo del 89% en los pacientes pediátricos y del 38% en los adultos. Dentro de los pacientes pediátricos, se detectó en el 95% de los casos de entre 3 y 10 años, y solo en el 54% de los casos entre 11 y 14 años. En adultos el VEB se asoció con más frecuencia con el subtipo CM, y en niños se asoció con todos los subtipos histológicos. [256]

5. ESTUDIOS EPIDEMIOLÓGICOS

5.1. Factores de riesgo de LHc

5.1.1. Genéticos y familiares

Existen diferentes datos y trabajos que apoyan la existencia de una base o predisposición hereditaria en el LHc.

Estudios epidemiológicos reportan una agregación de aproximadamente un 4-5% de pacientes en familias. Así, los hermanos de un paciente tienen un riesgo 7 veces mayor que la población general. La predisposición familiar es particularmente importante en gemelos monocigotos, puesto que éstos tienen un riesgo 99 veces mayor de desarrollar LHc que en gemelos dicigotos. También existe una variación étnica. La población asiática presenta menor incidencia que población caucásica, independientemente de su lugar de residencia.[68, 257] [258-263]

Durante los últimos 35 años diferentes antígenos se han asociado con LHc, tanto familiar como esporádico.

Como ya hemos explicado previamente, existen trabajos recientes que apuntan a la asociación entre LHc VEB positivo y HLA tipo I. Estos trabajos nacen a partir de la conocida relación existente entre LHc y VEB en pacientes inmunodeprimidos. Se cree que algunos alelos HLA podrían asociarse con una baja afinidad por péptidos inmunogénicos derivados del VEB. De esta forma, existirían algunos haplotipos HLA que podrían predisponer a la aparición de LHc VEB positivos. [156, 264]

Los estudios iniciales de asociación entre LHc y HLA se practicaron sin tener en cuenta el status VEB. Se describieron asociaciones con HLA-A1, HLA-B5, HLA-B8 y HLA-B18, aunque el grado de reproductibilidad de estos estudios fue bajo. [265]

Estudios posteriores detectaron una alta asociación entre alelos HLA-A y VEB. Así, HLA-A1 se ha asociado con un riesgo aumentado de LHc VEB positivo, y HLA-A2 se ha asociado con bajo riesgo de LHc VEB positivo. [264, 266, 267]

En los últimos años, con las nuevas técnicas de secuenciación genómica han aparecido trabajos que ratifican o apoyan asociaciones ya conocidas y que observan nuevas asociaciones. Por ejemplo, es consistente la asociación entre HLA-B5 y LHc, y se observa en cambio significativamente disminuido HLA-DR7 con LHc. También parece existir una alta asociación entre HLA-DR2, HLA-DR5, HLA-A1, HLA-B37 y HLA-DR10 con LHc VEB positivo, y una baja frecuencia de HLA-A2 en LHc VEB positivo. [268]

Por último, los trabajos más recientes intentan establecer si en realidad las asociaciones genéticas descritas entre HLA y LHc se deben a polimorfismos de nucleótido simple (SNP) que podrían estar compartidos por diferentes alelos HLA. Así, algunos investigadores

mediante estudios de asociación del genoma completo (genome wide association studies, GWAS) han observado que el SNP (rs6903608) localizado en la región HLA clase II, se encuentra significativamente asociado con LHc. [269, 270]

5.1.2. Factores infecciosos

En las primeras descripciones del LHc ya se sugirió una probable etiología infecciosa debido a su presentación clínica, características epidemiológicas etc. Además la descripción de algunos “clusters” de pacientes (en institutos, barrios), apoyarían esta hipótesis del agente infeccioso desencadenante, sin poderse descartar la posibilidad de algún agente medioambiental que hasta ahora nunca se ha podido establecer. [70, 271-273]

Es probada la asociación directa entre el VEB y LHc, y hablaremos de ello en profundidad en el siguiente apartado.

Se han estudiado otros agentes infecciosos como potenciales candidatos o cofactores en el desarrollo del LHc. Entre ellos estarían citomegalovirus, HHV 6, 7 y 8, poliomavirus JC y BK, SV40, papovavirus linfotrópico, adenovirus, paramyxovirus y virus 1 humano T linfotrópico. No obstante, actualmente no existe evidencia suficiente de que estos agentes estén implicados a nivel patogénico. [64, 274]

5.1.3. Edad, nivel socioeconómico y ambiente infantil

La incidencia del LHc es diferente en función de la zona geográfica que estudiamos.

En los países subdesarrollados el pico de incidencia ocurre en la edad infantil y en cambio en países desarrollados es en adultos jóvenes. [75, 275]

Además, diversos estudios poblacionales demostraron que el tamaño de la familia, aunque es un indicador de clase social, persistía como factor de riesgo de desarrollar LHc tras corregir otros variables como educación, clase social, tipo de vivienda, historia previa de mononucleosis infecciosa etcétera. En concreto, en países desarrollados se observó que los adultos jóvenes primogénitos, o que habitaban en domicilios unifamiliares, o cuyos padres eran de nivel educacional alto, todos ellos eran factores de riesgo que aumentaban la probabilidad de LHc.[275-278] Esto en realidad podría sugerir que estos factores no contribuyen en sí mismos a la aparición de la enfermedad pero sí al retraso en la exposición a agentes infecciosos como por ejemplo el VEB.

5.1.4. Inmunodeficiencias

Es un hecho conocido que los estados de inmunosupresión y de sobreestimulación inmunológica aumentan el riesgo de desarrollar LHc.[279] En los pacientes sometidos a trasplante alogénico de médula ósea el riesgo de LHc aumenta en 5-6 veces respecto a la población general[280], siendo este riesgo aun mayor, entre 18 y 22 veces el esperable en la población general, en los pacientes afectos de infección por el virus de la inmunodeficiencia humana.[137]

Otros pacientes con riesgo aumentado de LHc son los afectos de inmunodeficiencias primarias, como síndrome de Wiskott-Aldrich, inmunodeficiencia común variable y ataxia-telangiectasia. [281]

5.1.5. Exposiciones ocupacionales y ambientales

Algunas exposiciones ocupacionales fueron postuladas como de riesgo de desarrollar LHc, como la industria de la madera, herbicidas y pesticidas, radiaciones ionizantes, industria del algodón, refinerías de petróleo y algunos productos de peluquería, pero los estudios fueron realizados en grupos pequeños de pacientes y los resultados son poco consistentes. [64, 282, 283]. También se estudió la relación entre el tabaco y el LHc, pero los resultados no fueron concluyentes.[284]

Por último, cabe recordar algunos trabajos que observaron que algunas profesiones que implicaban contacto personal (profesores, sanitarios) tenían un riesgo elevado de desarrollar LHc, lo que podría apoyar también la teoría del agente infeccioso como factor etiológico, pero estos resultados también son poco consistentes y difíciles de interpretar dado que pueden estar sesgados por clase social etc.[285, 286]

5.2. Relación entre VEB y LHc

La demostración de la asociación entre el VEB y LHc se ha demostrado por numerosos estudios seroepidemiológicos en los que se detectaron altos niveles de anticuerpos contra el VEB y contra antígenos de la cápside viral en pacientes afectos de LHc respecto a los controles.[287] A nivel celular se han detectado componentes del VEB como EBER, EBNA y LMP en el interior de las células HRS. Además se ha demostrado la clonalidad del VEB detectado en estos tumores, lo que implica que las células HRS fueron infectadas previamente a la malignización. [99

Hablaremos a continuación de la relación entre mononucleosis infecciosa (MI) y el LHc, y posteriormente revisaremos la asociación entre VEB y edad, sexo, subtipo histológico y pronóstico.

5.2.1. Mononucleosis infecciosa y LHc

Los primeros estudios que apuntaron la relación entre el VEB y el LHc fueron realizados a partir de observaciones realizadas sobre la MI. Estudios epidemiológicos ya demostraron hace 25 años que el antecedente de MI triplicaba el riesgo de LHc, y que los pacientes afectos de LHc, antes de desarrollar la enfermedad, tenían títulos de anticuerpos contra el VEB mayores que los controles. [288-290] Otro clásico trabajo del mismo grupo demostró que pacientes con evidencia serológica de infección por el VEB tenían un riesgo 2.5-4 veces más elevado de desarrollar LHc que las personas sin infección.[289] La afectación del grupo de edad de adultos jóvenes dio lugar a la interpretación de que esta asociación revelaba una aparición tardía de la infección por VEB en pacientes de un nivel socioeconómico alto. [257, 291]

Pero existen algunos hechos paradójicos: ¿porqué en el grupo de adultos jóvenes, grupo en el que la asociación entre MI y LHc es más potente, es donde menos se encuentra el VEB? Y porqué solo se encuentra genoma del VEB en 20-40% de los pacientes con diagnóstico previo de MI, cuando en cambio se detecta en 30-40% de los adultos jóvenes diagnosticados de LHc? ¿Porqué los LHc asociados a VEB se dan con mayor frecuencia en aquellas zonas geográficas en las que la MI es menos frecuente?

Además, estudios recientes han aportado resultados contradictorios, en cuanto a la relación entre MI y LHc, probablemente por sesgos y diferencias metodológicos. Esto volvió a generar una cierta discusión en cuanto al papel etiopatogénico del VEB. [290, 292-294]

No obstante, un trabajo reciente parece aportar una evidencia definitiva[295]. Es un estudio poblacional realizado en Dinamarca y Suecia que recoge un total de 586 pacientes y 3187 controles, en el que se revisa la presencia del VEB y se documenta la historia de MI, recojiéndose además información exhaustiva sobre posibles factores de confusión relacionados con factores de riesgo socioeconómicos de desarrollo de LHc (características de la familia, nivel educacional, tipo de casa..). Este trabajo demostró que MI se asociaba, con significación estadística y sin posibilidad de que se debiese a factores de confusión, con un riesgo elevado de LHc EBV positivo y no con LHc EBV negativo, y además se demostró que la enfermedad se desarrollaba con una media de 2.9 años (1.8-4.9 años) tras la infección.

Se considera que este estudio es definitivo en cuanto a la demostración de la relación entre MI y desarrollo de LHc. La teoría “hit and run” puede explicar, al menos parcialmente, algunas de las paradojas expuestas previamente. No obstante algunas de esas preguntas persisten sin respuesta, y serán necesarios nuevos estudios o la aportación de las nuevas tecnologías las que aporten luz a esos interrogantes.

5.2.2. VEB y subtipos histológicos

El subtipo histológico es el mayor predictor de que un LHc se asocie a VEB, pues se detecta en el 75% de los casos subtipo CM y solo en un 25% de los casos EN. Además un hecho característico es que el VEB prácticamente no se asocia con el subtipo PL.[257] Como hemos visto algunos autores apoyan la hipótesis de que será el propio VEB el que inducirá que el LHc morfológicamente se exprese en su subtipo histológico CM. [252]

La figura adjunta, extraída del trabajo multicéntrico de Glaser et al, muestra como hay un gran predominio de infección por VEB en el subtipo CM, prácticamente independiente de la edad de los pacientes. (Figura 14)

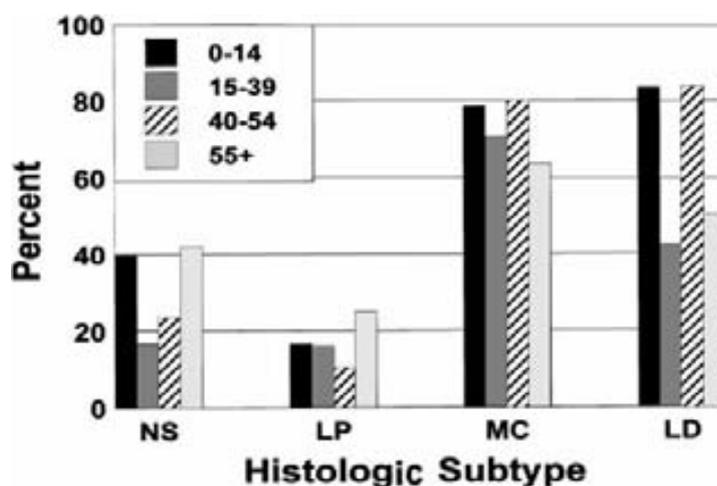


Figura 14: Infección por VEB en función de edad y subtipo histológico [257]

Además del mecanismo desconocido que explique la relación entre VEB y CM, la serie de Keegan et al nos dejan otra pregunta en el aire, en relación a la observación de que en el grupo

de 15-44 años tienen pocos pacientes subtipo CM y son mayoritariamente VEB negativos, como si de alguna forma ese mecanismo desconocido en estos pacientes no fuese funcionante.

5.2.3. VEB y zona geográfica

La asociación del VEB con el LHc es mucho mayor en las zonas geográficas propias de los países menos desarrollados, como Asia, África y centro/Sudamérica, con positividad del VEB entre un 43 y 95%, que en EEUU o Europa, donde los estudios detectan presencia del VEB en 22-53% de los pacientes.[64, 75] Siempre se debe tener en cuenta que las técnicas diagnósticas realizadas pueden representar un sesgo.

5.2.4. VEB y edad, sexo y raza

En países desarrollados el LHc se presenta con la conocida curva bimodal, con picos de incidencia en adultos jóvenes y personas mayores de 60 años. En cambio la mayor incidencia de LHc VEB positivos es en niños y personas mayores de 70 años.

En población pediátrica, como ya comentamos en el apartado de estudios demográficos, la incidencia de asociación de VEB al LHc está entre 54-100% en estudios realizados en Asia, África, Centroamérica y Sudamérica, y entre 28-59% en estudios europeos y norteamericanos. De nuevo se debe tener en cuenta la consideración anterior. [64, 296]

El LHc VEB positivo, al igual que el ocurre en el LHc en general, es más frecuente en pacientes de sexo masculino que de sexo femenino (prácticamente presenta el doble de incidencia, 47,7% vs 29.2%). Esta diferencia es especialmente importante en adultos jóvenes, lo cual ha motivado que algunos autores investiguen sobre los posibles mecanismos protectores en mujeres adultas jóvenes, (mecanismos inmunosupresores mediados por el embarazo, etc.). [257]

En cuanto a la raza, mientras que el LHc es más frecuente en general en pacientes de raza blanca, el LHc VEB positivo es más frecuente en pacientes de origen hispano, asiático o indio (60-65%), algo menos frecuente en pacientes de origen caucásico (35%), y es menos frecuente en pacientes de raza negra (16%).

Un grupo étnico con ciertas particularidades es el de origen afroamericano, como son el predominio de subtipo histológico EN, y que en ellos no se aprecia el predominio en sexo masculino que se aprecia en la población general.[257]

5.2.5. VEB y pronóstico

Los estudios sobre la influencia del VEB en el pronóstico y el riesgo de recidiva son controvertidos. Esto puede ser reflejo de problemas derivados de las técnicas diagnósticas, problemas metodológicos a la hora de comparar los resultados que aportan los estudios realizados, etc.

De todas formas, los estudios poblacionales son los más consistentes dado que no deberían presentar sesgos de selección de los pacientes.

Así, concretamente tres estudios poblacionales recogen una marcada disminución de la supervivencia en pacientes mayores de 60 años VEB positivos respecto de los pacientes VEB

negativos. Uno de ellos también aporta los siguientes datos: los pacientes afectos de LHc VEB positivos son de mayor edad, suelen presentarse con enfermedad avanzada y síntomas B y muestran una tendencia a una menor supervivencia comparando con los pacientes LHc VEB negativos. No obstante, en uno de ellos el tamaño muestral era pequeño, otro fue realizado únicamente en población mayor de 60 años, y el otro en mujeres. Así cada uno de ellos tiene que ser interpretado con ciertas precauciones. [232, 297, 298]

Otros estudios, realizados en España, Brasil, India, Corea, Sudáfrica, con un elevado porcentaje de casos VEB positivos, refieren no encontrar efecto del status VEB sobre el pronóstico del LHC, e incluso observan una mayor supervivencia asociada a la positividad del VEB. Esto podría sugerir que el impacto pronóstico de la positividad del VEB puede estar influida por el factor geográfico. No obstante, estos estudios también deben ser interpretados con precaución, dado que son ensayos clínicos con pacientes seleccionados (generalmente jóvenes) y la disponibilidad de muestras para la realización de los estudios histológicos no ha sido óptima.

Pero serán tres recientes estudios poblacionales, metodológicamente impecables y que obtienen resultados muy similares, los que aportan conclusiones consistentes sobre el tema. Son estudios en cohortes estratificados por edad, y observan que el impacto del status del VEB varía en función de la edad al diagnóstico. Así, tanto en el grupo de pacientes menores de 15 años como en el grupo de 16-34 años el VEB comporta una mayor supervivencia (en el primer grupo, muy cercana a la significación estadística), y es en el grupo de pacientes mayores de 50 años en el que realmente implica un peor pronóstico, tras ajustar por otras variables como sexo, estadio y presencia de síntomas B. El estudio de Keegan et al. apunta, no obstante, que esta mortalidad aumentada afecta únicamente al grupo de pacientes con subtipo histológico EN.[57, 296, 299] Los trabajos de Keegan y Jarret observan además una mayor supervivencia global en los LHc VEB negativos que en los LH VEB positivos, con datos que son estadísticamente significativos, pero el estudio de Diepstra et al. difiere en esta última conclusión, pues no detecta efecto del VEB en el pronóstico del grupo total de pacientes.

Un último estudio recogiendo únicamente pacientes pediátricos, realizado en Brasil, detecta asociación entre VEB y pacientes de bajo riesgo.[300]

En cualquier caso, los datos obtenidos sugieren la hipótesis de que la inmunosenescencia, o afectación funcional del sistema inmune asociada con la edad, puede contribuir a la aparición del LHc VEB positivos en el grupo de pacientes de mayor edad. Ello podría explicarse por una disminución de la actividad citotóxica mediada por células T, que afectaría al control de la infección latente por VEB, provocando que aumentase el número de células B en estado de infección latente y aumentase así el riesgo de desarrollar LHc VEB positivo.[301, 302]

Otra explicación para comprender el diferente pronóstico del VEB en pacientes jóvenes y adultos enlazaría con las teorías clásicas de MacMahon etc. de que en realidad se trata de entidades biológicamente distintas.[20]

Pese a las dificultades de interpretación y de integración de los resultados mostrados, una cosa es innegable, y es el hecho de que la comprensión del papel que desempeña el VEB en el LHc puede tener importantes aplicaciones prácticas (estadiaje, planificación del tratamiento etc.). Esto nos obliga a continuar avanzando en el estudio de este binomio.

6. JUSTIFICACIÓN

El LHc es un proceso neoplásico de características clínicas, epidemiológicas y biológicas únicas. Es una neoplasia clonal de células B, con células que pierden la expresión de marcadores B debido a un proceso de reprogramación transcripcional. Múltiples factores de transcripción y vías de señalización se encuentran disreguladas en las células HRS.

Se han realizado numerosos estudios epidemiológicos y demográficos, con diferentes objetivos: caracterizar el comportamiento de la enfermedad en una población determinada, comparar diferentes poblaciones, detectar posibles agentes causales de la enfermedad.

En la actualidad sabemos que el LHc se comporta de forma diferente en niños o en adultos y que presenta diferentes patrones en función de factores y condiciones socioeconómicas. Numerosas evidencias apuntan al papel fundamental del VEB en la patogenia de este tumor. No obstante, existen escasos trabajos que estudien de forma comparativa el LHc en población pediátrica y población adulta en una misma zona geográfica.

En los últimos 20 años se han producido importantes avances en el conocimiento de la patogenia de la enfermedad, se ha demostrado que existen alteraciones relevantes a nivel de ciclo celular y de la apoptosis y se ha profundizado en el estudio de la biología molecular del LHc.

Existen múltiples trabajos que han estudiado diferentes alteraciones presentes en las células HRS, como pueden ser alteraciones de vías de señalización, de proteínas de ciclo celular, de factores de transcripción, alteraciones de la apoptosis. Pero no existen trabajos que intenten correlacionar estas alteraciones con variables clínico-epidemiológicas y analizarlo en función de la edad de los pacientes y de la presencia del VEB de forma sistemática.

Con estos preceptos, intentaremos identificar patrones relacionados con diferentes factores (variables epidemiológicas, alteraciones de las proteínas de ciclo celular y de la apoptosis, presencia del VEB) que caractericen de forma diferencial a los pacientes afectados de LHc en función de la edad y que permita avanzar en la comprensión de la fisiopatología de esta enfermedad.

7. OBJETIVOS

7.1. Análisis epidemiológico del LHc en nuestro medio

- Análisis comparativo de la presencia del VEB en pacientes afectados de LHc en nuestro medio en función de la edad. Determinación mediante tres técnicas diagnósticas y análisis del grado de concordancia de las mismas.
- Análisis descriptivo de variables clínico-biológicas en los pacientes afectados de LHc. Estudio comparativo de las mismas en función de la edad y en función de la presencia del VEB en las células HRS.
- Determinación de la influencia del VEB sobre la supervivencia de los pacientes afectados de LHc.

7.2. Caracterización de las alteraciones del ciclo celular y de la apoptosis en el LHc

- Análisis estadístico descriptivo de las alteraciones de las proteínas de ciclo celular y de la apoptosis en pacientes afectados de LHc.
- Establecer si las alteraciones de ciclo celular y de la apoptosis observadas se modifican en función de la edad de los pacientes o de la presencia del VEB.
- Analizar las relaciones existentes entre las diferentes proteínas de ciclo celular y de apoptosis y los cambios que estas experimentan en función de la edad de los pacientes o de la presencia del VEB en el tejido tumoral.
- Determinación de la correlación entre la expresión de las proteínas de ciclo celular y de la apoptosis en las células HRS y la supervivencia de los pacientes afectados de LHc.

8. PACIENTES Y MÉTODOS

8.1. Datos epidemiológicos

Se han analizado de forma retrospectiva 94 pacientes diagnosticados de forma consecutiva de LHc en los que se obtuvo muestra de tejido suficiente para desarrollar los estudios necesarios.

Los pacientes se clasificaron en tres grupos de edad. El motivo de esta clasificación es estudiar de forma comparativa un grupo de pacientes pediátrico, un grupo de adultos jóvenes, y un grupo de adultos de edad avanzada.

Pretendemos en nuestro estudio realizar un análisis comparativo entre el LHc en la edad pediátrica y el LHc en el paciente adulto. Existen algunos trabajos que han estudiado su población afecta de LHc y posteriormente han intentado establecer diferencias en función de la edad. La inmensa mayoría se realizaron en población adulta, y compararon adulto joven y adulto de edad avanzada, otros comparaban los adultos de edad avanzada y muy avanzada intentando establecer factores pronóstico etc.

Algunos trabajos estudiaban, dentro de su muestra, qué características tenían los pacientes pediátricos, pero sin realizar una comparación en el sentido estricto con los pacientes adultos. Los trabajos realizados en población pediátrica mayoritariamente se centran en comparar pacientes de diferentes zonas geográficas.

La pregunta inicial que nos planteamos fue como definiríamos el grupo de pacientes “pediátricos”, donde estableceríamos el límite de edad de este grupo. Considerando la influencia del VEB sobre el LHc y los modelos de las “tres” o incluso las “4 enfermedades”, era evidente que el límite de edad de este grupo debía situarse entre los 15 y los 20 años.

No obstante, como vimos, algunos trabajos que estudiaron de forma diferenciada esos grupos de edad estableciendo el grupo pediátrico entre 0 y 15 años no observaron las diferencias esperables en relación a la presencia del VEB. Además, consideramos relevante el hecho de que en nuestra sociedad el primer pico de incidencia de LHc aparece a partir de los 20 años aproximadamente. [66, 303]

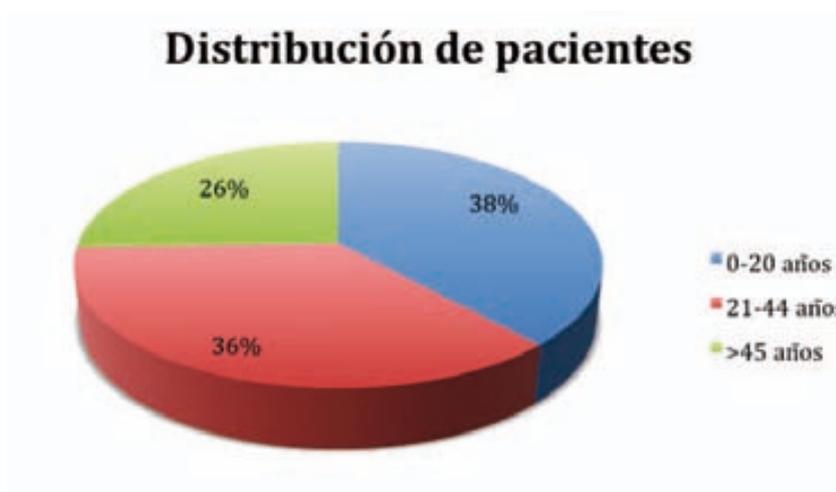
Por último debemos tener en cuenta aspectos metodológicos relacionados con la necesidad de disponer de tres grupos comparables, calibrando el equilibrio entre la homogeneidad de cada grupo y el número final de pacientes en cada uno de ellos, para intentar obtener resultados con significación estadística.

Con todos estos argumentos decidimos finalmente establecer el grupo pediátrico de los 0 a los 20 años.

Los datos obtenidos son los siguientes:

Se realizó un seguimiento medio de los pacientes de 105 meses (entre 24 y 300 meses).
Nuestro grupo de pacientes está compuesto por:

- 36 pacientes de entre 0-20 años (edad: 3-20, media de 13,5 años)
- 34 pacientes de entre 21-44 años (edad: 21-44 años, media de 29,9 años)
- 24 pacientes mayores de 45 años (edad: 45-82 años, media de 60,7 años)



GRUPO CONTROL: pacientes de ambos sexos en los que, por otra enfermedad, se practicara exéresis ganglionar, con ganglios diagnósticamente anatomopatológicamente como sin alteraciones.

Se realizó revisión de las historias clínicas para recoger la información relativa a las variables sociodemográficas y clínicas de los pacientes. Las variables recogidas fueron las siguientes:

- Edad
- Sexo
- Fecha del diagnóstico
- Antecedente de mononucleosis infecciosa
- Serología VEB, serología CMV
- Nivel social de los padres
- Número de hermanos
- Paciente de sexo femenino: número de hijos, abortos, tratamiento con anticonceptivos, antecedente de fibromas uterinos
- Tabaquismo.
- Profesión, contacto con pinturas.
- Síntomas B.
- Masa Bulky
- Estadio en el momento del diagnóstico
- Marcadores analíticos: VSG, LDH
- Subtipo histológico
- Tratamiento realizado
- Respuesta al tratamiento: desaparición de la masa tumoral al finalizar el tratamiento.

- Duración de la respuesta al tratamiento.
- Exitus (si/no, fecha)
- Fallecimiento debido al LHc (si/no)

8.2. Técnicas diagnósticas

8.2.1. Revisión histológica y construcción de las matrices tisulares

Se realizó una revisión histológica de todos los casos para incluirlos en el estudio con arreglo a los criterios de la OMS (2001). Todos los casos fueron valorados por dos patólogos independientemente (JLM, GTM). Los casos discrepantes fueron consensuados en valoración conjunta.

De los bloques de parafina se seleccionaron áreas representativas para la construcción de matrices de tejido ("tissue microarrays"). Para cada caso se seleccionaron varias zonas representativas. Se construyeron varias matrices tisulares con muestras representativas de los casos y controles. Todas las matrices se duplicaron.

Para la recogida de datos se diseñó una plantilla que representaba la ubicación física de cada caso (numero de matriz, fila, columna).

En las matrices tisulares se realizaron las siguientes determinaciones:

1. Tinciones rutinarias: Hematoxilina-eosina
2. Técnicas de inmunohistoquímica:
 - a. Virus de Epstein-Barr: LMP-1, EBNA-2
 - b. Reguladores del ciclo celular y apoptosis: p53, p21, p27, bcl2, bcl-x, bax, p16.
 - c. Ciclinas: ciclina D1, ciclina E, ciclina A, ciclina B1, Ki67
3. Técnicas de hibridación in situ:
 - a. Virus de Epstein-Barr: EBER

La tabla siguiente recoge las clonas y diluciones empleadas en las técnicas de inmunohistoquímica.

	Clona	Dilución
LMP1	CS1-4	1/1000
EBNA-2	R3	1/20
p53	DO7	1/500
p21	Waf1	1/500
p27	Kip1	1/60
Bcl-2	124	1/20
Bcl-x	S-18	1/1000
p16	4C11	1/60
Ciclina D1	SP4	1/20
Ciclina E	13a3	1/60
Ciclina A	6E6	1/30
Ciclina B1	NCL-B1	1/20
Ki67	MIB1	1/600

La positividad se valoró por métodos semicuantitativos valorando la intensidad de la inmunotinción.

Se utilizaron controles positivos de muestras tisulares recomendados por las empresas comercializadoras.

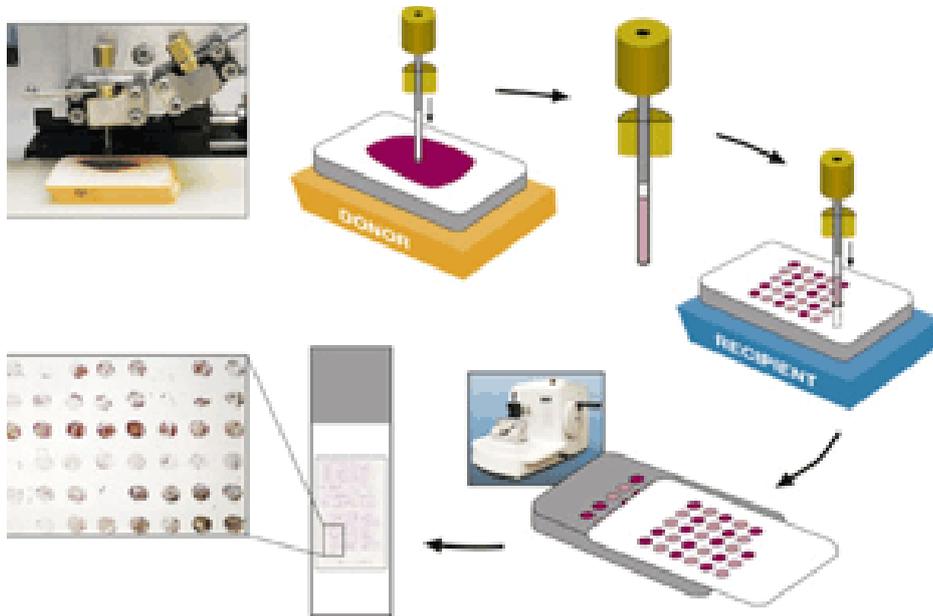


Figura 15: modelo teórico de construcción de MTA

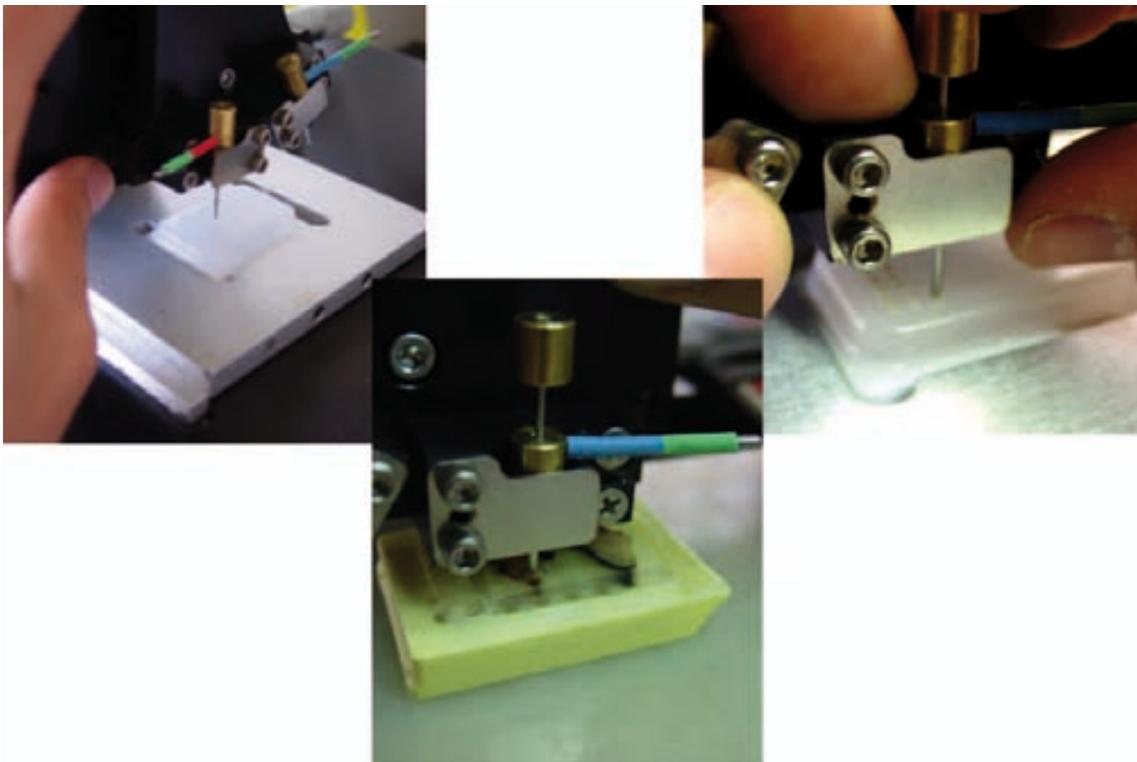


Figura 16: construcción de MTA

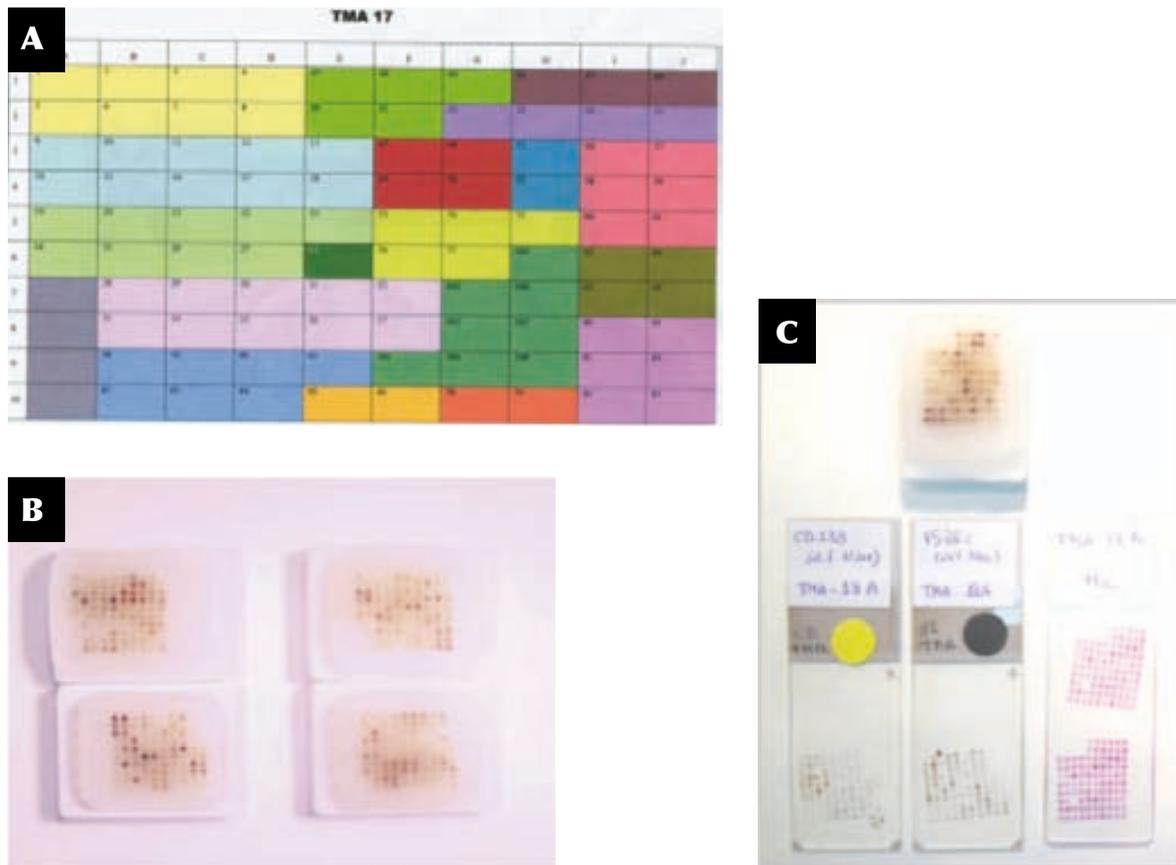


Figura 17: A. plantilla de recogida de datos. B. Matriz definitiva. C. Realización de técnicas inmunohistoquímicas.

8.2.2. Técnicas inmunohistoquímicas

Las siguientes moléculas fueron determinadas por método inmunohistoquímico: LMP-1, EBNA-2, ciclina D1, ciclina E, ciclina A, ciclina B1, , bcl-2, p53, p27, bcl-2, bcl-xl, bax, ki-67.

Brevemente se siguieron los siguientes pasos:

- Desparafinación con xilol de los cortes tisulares (5 u), realizando 3 cambios cada 5 minutos.
- Hidratación de la muestra, con concentraciones progresivamente decrecientes de alcoholes (3 minutos en cada uno), hidratando al final con agua destilada durante 5 minutos.
- Digestión enzimática con saponina, con lavados posteriores con PBS
- Secado de los portas en torno al tejido, aplicando sobre éste suero e incubando durante 20-30 minutos.
- Tras desechar el exceso de suero normal por decantación, se aplicó el AC primario, a una dilución de 1:30, dejándolo incubar toda la noche.
- Lavado de las secciones con PBS en tres ocasiones, 5 minutos cada vez.
- Secar las preparaciones en torno al tejido, con incubación posterior del mismo con el anticuerpo secundario durante 30 minutos.

- Nuevo lavado con PBS e incubación de las muestras con peróxido de hidrógeno al 6% en PBS.
- Lavados con PBS (5 minutos) en tres ocasiones, e incubación posterior con el complejo terciario ABC (Avidin Biotin Complex), durante 50 minutos.
- Lavados con PBS en tres ocasiones (5 minutos cada vez).
- Incubación con Tritón X-100 al 0.5% en PBS, durante 30 segundos.
- Incubación de las secciones en DAB diaminobencidina durante 5 minutos, controlando el viraje de color.
- Lavado con agua destilada durante 5 minutos
- Contraste con hematoxilina de Harris durante 1 minuto.
- Deshidratación en alcoholes de gradación creciente (10 inmersiones cada vez) e inmersión en xilol durante tres minutos antes de cubrir la preparación.

La evaluación posterior de los resultados de inmunohistoquímica se realizará de forma independiente por dos patólogos, valorando en cada caso la intensidad y la extensión del marcaje inmunohistoquímico.

8.2.3. Técnicas de hibridación in situ

La determinación del virus de Epstein-Barr se hizo con la técnica hibridación in situ EBER. Brevemente:

- Secciones de 5 micras desparafinización y deshidratación
- Lavar con agua destilada
- Inhibir la peroxidasa endógena durante 10 min, en cámara húmeda
- Lavar con agua destilada
- Cubrir el tejido con una solución de proteínasa K (-20º) añadir 200 lambdas de PBS al vial, incubar en cámara húmeda a temperatura ambiente
- Lavar con agua.
- Lavar con PBS'
- Secar alrededor del tejido y poner la sonda
- Colocar en cámara húmeda en estufa a 62º durante 45'
- Lavar PBS
- Incubar con anti-digoxigenina 20'
- Lavar con PBS
- Incubar con el polímero conjugado
- Lavar PBS
- Lavar agua destilada
- Revelar con DAB '
- Contrastar con hematoxilina
- Lavar con agua
- Deshidratar y montar.

8.2.4. Técnicas de amplificación genética (PCR)

La detección del ADN-VEB en el ADN extraído se realizó mediante la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Esta técnica consta de una fase preliminar de preparación de la muestra y una fase posterior de detección de la proteína de la cápside del VEB gp 220. Para la realización y estandarización de la misma se aplicó el modelo desarrollado por Telenti et al. [304]

I. Preparación de la muestra

La extracción del ADN de las muestras de biopsia incluidas en parafina se realizó según la técnica descrita a continuación.

- Obtención de las muestras de biopsia incluidas en parafina de secciones de 10 um de espesor.
- Desparafinación de la muestra 2 veces con xileno.
- Centrifugación a 14.000 rpm durante 2 min.
- Lavados con etanol y posterior secado de los pellets.
- Resuspensión en 100 ul de tampón K recién preparado (50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl (pH 8.3), 2.5 mM MgCl₂, 0.5% Tween 20 y 100 ug/ul de proteinasa K).
- Incubación a 55 °C durante 18-24 h.
- Inactivación de la proteinasa K a 94°C durante 9 min,
- Centrifugado y conservación a -20°C hasta su análisis.

II. Detección del ADN-VEB por detección gp 220

La detección del ADN-VEB en el ADN extraído se realizó mediante la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), utilizando iniciadores específicos para la proteína gp 220 de la cápside del VEB (región Bam H1): 5':GGCTGGTGTACCTGTGTTA 3' Y 5':CCTTAG-GAACAAGTCCC 3'.

Se amplificaron 5 ul de lisado en un volumen de reacción de 50 ul con el siguiente contenido: 16 mM (NH₄)₂SO₄, 67 mM Tris-HCl (pH 8.8), 0.01% Tween 20, 1.5 mM, MgCl₂, 200 mM de cada Dntp (Pharmacia, Suecia), 25 pmol de cada iniciador (Diasorin, Saluggia, Italia), y 2.5 U de Taq ADN polimerasa (Biotaq, Bioline, Reino Unido).

El análisis de los amplificados se efectuó mediante electroforesis en gel de agarosa al 2%, teñido con bromuro de etidio, junto con un marcador de peso molecular adecuado. Posteriormente los geles se observaron con luz ultravioleta y se fotografiaron. Se consideraron positivas para la gp220 del VEB las muestras que presentaban una banda de 239 pb.

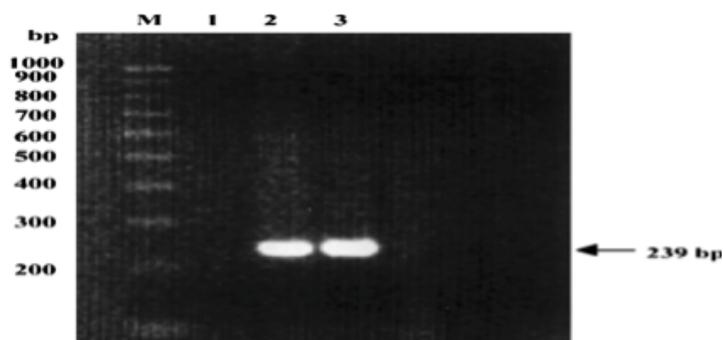


Figura 18: Electroforesis en gel de agarosa de los productos de PCR obtenidos de la amplificación del gp220 del VEB. Línea M, macador de peso molecular (100-1000 pb); línea 1, control negativo, línea 2, control positivo de DNA de VEB; línea 3, tejido pafinado de paciente con LHc. En las líneas 2 y 3 se observa producto de amplificación de 239 bp, específico de gp 220 de VEB.

8.3. Metodología estadística

En este estudio disponemos de algunas variables cuantitativas, pero la mayoría serán variables categóricas, la mayoría de ellas binarias.

Las variables cuantitativas se describirán mediante estadísticos descriptivos (media, cuartiles, desviación estándar, mínimo, máximo) y se comparará su distribución entre grupos mediante el test de Kruskal-Wallis (no paramétrico). Las variables cualitativas se describirán mediante su tabla de frecuencias, y se compararán entre ellas mediante la tabla de contingencias. Realizaremos el test Chi-cuadrado (o el test exacto de Fisher, cuando el tamaño muestral sea demasiado pequeño) sobre la hipótesis de independencia entre las variables.

Se estimará la curva del tiempo de supervivencia desde el diagnóstico hasta el exitus mediante el método de Kaplan-Meier, y se comparará la supervivencia entre diferentes grupos mediante el test log-rank y el modelo de riesgos proporcionales de Cox.

En general se consideran significativos los tests con p-valor menor que 0.05 (nivel de significación alfa del 5%).

Se utiliza el software estadístico libre R 3.0 para los cálculos.

R Core Team (2012). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0, URL <http://www.R-project.org/>.

8.4. Aspectos éticos

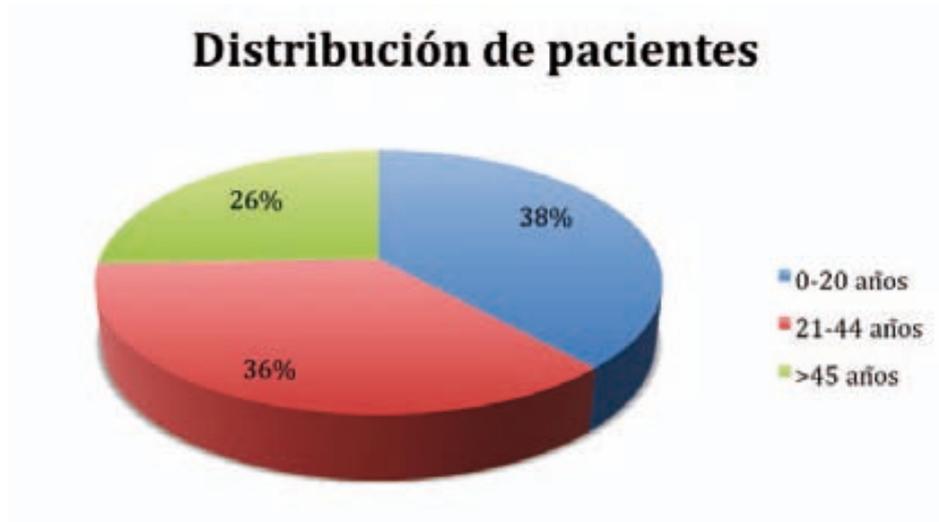
Este estudio fue revisado y avalado por la Comisión de Investigación y aprobado por el Comité de Ética de Investigación Clínica del Hospital Universitari Germans Trias i Pujol.

Para la realización de este trabajo de Tesis se ha dispuesto de una Beca del Fondo de Investigaciones Sanitarias (FIS) del Instituto Carlos III con el proyecto titulado "Infección por virus de Epstein-Barr en pacientes pediátricos y adultos afectados de enfermedad de Hodgkin. Alteraciones asociadas del ciclo celular y apoptosis". Expediente nº PI021105, años 2003-2005.

9. RESULTADOS

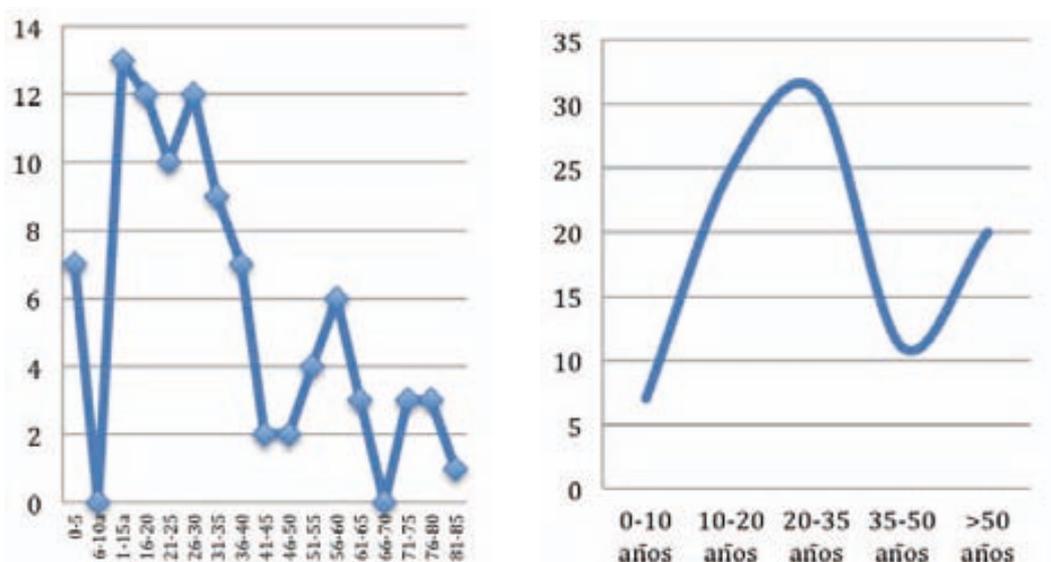
9.1. PARTE I: RESULTADOS EPIDEMIOLÓGICOS

Población muestral y distribución por franjas de edad



Los pacientes se han dividido en tres grupos de estudio.

Si analizamos su distribución de forma más detallada observamos que existen únicamente siete pacientes menores de 10 años, un gran número de los pacientes se acumulan entre 10 y 20 años (25 pacientes) y entre los 21 y los 35 años (31 pacientes), configurando un pico de prevalencia, y existe un segundo pico de pacientes que se sitúa en el grupo de mayores de 50 años (20 casos).



9.1.1. Estudios de concordancia de las técnicas diagnósticas de la infección por el VEB

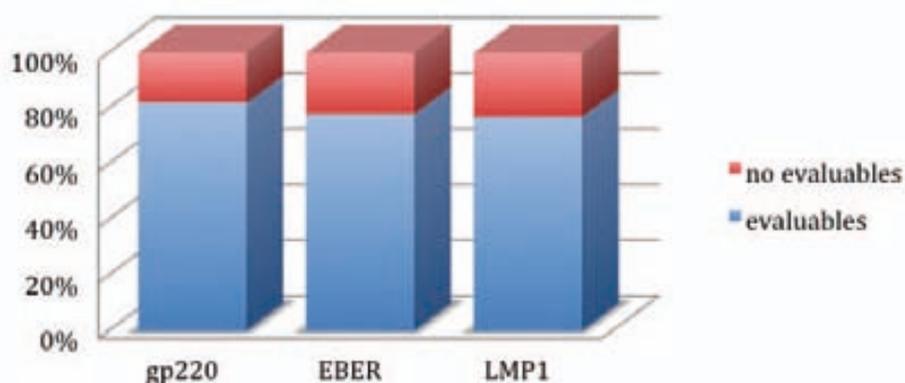
Inicialmente analizamos las muestras evaluadas mediante las tres técnicas, para descartar que exista un sesgo debido a que cada técnica estudie pacientes diferentes.

Las determinaciones de EBER y LMP1 se realizan sobre el MTA, con lo que es esperable que las pérdidas sean similares. Observamos que existen un 22-23% de pérdidas de pacientes, siendo exactamente los mismos (20 casos no evaluables mediante EBER, 21 casos no evaluables mediante LMP1). Esto garantiza que los resultados entre ambas técnicas son absolutamente comparables.

Si estudiamos qué ocurre con la determinación de la infección mediante DNA-PCR gp220, que se realiza de forma individual en muestra de cada paciente y no en MTA, podemos observar que solo el 18% de las muestras no son evaluables (16 pacientes) y únicamente en 3 casos en los que tenemos el diagnóstico mediante las otras dos técnicas no se puede realizar el diagnóstico mediante gp220. Es decir, en algunos casos tendremos únicamente información de la posible infección mediante gp220 y no mediante las otras dos técnicas.

Por lo tanto, podemos decir que las muestras estudiadas mediante las tres técnicas son prácticamente idénticas, con algunos pacientes más en el grupo de estudio mediante PCR. En consecuencia, si obtenemos resultados diferentes, esta diferencia deberá ser atribuida a cuestiones inherentes a las propias técnicas diagnósticas y no a que se estudien pacientes diferentes con cada una de ellas.

Muestras evaluables para el diagnóstico de infección por VEB



A continuación procedemos a estudiar la dependencia y coincidencia de las tres técnicas. Para ello usaremos los índices chi cuadrado y el índice Kappa de Cohen.

Las tres técnicas comparadas entre ellas dos a dos muestran una dependencia estadísticamente significativa, con $p < 0.05$ en los tres casos.

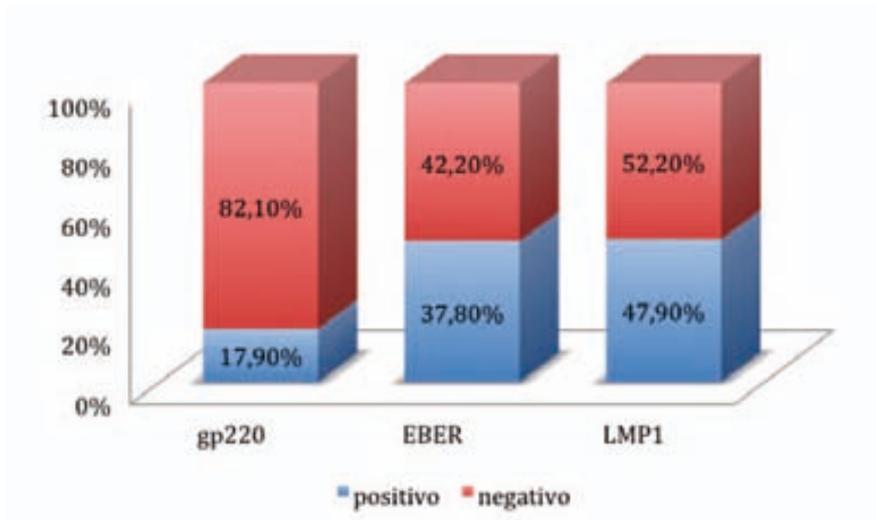
No obstante, el índice estadístico más específico para estudiar coincidencia entre variables es el índice kappa de Cohen. En este caso obtenemos una coincidencia de 0.42 entre EBER y LMP1, que se considera un grado de coincidencia moderado. Si analizamos la concordancia entre estas técnicas en cada grupo de edad observamos que la concordancia

entre EBER y LMP1 es buena, del orden de 0.60-0.65 tanto en el grupo de 0-20 años como en el de mayores de 45 años, siendo más baja en el grupo de 20-45 años.

Existe una baja coincidencia tanto entre PCR y EBER como entre PCR y LMP1.

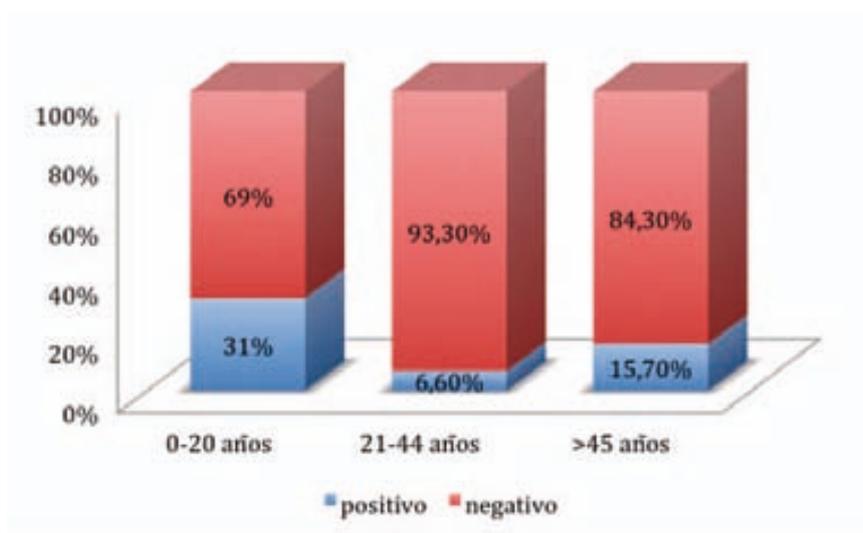
9.1.2. Infección por VEB

Infección por VEB en el grupo muestral



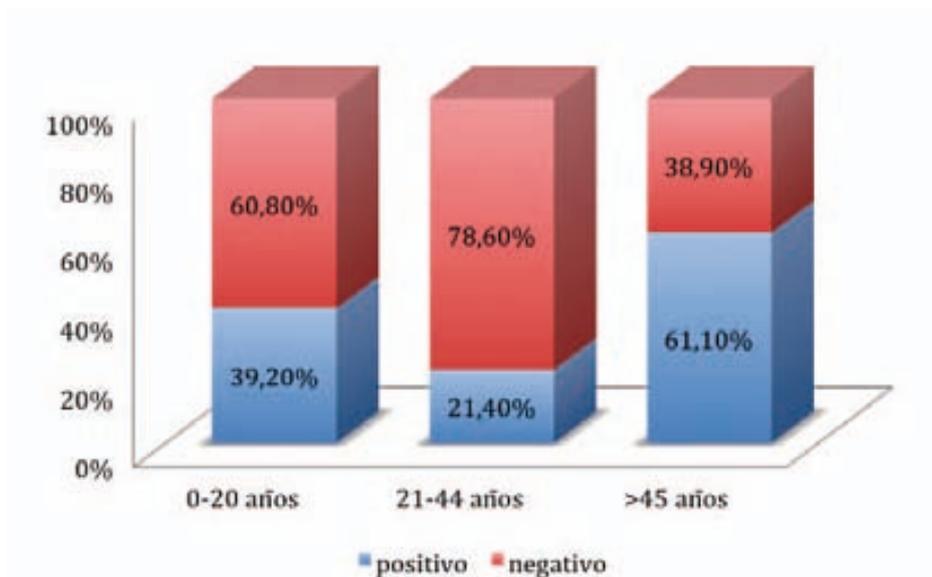
Infección por VEB por grupos de edad (diagnóstico mediante DNA gp220)

Esta técnica es especialmente útil para el diagnóstico de la infección por el VEB en el grupo de edad de 0-20 años, con una diferencia respecto a los otros dos grupos de edad que es estadísticamente significativa ($p=0.047$ en el test exacto de Fisher).



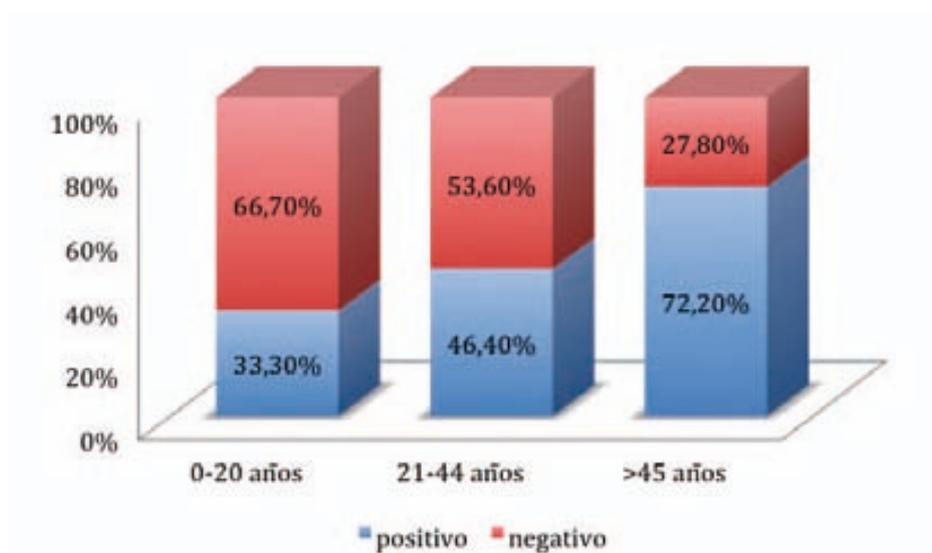
Infección por VEB por grupos de edad (diagnóstico mediante EBER)

En este caso hay muchos más casos de VEB positivos en el grupo de más de 45 años (61.11%) que en el de 0-20 años (39.27%) y sobretodo que en el 21-44 años (21.43%), y esta diferencia también es estadísticamente significativa. ($p=0.025$ en el test chi-cuadrado)



Infección por VEB por grupos de edad (diagnóstico mediante LMP1)

De nuevo existe dependencia significativa entre el VEB (diagnosticado mediante LMP1) y la edad, puesto que existen muchos más casos positivos en el grupo de pacientes mayores de 45 años (72.22%) que en el de 21-44 años (46.43%) y sobretodo que en el 0-20 años (33.33%). ($p=0.037$ en el test chi-cuadrado).

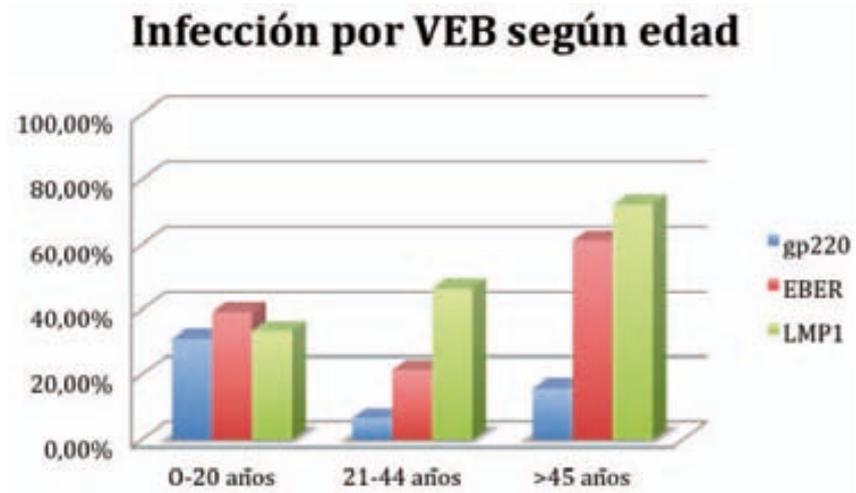


En resumen, mediante las 3 técnicas se demuestra que existe una presencia diferente del VEB en los pacientes en función de la edad, y esta diferencia es estadísticamente significativa.

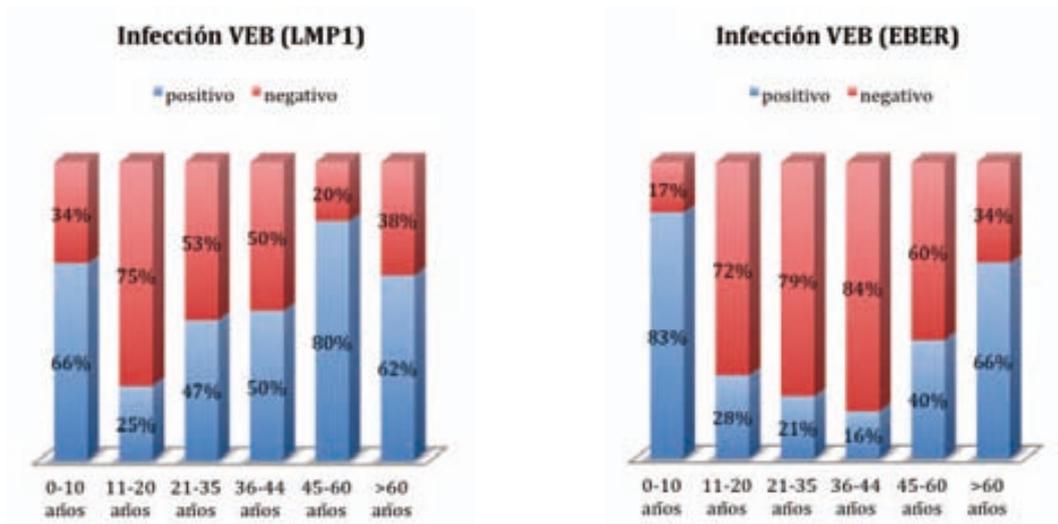
Cuando realizamos el estudio del VEB mediante EBER o LMP1 se observan más casos VEB positivo en el grupo de mayores de 45 años; en cambio, cuando el estudio se realiza

mediante DNAgp220 se observan más casos VEB positivos en el grupo de 0-20 años. EBER y LMP1 obtienen resultados similares en el primer y tercer grupo de pacientes, pero resultados significativamente diferentes en el grupo de 21 a 45 años.

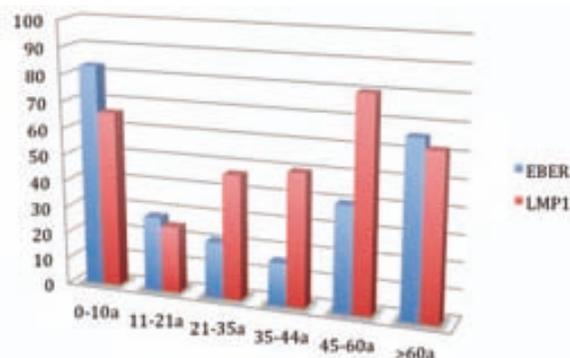
Observamos en la siguiente tabla, de forma conjunta y resumida, los datos anteriores.



Si analizamos con más profundidad la relación entre edad de los pacientes e infección por el VEB comprobamos tanto mediante EBER como mediante LMP1 que el VEB está más presente en el grupo de 0-10 años y en los pacientes mayores de 45 años (especialmente en los mayores de 60 años). (Figura 19)



Lo mostramos a continuación de forma integrada:



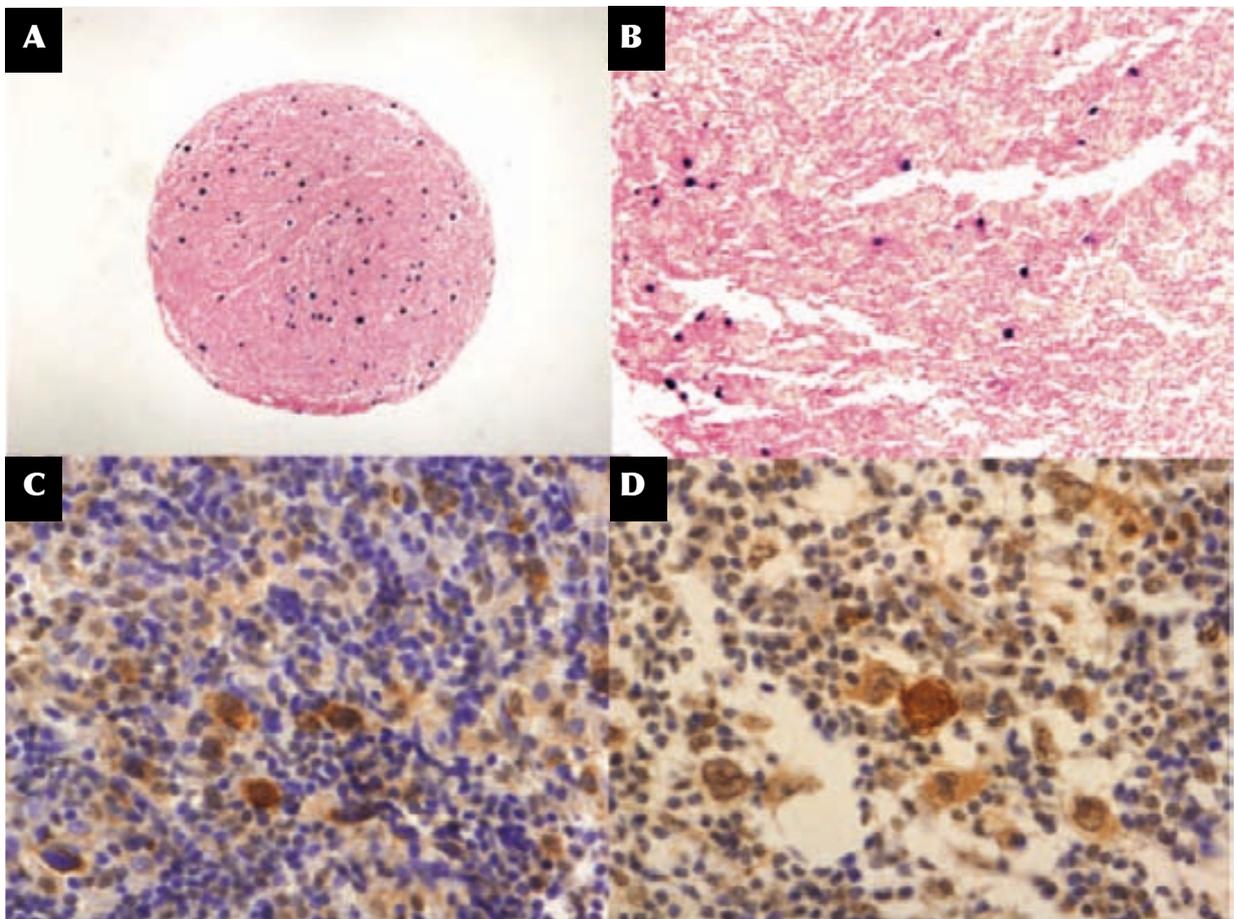
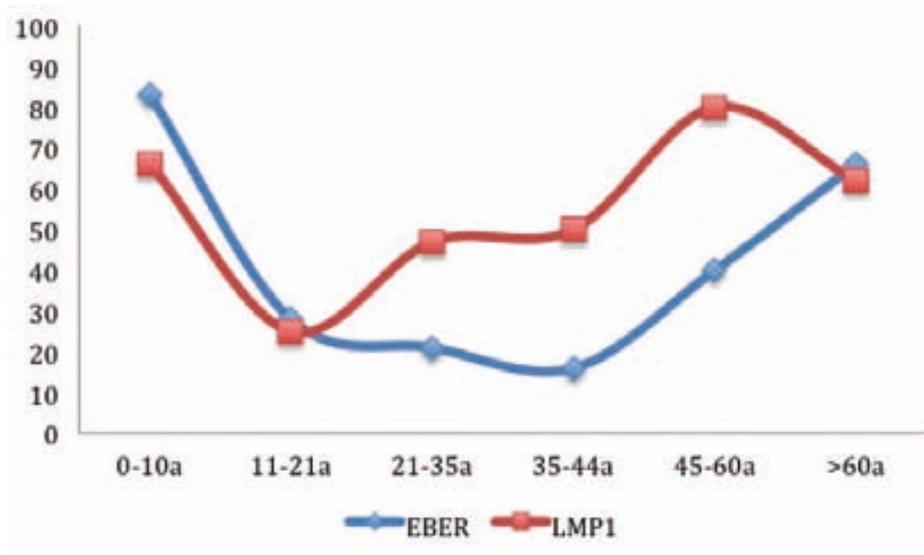


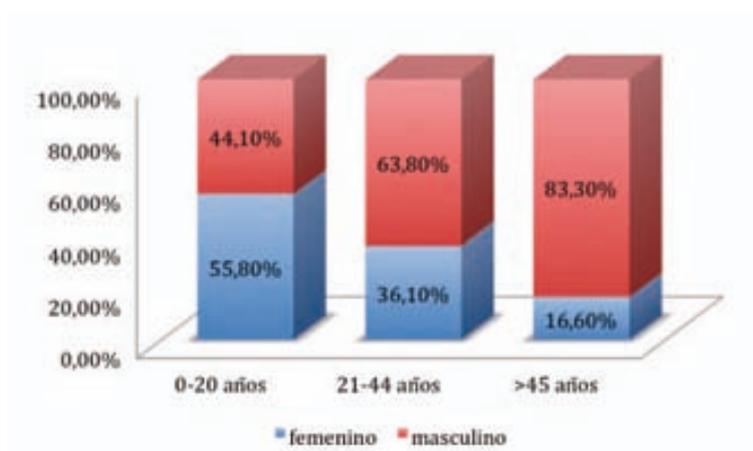
Figura 19: **A.** Hibridación in situ. Distribución de la positividad para VEB en una de las muestras de la matriz de tejido. **B.** Detalle de la positividad de las células neoplásicas para EBER. **C.** Inmunotinción para LMP-1 en las células tumorales. **D.** Expresión de LMP-1 en membrana con variable intensidad en las distintas células tumorales.

9.1.3. Distribución del LHc por sexo

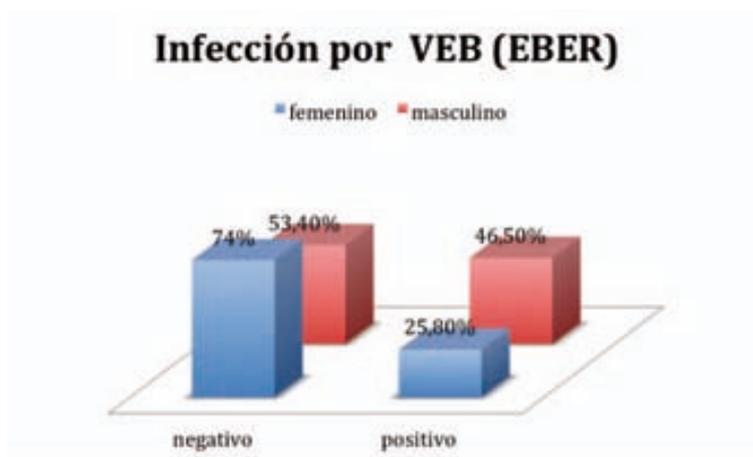


La razón entre varones y mujeres fue de 1.6 : 1.

Hay una dependencia estadísticamente significativa entre el sexo y la edad, observando mayor presencia de varones cuanto mas edad presentan. ($p=0.009$ en el test chi-cuadrado)

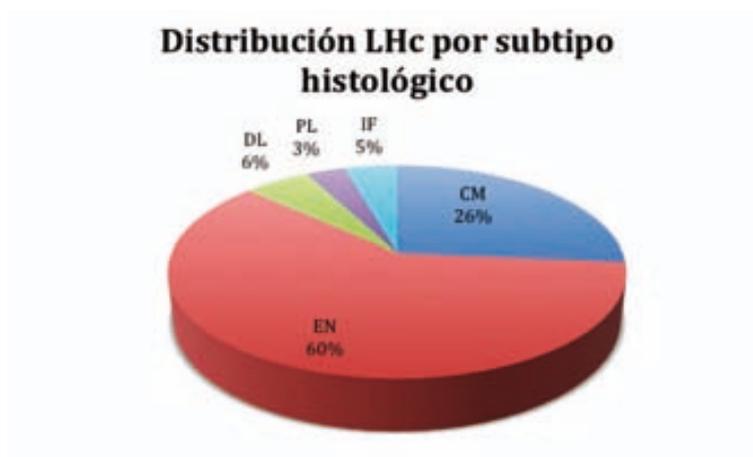


Si analizamos la relación entre el género de los pacientes y el VEB, se observa una mayor presencia de VEB (diagnosticado mediante EBER) en hombres que en mujeres, cercana a ser estadísticamente significativa ($p=0.07$ en test chi-cuadrado). Por las otras dos técnicas no apreciamos diferencias significativas.



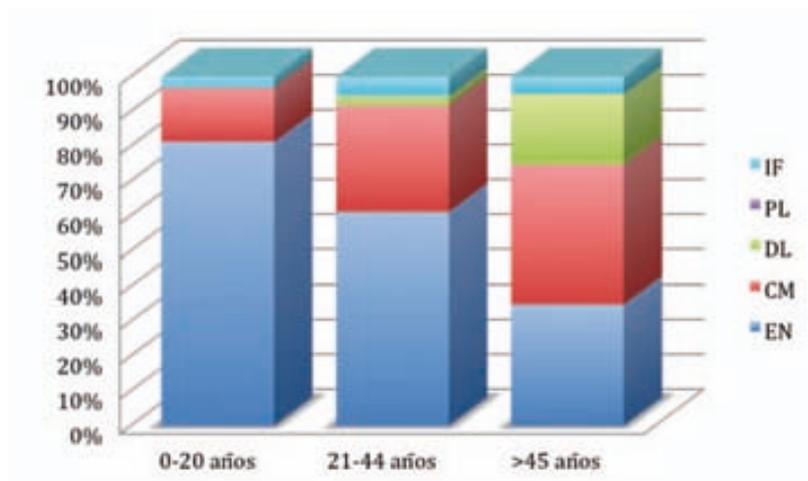
9.1.4. Distribución del LHc por subtipo histológico

La mayor parte de los pacientes son del subtipo EN (60.4%), seguido por el subtipo CM (26.4%).



Subtipo histológico y edad

El subtipo EN es el más frecuente en el grupo de 0-20 años (15.63%) y en cambio en el grupo de mayores de 45 años el subtipo más frecuente es CM (34.78%). Estas diferencias en función de la edad son estadísticamente significativas ($p=0.001$ en el test exacto de Fisher)

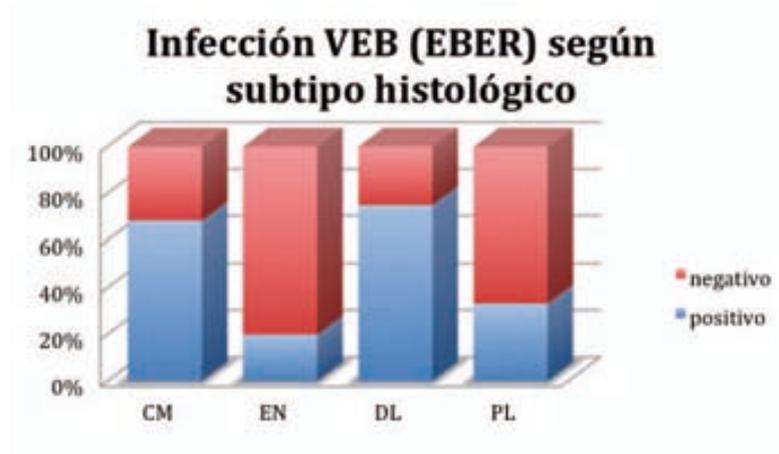


Subtipo histológico y VEB

Hay una dependencia significativa entre el subtipo histológico y el VEB (diagnosticado mediante EBER). Los casos de LHc subtipo CM son mayoritariamente VEB positivos, mientras que los casos LHc subtipo EN acostumbran a ser VEB negativos. ($p=0.0001$ en el test exacto de Fisher).

Observamos idéntico resultado cuando estudiamos la presencia del VEB mediante LMP1, aunque sin alcanzar la significación estadística ($p=0.09$ en el test exacto de Fisher).

No observamos dependencia cuando lo estudiamos mediante DNA gp220.

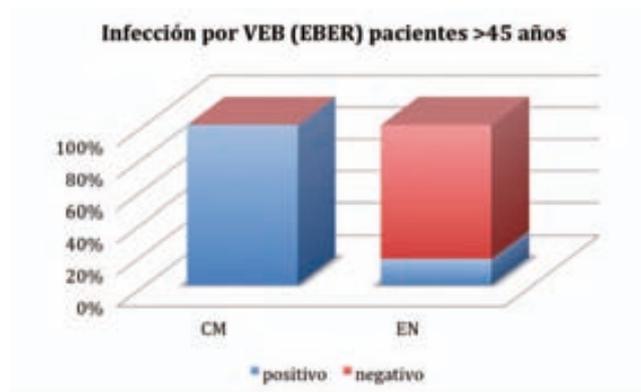
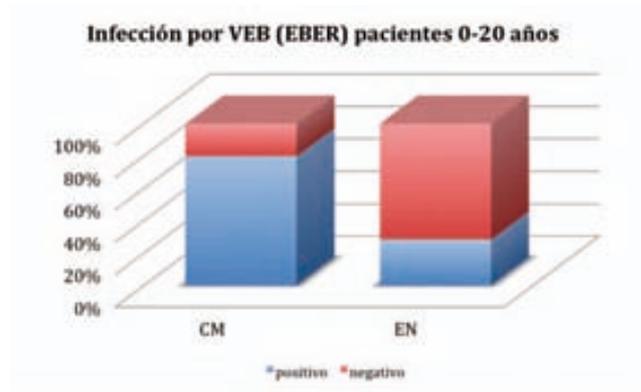


Subtipo histológico y VEB por grupos de edad

El grupo de 0-20 años muestra la misma relación entre el VEB y subtipo histológico que el grupo general. Esta relación es estadísticamente significativa tanto cuando determinamos al VEB mediante EBER ($p=0.027$ en el test exacto de Fisher) como si lo hacemos mediante LMP1 ($p=0.035$ en el test exacto de Fisher). También se observa una clara tendencia mediante gp220 ($p=0.09$ en el test exacto de Fisher).

En el grupo de pacientes de mayores de 45 años se observa relación entre subtipo CM y el VEB únicamente cuando lo determinamos mediante EBER. (Figura 20)

En el grupo de pacientes de 20-45 años no se aprecian dependencias.



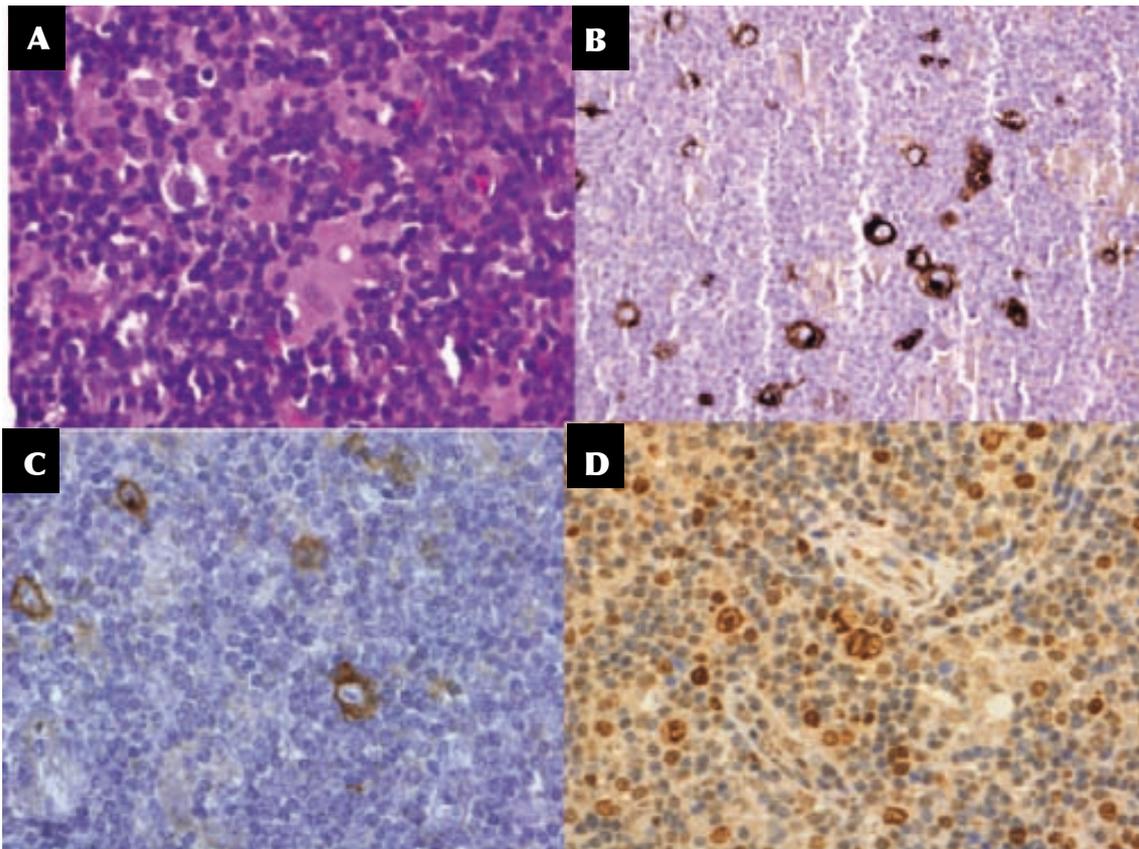
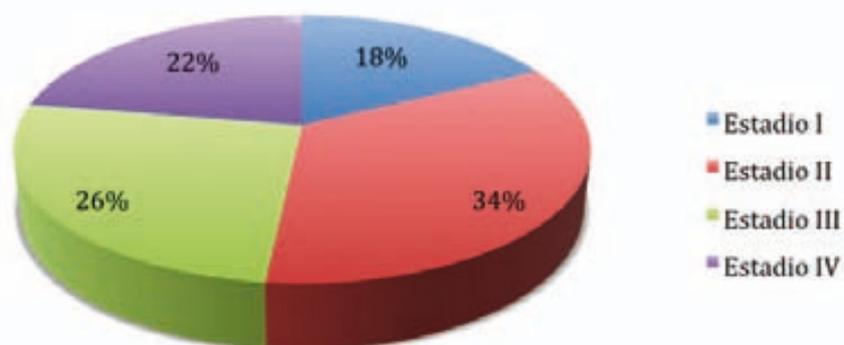


Figura 20: A. LHC subtipo CM. Presencia de células RS. B. Inmunotinción para CD15 en células neoplásicas de LHC subtipo CM. C. Inmunotinción para CD30. intensa positividad de membrana y citoplasma en las células tumorales. D. Inmunoexpresión de Ki67-MIB1 de las células en ciclo celular. Se observa positividad en células neoplásicas y en células del fondo.

9.1.5. Distribución del LHC en función del estadio

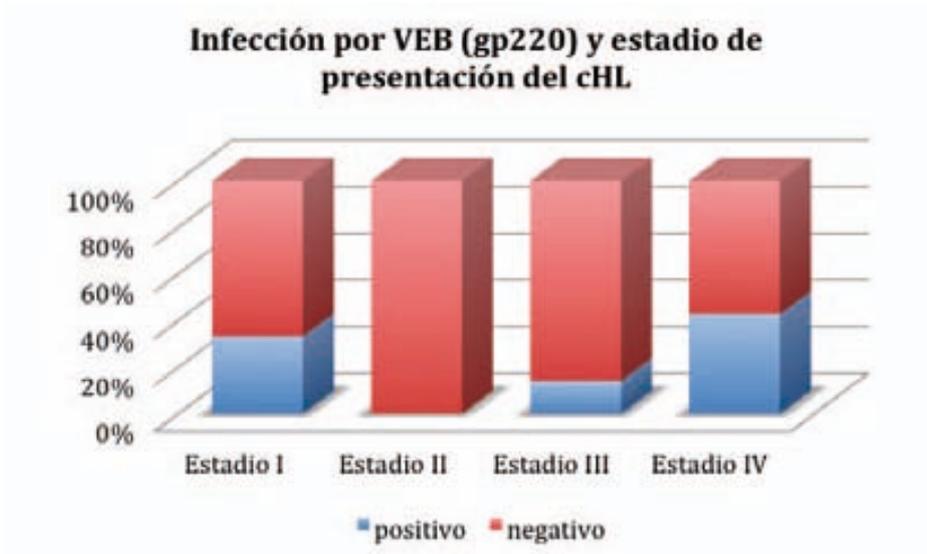
No hay ningún tipo de dependencia entre la edad y el estadio de presentación de la enfermedad. ($p=0.96$ en el test exacto de Fisher).

Estadio de presentación del LHC



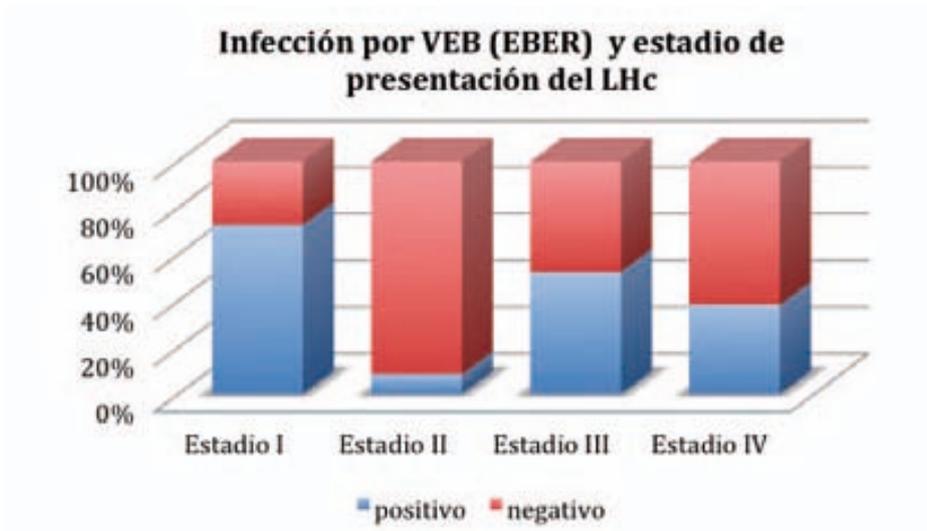
Estadio de presentación y VEB

Hay una dependencia significativa entre el estadio y la presencia del VEB determinándolo mediante DNA gp220, de forma que se observan más casos de LHc VEB positivos en los pacientes que se presentan en estadio IV. (p=0.001 en el test exacto de Fisher)



En cambio, si determinamos al VEB mediante EBER observamos que el VEB se asocia con estadio I, y esta dependencia también es estadísticamente significativa. (p=0.0006 en el test exacto de Fisher)

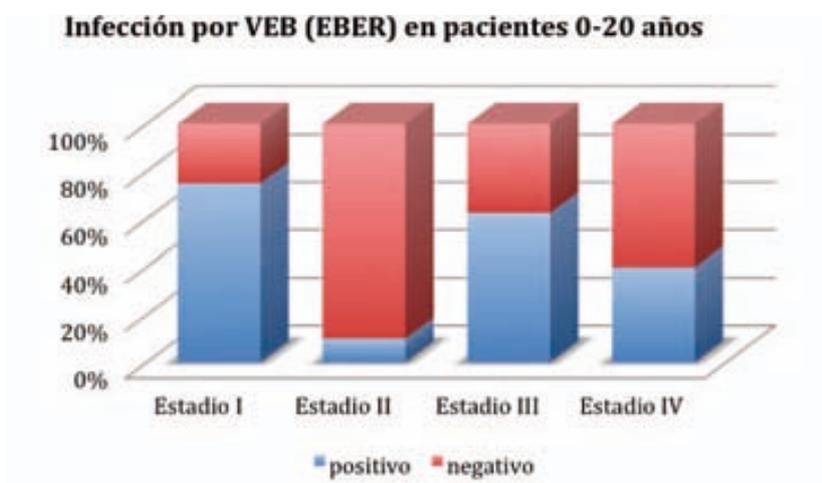
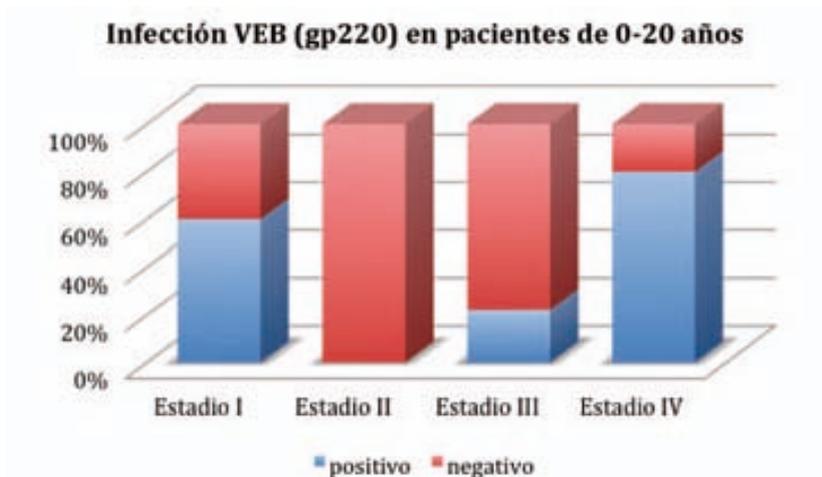
No se observa dependencia entre estadio y VEB si lo determinamos por LMP1 (Pearson's Chi cuadrado p=0.159)



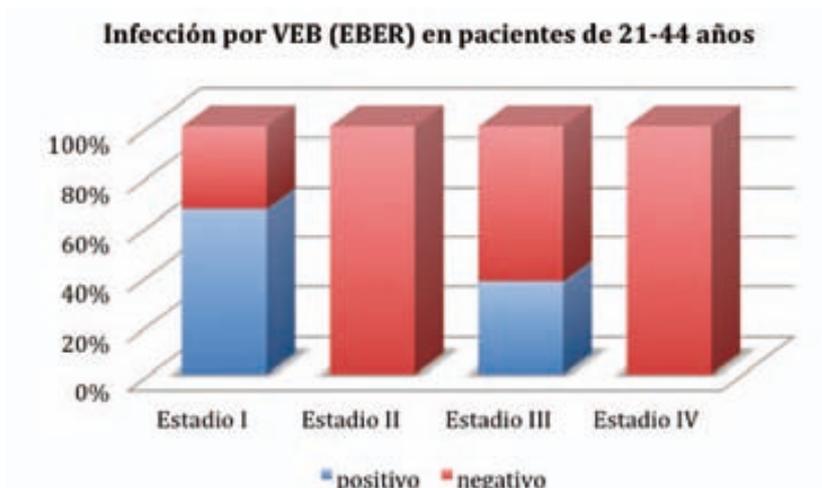
Relación estadio y VEB por grupos de edad

En el grupo de pacientes de 0-20 años observamos lo mismo que en el grupo general, es decir, asociación estadísticamente significativa entre VEB (diagnosticado mediante DNA gp220) con estadio IV de presentación (p=0.0037 en el test exacto de Fisher) y en cambio asociación con estadio I y en este caso también con estadio III tanto si el diagnóstico se rea-

liza mediante EBER ($p=0.044$ en el test exacto de Fisher) como si se realiza mediante LMP1 ($p=0.021$ en el test exacto de Fisher).



Observamos la misma relación, también estadísticamente significativa, entre el VEB (determinado mediante EBER) y estadio I y III en el grupo de 21-44 años ($p=0.018$ en el test exacto de Fisher).

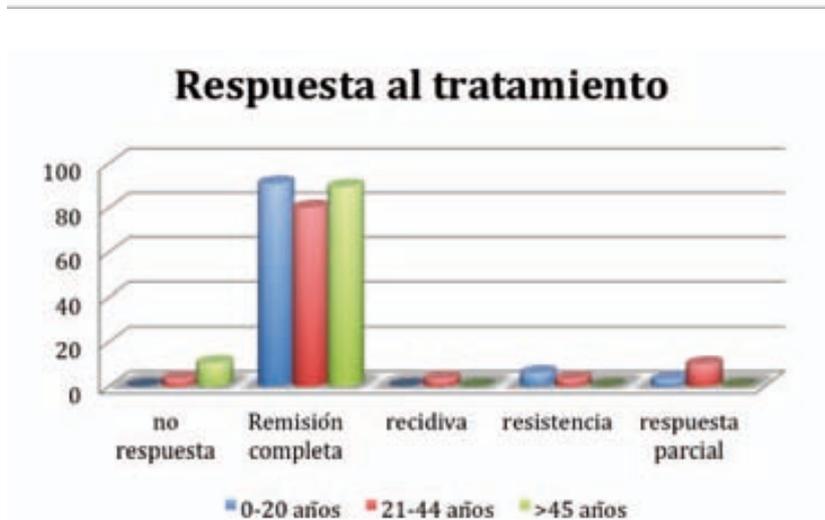


No obstante, pese a la significación estadística observada, el pequeño tamaño muestral de cada grupo hace que estos datos deban ser interpretados con precaución.

No se observan dependencias significativas entre estadio y el VEB en el grupo de pacientes mayores de 45 años por ninguna de las tres técnicas.

9.1.6. Distribución del LHC en función de la respuesta al tratamiento

La gran mayoría de pacientes tienen respuesta del tipo remisión completa, mientras que las otras cuatro categorías tienen unas frecuencias muy bajas. Esto hace que no se observen diferencias significativas entre los tres grupos de edad ($p=0.32$ en el test exacto de Fisher) ni tampoco en función de la presencia o no de infección por el VEB ($p=0.97$ en el test exacto de Fisher).



9.1.7. Supervivencia según edad

Para el análisis de supervivencia disponemos de información de 85 de los 94 pacientes (90% del total). Si estimamos la función de supervivencia para cada grupo de edad mediante el método de Kaplan-Meier, obtenemos las siguientes estimaciones de la probabilidad de supervivencia para cada grupo, conjuntamente con sus intervalos de confianza al 95%:

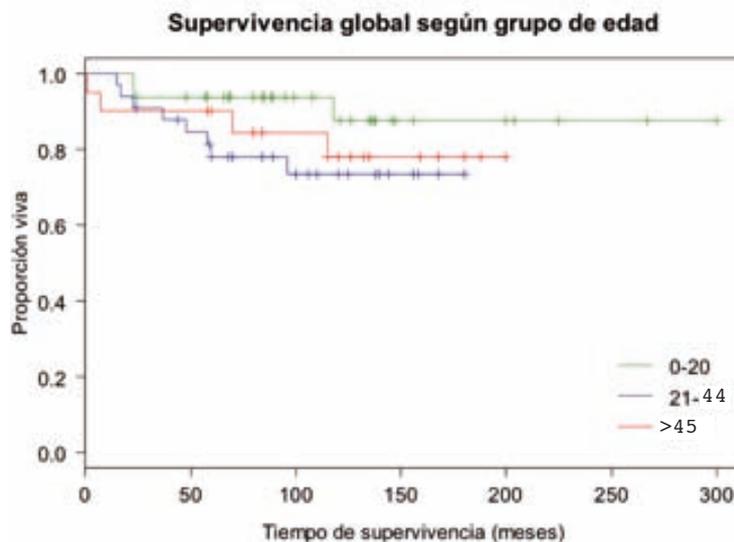
edad=0-20
 survival std.err lower 95% CI upper 95% CI
 0.875 0.0724 0.744 1

edad=21-44
 survival std.err lower 95% CI upper 95% CI
 0.733 0.0827 0.588 0.914

edad=45+
 survival std.err lower 95% CI upper 95% CI
 0.779 0.0989 0.607 0.999

Es decir, las estimaciones son que el 87.5% IC(74.4%, 100%) del grupo 0-20 años sobrevive; el 73.3% IC(58.8%, 91.4%) del grupo 21-44 años sobrevive; y el 77.9% IC(60.7%, 99.9%) del grupo de mayores de 45 años sobrevive.

Las estimaciones de las curvas de supervivencia para cada grupo:



A continuación realizamos el test log-rank para analizar si la supervivencia es la misma en los tres grupos de edad:

n=85, 9 observations deleted due to missingness.

	N	Observed	Expected	(O-E) ² /E	(O-E) ² /V
edad=0-20	32	3	5.78	1.338	2.1892
edad=21-44	33	8	5.50	1.131	1.8025
edad=45+	20	4	3.71	0.022	0.0295

Chisq= 2.5 on 2 degrees of freedom, p= 0.286

Con estos resultados, no podemos considerar que haya diferencias significativas en la supervivencia de los tres grupos (p=0.286 en el test log-rank).

Realizamos también el modelo de regresión de riesgos proporcionales de Cox sobre los grupos de edad (tomando el grupo 0-20 años como la referencia):

n= 85, number of events= 15
 (9 observations deleted due to missingness)

```

coef exp(coef) se(coef) z Pr(>|z|)
edad21-44 1.029 2.797 0.677 1.52 0.13
edad45+ 0.725 2.065 0.765 0.95 0.34

exp(coef) exp(-coef) lower .95 upper .95
edad21-44 2.80 0.357 0.742 10.55
edad45+ 2.07 0.484 0.462 9.24

Concordance= 0.619 (se = 0.073 )
Rsquare= 0.03 (max possible= 0.774 )
Likelihood ratio test= 2.63 on 2 df, p=0.269
wald test = 2.31 on 2 df, p=0.315
Score (logrank) test = 2.48 on 2 df, p=0.289
    
```

Los grupos de edad 21-44 años y mayores de 45 años tienen un riesgo superior a la referencia 0-20 años (HR=2.80 y HR=2.07, respectivamente, donde HR es el Hazard Ratio), pero ninguno de los dos es significativo (p=0.13 y p=0.34, respectivamente).

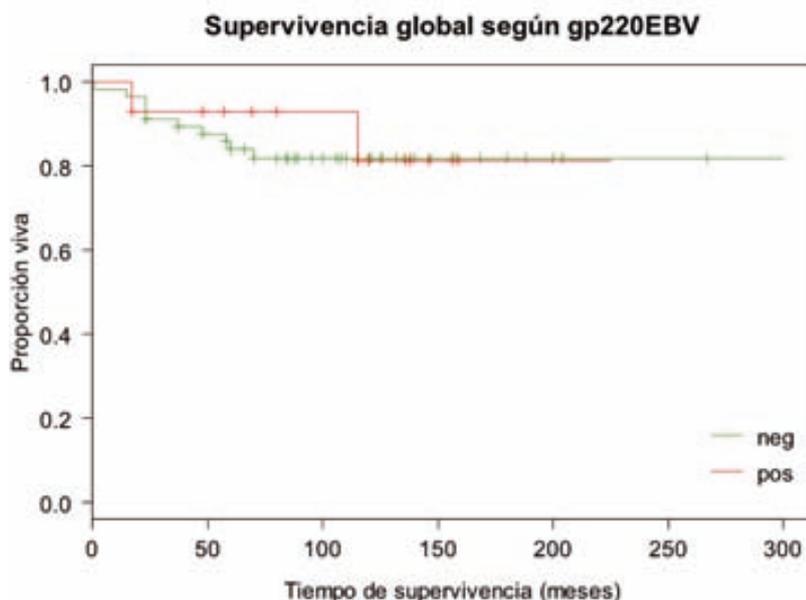
9.1.8. Supervivencia en función del VEB

A continuación comparamos la supervivencia entre los tres grupos de edad en función del VEB mediante el test log-rank. Si encontramos diferencias significativas realizamos también el modelo de riesgos proporcionales de Cox y recogemos los datos en un gráfico de comparación de las curvas de supervivencia.

Determinación VEB mediante DNA gp220

No podemos considerar que haya diferencias significativas de la supervivencia en función de la presencia del VEB (p=0.76 en el test log-rank).

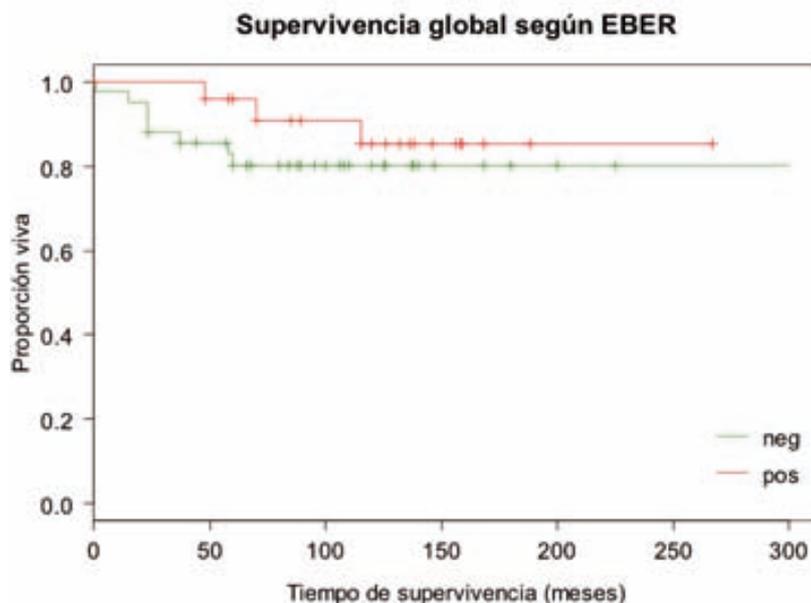
Aplicando el modelo de Cox observamos que los pacientes con VEB positivo tienen un riesgo menor (HR=0.79) que los que lo tienen negativo, pero no es nada significativo (p=0.76).



Determinación del VEB mediante EBER

Tampoco hay diferencias significativas en la supervivencia en función del VEB cuando lo determinamos mediante EBER. ($p=0.34$ en el test log-rank)

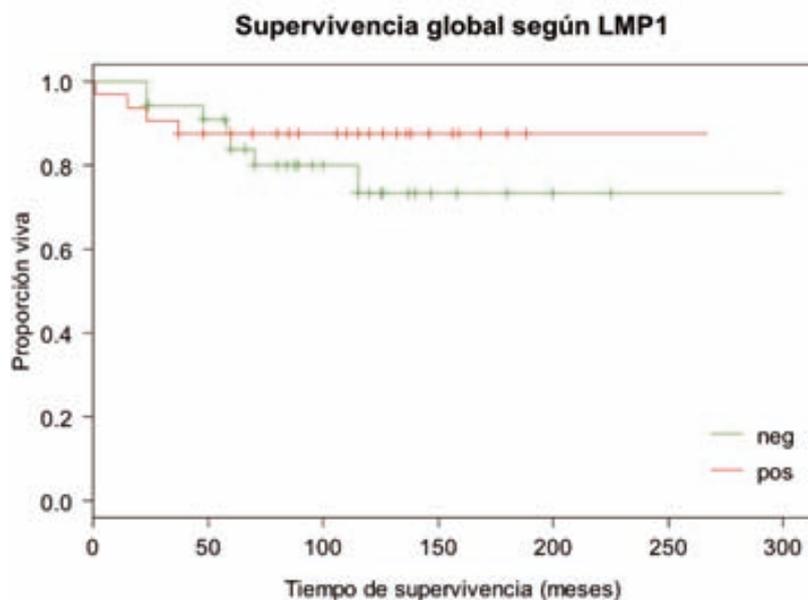
Cuando aplicamos el modelo de Cox observamos que los pacientes VEB positivo tienen un riesgo menor ($HR=0.53$) que los que lo tienen negativo, pero no es significativo ($p=0.35$).



Determinación del VEB mediante LMP1

Tampoco observamos diferencias significativas de la supervivencia en función del VEB cuando lo determinamos mediante LMP1 ($p=0.35$ test log-rank).

Si de nuevo aplicamos el modelo de Cox observamos que los pacientes VEB positivo tienen un riesgo menor ($HR=0.56$) que los que lo tienen negativo, pero no es significativo ($p=0.36$).



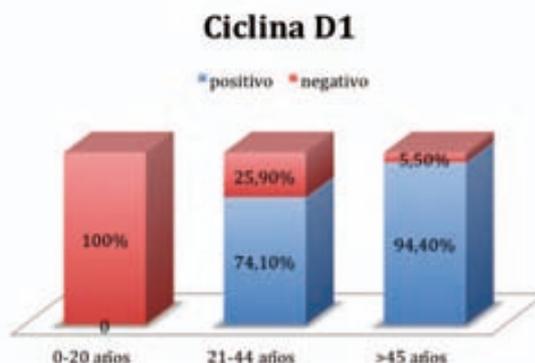
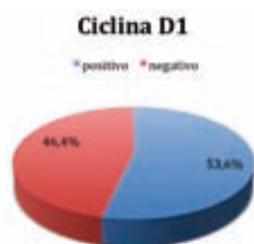
En resumen, con las tres técnicas se aprecia una leve tendencia a que la presencia del VEB se correlaciona con una mejor supervivencia, pero en ningún caso se alcanzan diferencias estadísticamente significativas.

9.2. PARTE II: RESULTADOS DE CICLO CELULAR Y APOPTOSIS

9.2.1. Proteínas de ciclo celular y apoptosis

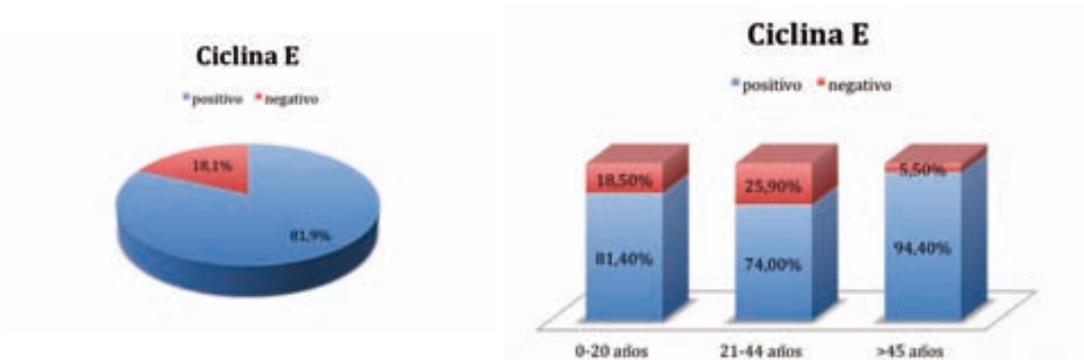
9.2.1.1. Ciclina D1

- Ciclina D1 es positiva en el 53,6% de los pacientes (n=69)
- Existe una dependencia estadísticamente significativa muy importante entre la edad y ciclina D1. En el grupo de 0-20 años el 100% de los pacientes son ciclina D1 negativos, en cambio en el grupo de mayores de 45 años el 94% son ciclina D1 positivos. (p=0.000000013% en el test exacto de Fisher)
- También observamos una correlación negativa estadísticamente significativa entre ciclina D1 y VEB (determinado mediante PCR DNAgp220). Así, cuando el VEB es positivo es más frecuente que ciclina D1 sea negativa (71.4%) que cuando el VEB es negativo (ciclina D1 negativa 36,5%) (p=0.03 en el test exacto de Fisher).
- No observamos esa dependencia en el grupo global cuando el VEB es diagnosticado mediante las otras 2 técnicas ni tampoco cuando estudiamos la relación entre el VEB y ciclina D1 en cada grupo de edad.



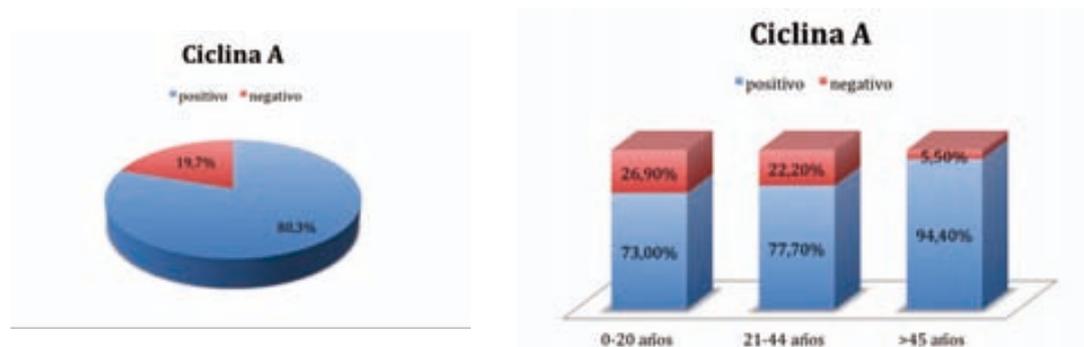
9.2.1.2. Ciclina E

- Ciclina E es positiva en 81.9% de los pacientes (n=72)
- Pese a estar sobreexpresada en la mayoría de los pacientes, el grupo de 21-45 años presenta una expresión algo menor. Esta diferencia no es estadísticamente significativa. (p=0.26 en el test exacto de Fisher).
- No existe relación en el grupo global entre ciclina E y el VEB determinándolo por ninguna de las 3 técnicas.
- En el grupo de 0-20 años observamos una tendencia a la dependencia positiva entre ciclina E y el VEB determinado por EBER. Así, ciclina E es más frecuentemente positiva cuando el VEB es positivo (100%) que cuando es negativo (74,2% de los casos) (p=0.11 en el test exacto de Fisher). No existe relación entre el VEB y ciclina E en los otros dos grupos de edad.



9.2.1.3. Ciclina A

- Ciclina A es positiva en el 80.3% de los pacientes (n=71) (Figura 21)
- Al igual que ocurre con ciclina E, se observa una tendencia que tampoco alcanza significación estadística a mayor positividad cuanto mayor edad ($p=0.16$ en el test exacto de Fisher).
- No se observa dependencia entre ciclina A y el VEB en el grupo global de pacientes mediante ninguna de las tres técnicas diagnósticas.
- En el grupo de 0-20 años, al igual que ocurría con ciclina E, de nuevo se observa asociación positiva entre ciclina A y VEB (diagnosticado mediante EBER). Así, cuando el VEB es positivo es más frecuente que ciclina A sea positiva (100%) que cuando VEB es negativo (ciclina A positiva 60% de los casos). Esta asociación es estadísticamente significativa ($p=0.05$ en el test exacto de Fisher). Se observa una tendencia en el mismo sentido en el mismo grupo cuando el diagnóstico de infección por el VEB lo realizamos mediante LMP1 ($p=0.12$ en el test exacto de Fisher). No existe dependencia entre Ciclina A y el VEB en los otros dos grupos de pacientes



9.2.1.4. Ciclina B1

- Ciclina B1 es positiva en el 79.2% de los pacientes (n=72) (Figura 21)
- Al igual que ocurre con ciclina E y ciclina A, existe una tendencia a mayor positividad en los pacientes mayores de 45 años, que no alcanza significación estadística. ($p=0.18$ en el test exacto de Fisher).
- No se observa relación entre ciclina B1 y VEB por ninguna de las tres técnicas en el grupo global de pacientes.
- En el grupo de pacientes de 0-20 años de nuevo se observa una tendencia a la asociación positiva entre ciclina B1 y el VEB (determinado mediante LMP1) que no alcanza

significación estadística. Así, cuando el VEB es positivo es más frecuente que ciclina B1 sea positiva (100%) que cuando es negativo (ciclina B1 positiva en 66% de los casos). ($p=0.13$ en el test exacto de Fisher). No existe dependencia en los otros dos grupos de pacientes. (Figura 21)

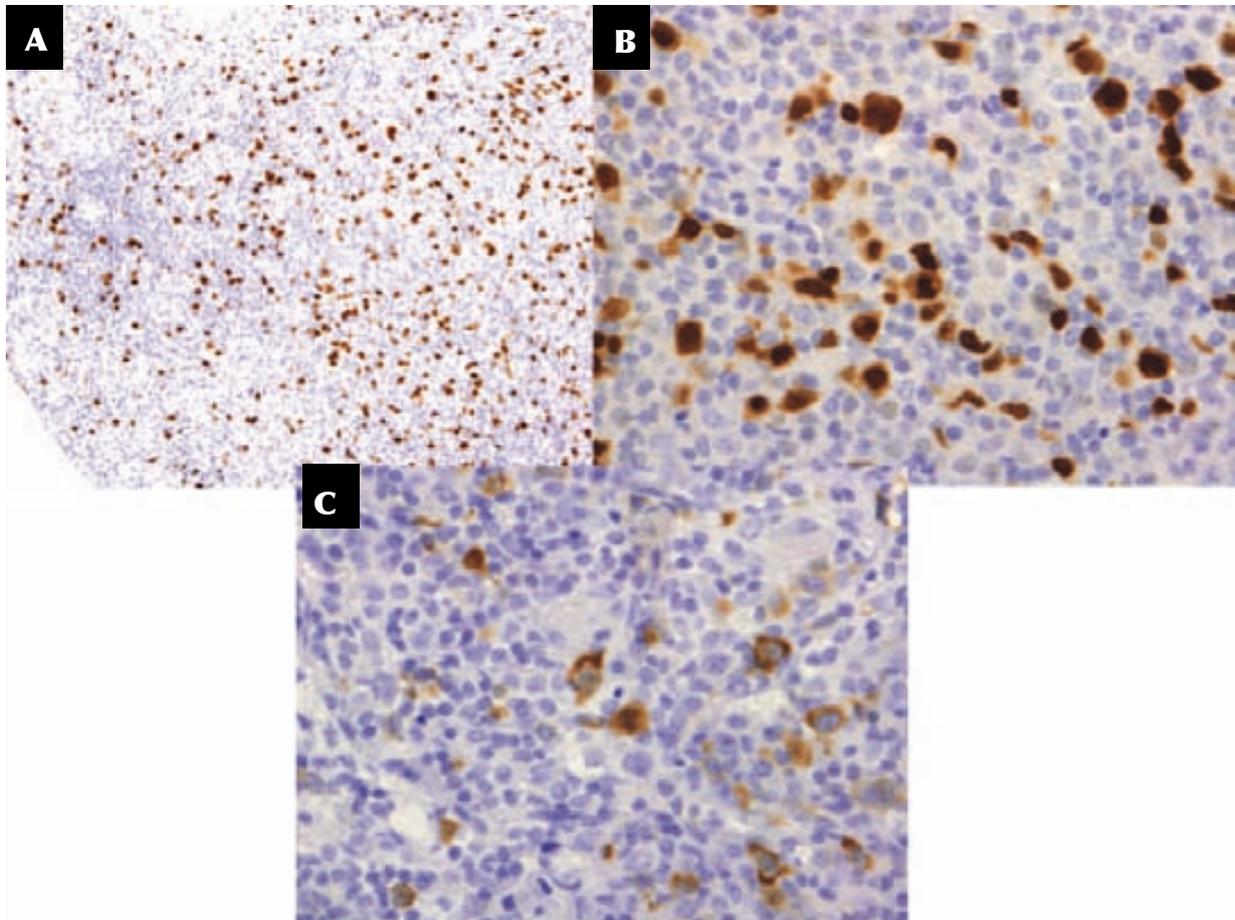
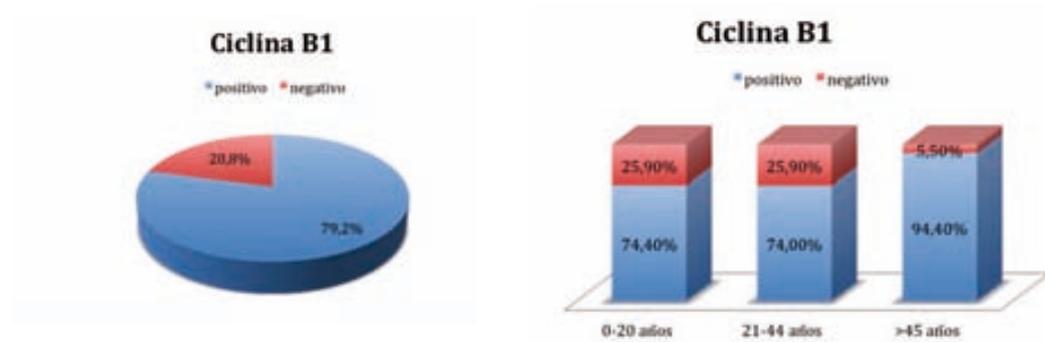
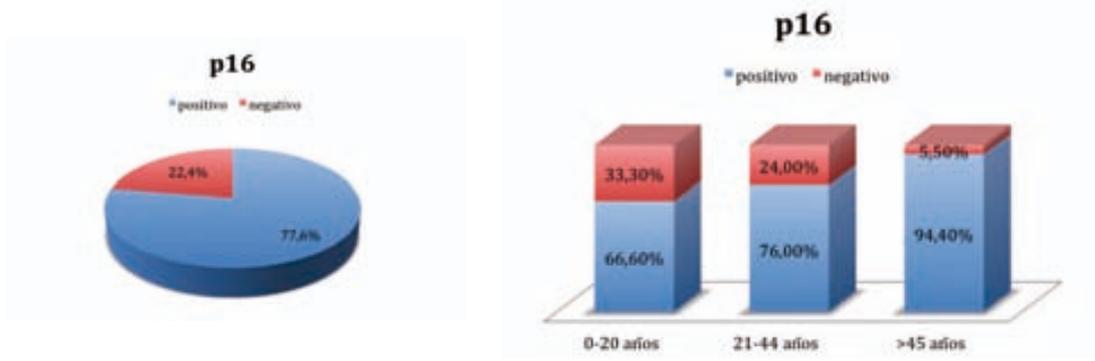


Figura 21: A. Inmunotinción para ciclina A. Distribución de células en fase de síntesis de ADN en una muestra de LHc. B. Inmunotinción ciclina A. Intensa expresión nuclear en las células tumorales de un LHc. C. Inmunotinción para la ciclina B1. Se observa positividad citoplasmática en las células de fase G2 del ciclo celular.

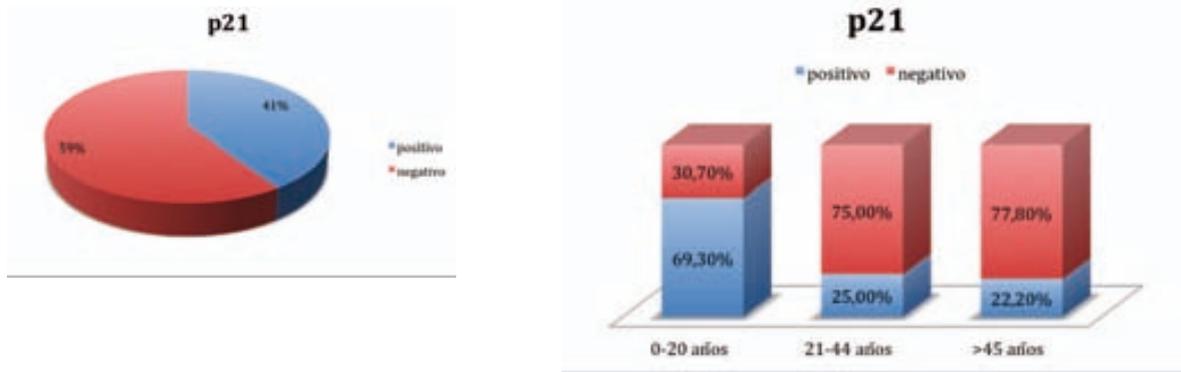
9.2.1.5. P16

- P16 es positivo en el 77.6% de los pacientes estudiados (n=67)
- Se observa una clara tendencia a mayor frecuencia de casos p16 positivos en el grupo de mayores de 45 años, cercana a conseguir la significación estadística. ($p=0.082$ en el test exacto de Fisher)
- Se observa una importante tendencia a la correlación negativa entre p16 y el VEB (determinado mediante PCR DNA gp220) en el grupo global, que casi es estadísticamente significativa. Así, vemos que cuando el VEB es positivo es más frecuente que p16 sea negativa (46,1%) que cuando VEB es negativo (en este caso, p16 negativa en 17,6% de los casos). ($p=0.06$ en el test exacto de Fisher)
- Esta tendencia no se observa por las otras técnicas ni tampoco al estudiar cada grupo de edad de forma individual.



9.2.1.6. P21

- P21 es positivo en el 40.3% de los pacientes estudiados (n:72) (Figura 22)
- Observamos una dependencia estadísticamente significativa entre la edad y p21, siendo positiva en muchos más casos en el grupo de pacientes pediátrico que en los otros dos grupos ($p=0.0008$ en el test de Chi-cuadrado).
- Se observa una correlación negativa muy significativa entre p21 y el VEB determinado por LMP1 en el grupo global. En los casos en los que VEB es positivo es más frecuente observar p21 negativo (82.1%) que cuando el VEB es negativo (p21 negativo: 40.4%). ($p=0.0005$ en el test exacto de Fisher). Esta dependencia no se observa cuando el VEB se determina por DNA gp220 o por EBER.
- Cuando estudiamos la relación entre p21 y VEB por grupos de edad, vemos la misma asociación negativa en el grupo de mayores de 45 años, es decir, cuando VEB (determinado mediante LMP) es positivo es más frecuente observar p21 negativo (100%) que cuando VEB es negativo (p21 negativo 25%) ($p=0.0016$ en test exacto de Fisher). No observamos esta relación en los otros dos grupos de edad.



9.2.1.7. P27

- p27 es positivo en el 16.9% de los pacientes estudiados (n=71) (Figura 22)
- No se observan dependencia entre p27 y edad
- Observamos correlación positiva estadísticamente significativa entre VEB (determinado por PCR DNAgp220) y p27 en el grupo global. Cuando VEB es positivo es más frecuente que p27 sea positivo (38.4%) que cuando el VEB es negativo (10.9%). (p=0.0286 en el test exacto de Fisher). No observamos esta dependencia si estudiamos al VEB por EBER o LMP1.
- No observamos dependencia entre VEB y p27 cuando estudiamos individualmente cada grupo de edad. (Figura 22)

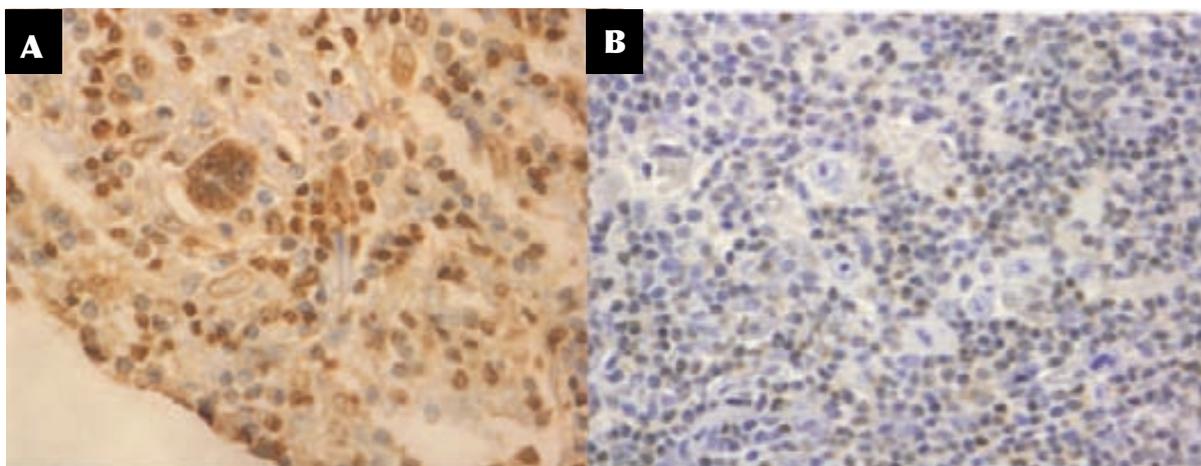
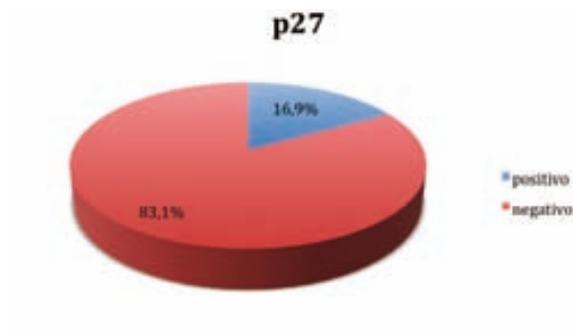
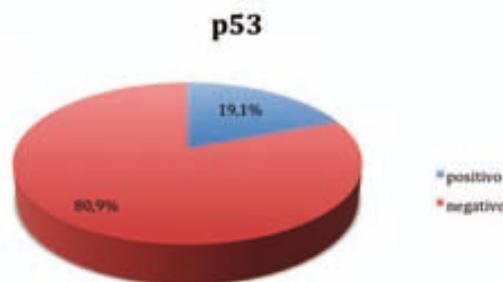


Figura 22: A. Inmunotinción para p16. Se observa intensa positividad nuclear en una célula HRS y en linfocitos de fondo. B. Inmunotinción para p27. Negatividad en las células neoplásicas. Presencia de ocasional célula reactiva con débil positividad nuclear

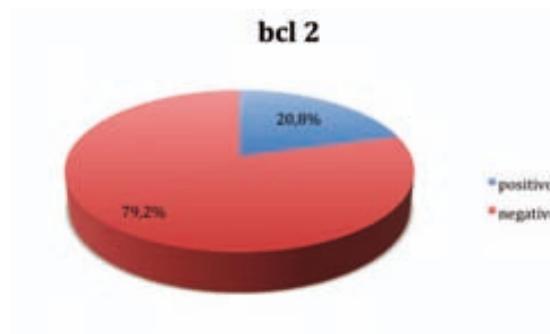
9.2.1.8. p53

- P53 es positivo en el 19.1% de los pacientes estudiados (n=68)
- No se observa diferencias por grupos de edad.
- No se observa dependencia entre p53 y el VEB en el conjunto global de los pacientes ni tampoco estudiando de forma individual cada franja de edad.



9.2.1.9. BCL-2

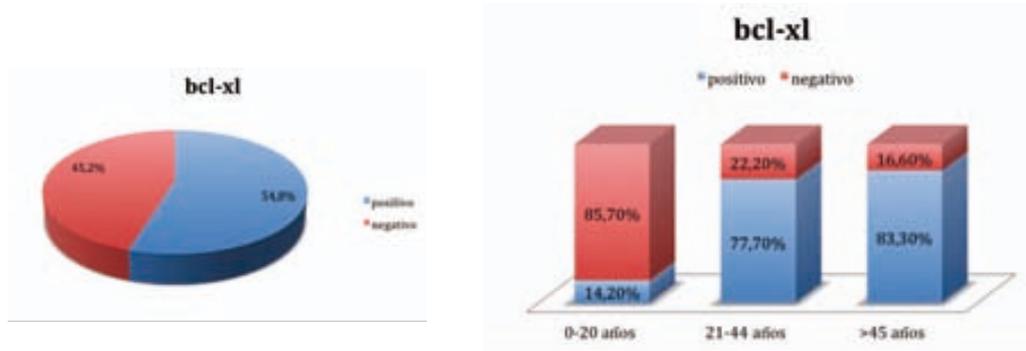
- Bcl-2 es positivo en el 20.8% de los pacientes estudiados (n=72)
- No se observan diferencias entre los tres grupos de edad.
- No hay concordancia entre bcl-2 y el VEB por ninguna de las tres técnicas en el grupo global. Tampoco la observamos si estudiamos la relación entre bcl-2 y el VEB en cada grupo de edad de forma individualizada.



9.2.1.10. BCL-XL

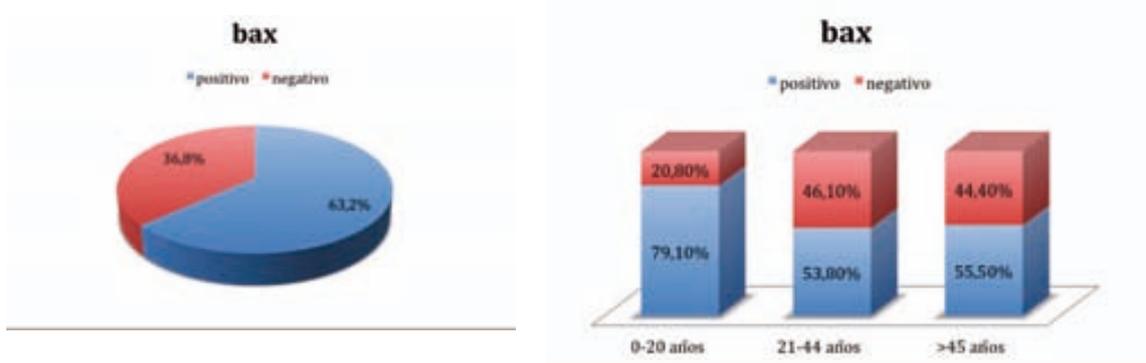
- Bcl-xl es positivo en el 54.8% de los pacientes estudiados (n=73)
- Existe una dependencia muy significativa entre edad y bcl-xl, observándose que bcl-xl es negativo con gran frecuencia en el grupo de 0-20 años. ($p=0.0000008$ en el test exacto de Fisher).
- También se observa asociación positiva que casi alcanza la significación estadística entre bcl-xl y el VEB en el grupo global (VEB determinado mediante LMP-1). Así, cuando el VEB es positivo es más frecuente que bcl-xl sea positivo (67.7%) que cuando el VEB es negativo (en ese caso bcl-xl positivo en 44.7% de los casos). ($p=0.06$ en el test exacto de Fisher).
- Cuando estudiamos la relación entre bcl-xl y el VEB en cada grupo de edad, observamos en el grupo de 0-20 años de nuevo una tendencia a la misma asociación positiva

referida anteriormente, es decir, cuando VEB es positivo es más frecuente que bcl-xl sea positivo (33.3%) que cuando el VEB es negativo (en ese caso bcl-xl positivo en 6.2% de los casos, determinado por PCR DNAgp220) ($p=0.116$ en el test exacto de Fisher). No observamos esa dependencia con las otras técnicas diagnósticas ni en los otros grupos de edad.



9.2.1.11. Bax

- Bax es positivo en el 63.2% de los pacientes estudiados (n=68)
- Se observa tendencia a una mayor positividad en el grupo de 0-20 años, que probablemente no alcance significación estadística debido al tamaño muestral ($p=0.12$ en el test exacto de Fisher)
- No se observa dependencia entre el VEB y bax en nuestra muestra.
- Se observa una tendencia a la asociación negativa entre VEB (determinado mediante PCR DNA gp220) y bax en el grupo de 0-20 años. Así, cuando el VEB es positivo es más frecuente que bax sea negativo (44.4%) que cuando es negativo (bax negativo en 8,3% de los casos). ($p=0.12$ en el test exacto de Fisher). No se observan dependencias cuando se determina el VEB por las otras técnicas diagnósticas ni tampoco cuando se estudia en los otros 2 grupos de pacientes.



9.2.2. Relaciones entre proteínas de ciclo celular y apoptosis

9.2.2.1. Relación ciclina E y p27

- Comprobamos si hay dependencia entre ciclina E y p27, es decir, si la sobreexpresión de ciclina E se correlaciona con baja expresión de p27.
Si bien es cierto que dentro de los pacientes con Ciclina E positiva hay mayor porcentaje de p27 negativos (87.27%) que en los de Ciclina E negativos (69.23%), lo que equivale a un Odds Ratio de 0.335, las diferencias no llegan a ser significativas ($p=0.20$ en el test exacto de Fisher). Hipotéticamente con un mayor tamaño muestral las diferencias podrían llegar a ser significativas.
- Si estudiamos de nuevo esta relación en función de la positividad o no del VEB, observamos que esa tendencia a la correlación negativa es importante cuando el VEB es positivo, aunque no alcanza a ser estadísticamente significativa, y en cambio no se aprecia tendencia en los casos VEB negativos (determinado mediante PCR DNA gp220). Observamos dentro de los LHc VEB positivos que hay mayor porcentaje de p27 negativo en los que tienen ciclina E positiva (72.73%) que en los que tienen ciclina E negativa (0%), pero posiblemente debido al escaso tamaño muestral las diferencias tampoco llegan a ser significativas ($p=0.13$).
Es decir, esa relación negativa entre ciclina E y p27 es más intensa en el grupo de pacientes VEB positivos que en el grupo global, y mucho más intensa que en los casos VEB negativos, en los cuales no existe tendencia a la asociación.
- Si analizamos la relación entre ciclina E y p27 en cada grupo de edad, observamos que en el grupo de 0 a 20 años hay una relación negativa más fuerte entre ciclina E y p27 (OR=0.141), que está cerca de poder considerarse significativa ($p=0.079$).
No se observan relaciones entre ciclina E y p27 en los otros dos grupos

9.2.2.2. Relación ciclina A y p27

- Comprobamos si la sobreexpresión de Ciclina A se correlaciona con baja expresión de p27. Efectivamente se observa una tendencia a relación negativa entre ambas, dado que dentro de los pacientes con Ciclina A positiva hay mayor porcentaje de p27 negativos (86.80%) que en los de Ciclina A negativos (64.29%), lo que equivale a un Odds Ratio de 0.281, pero de nuevo las diferencias no llegan a ser significativas ($p=0.11$ en el test exacto de Fisher).
- Si estudiamos la relación entre ciclina A y p27 en función del VEB, podemos ver que cuando lo determinamos mediante LMP1 la relación inversa que hemos observado anteriormente es más importante cuando el VEB es negativo ($p=0.13$) que cuando es positivo ($p=1$), aunque no se alcance significación estadística. No se observa relación mediante las otras 2 técnicas.
- Dentro del grupo de edad de 0-20 años esa relación negativa es estadísticamente significativa. Así, en los pacientes con Ciclina A positiva hay mayor porcentaje de p27 negativos (87.5%) que en los de Ciclina A negativos (42.86%), lo que equivale a un Odds Ratio de 0.122. ($p=0.045$ en el test exacto de Fisher). No se observan dependencias en los otros dos grupos de edad.

9.2.2.3. Relación ciclina B1 y p27

- Comprobamos si la sobreexpresión de Ciclina B1 se correlaciona con baja expresión de p27, pero no existe dependencia significativa entre ellas ($p=0.243$ en el test exacto de Fisher)
- Cuando estudiamos la influencia del VEB en la relación entre estas proteínas comprobamos que la relación inversa es más evidente cuando el VEB es positivo (determinado mediante PCR DNAgp220): en los casos VEB positivo, p27 es más frecuentemente negativa cuando ciclina B1 es positiva (70%) que cuando ciclina B1 negativa (0%), y al revés, p27 es más frecuentemente positiva cuando ciclina B1 es negativa (100%) que cuando ciclina B1 positiva (30%). Esta posible influencia, no obstante, tampoco alcanza significación estadística ($p=0.152$ en el test exacto de Fisher). No se observa influencia del VEB en esta relación mediante las otras 2 técnicas diagnósticas.
- Tampoco se aprecia dependencia significativa si estudiamos la relación de forma individualizada en cada uno de los 3 grupos de edad.

9.2.2.4. Relación ciclina A y p53

- Estudiamos la relación entre ciclina A y p53. Si bien es cierto que dentro de los pacientes con Ciclina A positiva hay mayor porcentaje de p53 negativos (82.69%) que en los de Ciclina A negativos (66.67%), lo que equivale a un Odds Ratio de 0.425, las diferencias no llegan a ser significativas ($p=0.24$ en el test exacto de Fisher).
- Cuando estudiamos la influencia del VEB en la relación entre ciclina A y p53 existe una clara tendencia a que el VEB podría influir en la relación inversa entre ambas proteínas. Así, en el grupo de pacientes VEB (gp220) negativos, dentro de los pacientes con Ciclina A positiva hay mayor porcentaje de p53 negativos (82.93%) que en los de Ciclina A negativos (55.56%), lo que equivale a un Odds Ratio de 0.266, y estas diferencias se acercan a la significación estadística ($p=0.093$ en el test exacto de Fisher). En cambio no existe relación cuando el VEB es positivo. Es decir, esa relación inversa se acerca a la significación estadística únicamente cuando el VEB es negativo. No observamos influencia del VEB en esta relación cuando lo determinamos mediante las otras 2 técnicas.
- Cuando estudiamos la relación entre estas dos proteínas por grupos de edad, podemos apreciar que en el grupo de 21 a 44 años la relación inversa es más importante: dentro de los pacientes con Ciclina A positiva hay mayor porcentaje de p53 negativos (84.21%) que en los de Ciclina A negativos (40.00%), lo que equivale a un Odds Ratio de 0.141, y en este caso las diferencias están muy cercanas a ser estadísticamente significativas ($p=0.079$ en el test exacto de Fisher). En los otros dos grupos de edad no existen diferencias significativas.

9.2.2.5. Relación ciclina B1 y p53

- Comprobamos si la sobreexpresión de ciclina B1 correlaciona con baja expresión de p53, y aunque se aprecia una tendencia en este sentido este resultado tampoco consigue significación estadística. ($p=0.20$ en el test exacto de Fisher)

- Si analizamos la relación entre estas dos variables en función de la positividad o negatividad del VEB, vemos que cuando el VEB (gp220) es negativo esta relación tiene una $p=0.19$, y en cambio cuando VEB es positivo la $p=1$ en el test exacto de Fisher. Esto nos podría sugerir que esa correlación negativa únicamente ocurre cuando el VEB es negativo, pero dadas las limitaciones debidas al tamaño muestral no podemos extraer conclusiones en este sentido. No apreciamos influencia del VEB sobre esta relación cuando lo determinamos mediante las otras 2 técnicas.
- Si estudiamos la relación entre estas proteínas de forma individual en cada uno de los tres grupos de edad, observamos que la relación inversa es más importante y casi significativa en el grupo de 21-44 años: dentro de los pacientes con Ciclina B1 positiva hay mayor porcentaje de p53 negativos (88.89%) que en los de Ciclina B1 negativos (50%), lo que equivale a un Odds Ratio de 0.266, y de nuevo las diferencias están cerca de ser estadísticamente significativas ($p=0.093$ en el test exacto de Fisher). No detectamos ningún hallazgo relevante en el grupo de 0-20 años ni tampoco en el de mayores de 45 años.

9.2.2.6. Relación ciclina D1 y p16

- Cuando analizamos la relación entre ciclina D1 y p16, observamos que cuando ciclina D1 es positiva, hay mucha más frecuencia de p16 positiva (97.06%) que cuando ciclina D1 es negativa (56.67%), y esta diferencia es estadísticamente significativa (OR=24.1, $p=0.00012$ en el estadístico exacto de Fisher)
- Estudiando la relación entre estas 2 variables en función del VEB, observamos que esa asociación positiva se mantiene en el grupo de LHc VEB negativo (determinado por DNA gp220) y en cambio no en los pacientes VEB positivos: en los casos LHc VEB negativo observamos que cuando ciclina D1 es positiva hay mucha más frecuencia de p16 positiva (96.77%) que cuando ciclina D1 es negativa (58.82%). Estas diferencias son estadísticamente significativas ($p=0.0017$ en el estadístico exacto de Fisher). No apreciamos influencia del VEB sobre la relación entre esas 2 proteínas cuando lo determinamos mediante las otras 2 técnicas.
- Por último, estudiamos la relación entre ciclina D1 y p16 de forma individualizada en cada grupo de edad. De nuevo al igual que en los dos casos anteriores, la correlación positiva es más intensa en el grupo de 21-44 años: cuando ciclina D1 es positiva, hay mucha más frecuencia de p16 positiva (100%) que cuando ciclina D1 es negativa (16.67%). $p=0.00018$ en el estadístico exacto de Fisher. En los otros dos grupos no se encuentran resultados relevantes.

9.2.2.7. Relación p53 y bcl2

- Existe una tendencia a correlación positiva entre estas proteínas. Cuando p53 es positivo es más frecuente que bcl2 sea positivo (38.4%) que cuando p53 es negativo (16.6%). Estos resultados, aunque se acercan, no consiguen significación estadística ($p=0.125$ por test exacto de Fisher).
- Esa asociación parece ser algo más importante en ausencia de VEB que cuando está presente. Así, observamos una tendencia a asociación positiva entre estas 2 proteí-

nas cuando el VEB es negativo (tanto si lo determinamos mediante EBER como mediante LMP1, $p=0.12$ en el test exacto de Fisher en ambos casos) que en cambio no existe cuando el VEB es positivo ($p=0.49$ en el test exacto de Fisher).

- Por último, analizamos que ocurre entre la relación entre estas dos proteínas de forma individualizada en cada grupo de edad. Observamos que en el grupo de 21-44 años, la relación citada es mucho más evidente y consigue significación estadística. Así, cuando p53 es positiva, hay mucha más frecuencia de bcl2 positiva (66.67%) que cuando p53 es negativa (5%). ($p=0.0047$ en el estadístico exacto de Fisher). En los otros dos grupos no se obtienen datos con potencia estadística significativa.

9.2.2.8. Relación p53 y bax

No observamos ninguna correlación entre p53 y bax, ni en el grupo general, ni en función de la presencia o no del VEB, ni tampoco estudiando la relación entre estas proteínas de forma individual en cada grupo de edad.

9.2.3. Analisis de supervivencia en función de proteínas de ciclo celular y de la apoptosis

Analizamos la supervivencia de los pacientes afectos de LHc en función de la expresión de las diferentes proteínas de ciclo celular y de apoptosis estudiadas.

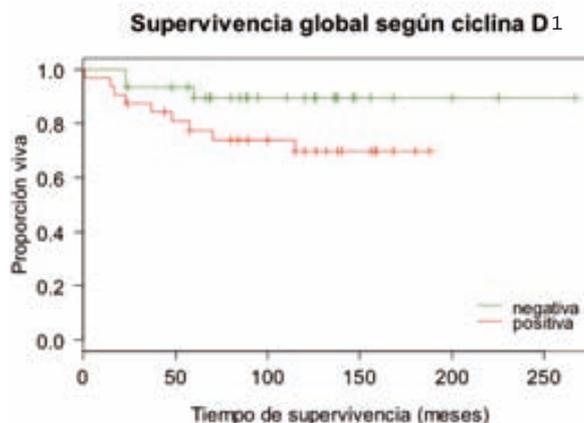
Para la comparación de la supervivencia entre diferentes grupos aplicamos el test log-rank y el modelo de riesgos proporcionales de Cox.

No encontramos influencia sobre la supervivencia de ninguna de las siguientes proteínas: ciclina E, ciclina A, ciclina B1, p16, p21, p27, p53 y bax.

Encontramos una interesante tendencia a influencia sobre la supervivencia de los pacientes de las proteínas ciclina D1, bcl2 y bcl-xl, que mostramos a continuación.

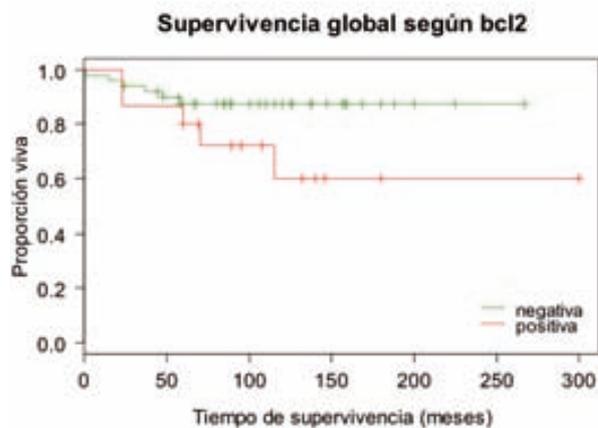
Supervivencia y Ciclina D1

Aplicamos el test log-rank que muestra diferencias de la supervivencia en función de p21 considerables pero no del todo significativas ($p=0.086$). Por lo tanto procedemos también a la realización del modelo de Cox. En este caso observamos que los pacientes con ciclina D1 positiva tienen un riesgo de muerte mayor ($HR=2.96$), pero no llega a alcanzar significación estadística ($p=0.10$)



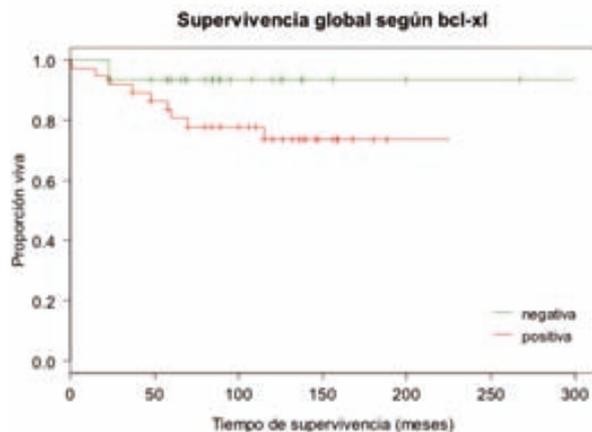
Supervivencia y bcl-2

Aplicamos el test log-rank que de nuevo muestra diferencias considerables de la supervivencia en función de bcl-2 pero no del todo significativas ($p=0.08$). Por lo tanto procedemos también a la realización del modelo de Cox. Los pacientes con bcl-2 positiva tienen un riesgo de muerte mayor ($HR=2.78$), que es cercano a alcanzar la significación estadística ($p=0.09$)



Supervivencia y bcl-xl

En este caso también apreciamos diferencias considerables de la supervivencia en función de bcl-xl al aplicar el test log-rank que tampoco son del todo significativas ($p=0.08$). Por lo tanto procedemos también a la realización del modelo de Cox. Los pacientes con bcl-xl positiva tienen un riesgo de muerte mayor ($HR=3.54$) que los que la tienen negativa, pero no llega a ser significativo ($p=0.11$).



10. DISCUSIÓN

10.1. Análisis metodológico: población de estudio

Nuestro grupo de pacientes presenta un primer pico de incidencia de LHc entre los 15-35 años y un segundo pico a partir de los 50 años. Esta distribución corresponde exactamente a la que se considera patrón III, o propia de países desarrollados según definieron clásicamente Correa y O'Conor.[67]

Consideramos que nuestra muestra, pese a no tratarse de un estudio poblacional, puede considerarse representativa de la población general y que no presenta sesgo importante de distribución. Por lo tanto consideramos que es una muestra válida para establecer comparaciones entre los diferentes grupos de edad.

Debemos destacar que dentro del grupo de 0-10 años existen siete pacientes pero todos ellos entre 0 y 5 años, y ninguno entre 5 y 10 años. De todos los trabajos revisados, únicamente hemos detectado un trabajo que especifica como se distribuyen los casos entre 0 y 15 años, y curiosamente había muy pocos casos entre 0 y 4 años y los casos aumentan a partir de los 5 años. [246]

En nuestro grupo de pacientes pediátricos todos los pacientes excepto uno eran de origen caucásico y nivel social medio, por lo que en principio no podríamos atribuirlo a una temprana exposición a agentes infecciosos como ocurre en los países en vías de desarrollo

10.2. Análisis metodológico: técnicas de diagnóstico de la infección por el VEB

Al revisar la literatura observamos una gran variabilidad en las técnicas diagnósticas utilizadas. Cada trabajo se realiza con alguna de las 2 técnicas, LMP1 o EBER, son escasos los trabajos que utilizan ambas técnicas y muy escasos los que realizan PCR para estudio de DNA. [233]

También existen discrepancias en cuanto a la concordancia diagnóstica de ambas técnicas. Algunos trabajos refieren que en sus series, tras revisión exhaustiva de los casos, la concordancia entre el diagnóstico mediante EBER o LMP1 es prácticamente del 100%. Pero como vimos, otros trabajos aceptan que la concordancia puede ser entre buena y muy buena, pero no del 100%. [58, 232, 235]

En nuestro trabajo utilizamos las tres técnicas diagnósticas. Para la determinación de ADN del VEB mediante PCR utilizamos primers o cebadores específicos de la región BamHI-L que codifica para la proteína gp220 de la cápside del VEB. Otros trabajos estudian diferentes regiones del genoma de VEB: BamHI-W, BamHI-K, Bam HI-A, Bam HI-Q, etc.

En nuestros resultados observamos, de forma inesperada, que la sensibilidad de la técnica de PCR-DNA es claramente inferior a las otras dos técnicas en los adultos, siendo en cambio de similar sensibilidad en el grupo de pacientes pediátricos.

El hecho de que los diferentes trabajos existentes analicen diferentes regiones genómicas dificulta la comparación de resultados. La explicación más lógica en nuestro caso, es la inferior sensibilidad de la región (o primers) utilizada. Existen escasos trabajos en la literatura que utilicen la región genómica seleccionada por nosotros para el estudio de LHc, por lo que debemos analizar otras causas que expliquen los posibles falsos negativos.

Una de ellas sería problemas relacionados con la muestra: en ocasiones los tejidos pueden presentar inhibidores, o restos de parafina que no se hayan eliminado correctamente, y que interfieran en la reacción de PCR. Las muestras procesadas no presentaban parafina; no obstante, no se incluyó un control interno por lo que no se puede excluir que los inhibidores jugaran algún papel. Otros motivos podrían ser que en el corte de biopsia estudiado efectivamente no estuviese el VEB, y otra limitación podría ser debida al límite de detección del producto amplificado que al realizarse por electroforesis en gel es de 10^3 copias/ml.

Ante la sorprendente buena rentabilidad diagnóstica de la PCR gp 220 en los pacientes pediátricos pueden plantearse algunas respuestas. Dado el tamaño muestral de los grupos, no puede descartarse que las muestras pediátricas simplemente incluyesen más contenido tumoral, o estuviesen mejor preparadas. Una explicación no obstante más interesante sería la siguiente: el LHc en niños tiene una relación más cercana en el tiempo con la mononucleosis infecciosa. En este caso podemos pensar que la carga vírica en el tejido tumoral sería mayor, y por este motivo la técnica tendría una mayor sensibilidad de detección del VEB. El antecedente de mononucleosis infecciosa no se pudo establecer de forma consistente con los datos disponibles en los historiales médicos de los pacientes, por lo que esta teoría no se puede demostrar.

10.3. Análisis de aspectos epidemiológicos

Infección por el VEB: tasa de infección global y por grupos de edad

La presencia del VEB en las muestras de nuestros pacientes fue del 37.8% cuando se determinó por EBER y del 47% cuando se estudió mediante LMP1. Cuando se determina por técnicas de PCR para detección del DNA del VEB (gp220) los casos positivos son únicamente un 17.9%.

Estos datos concuerdan absolutamente con los recogidos por otras series en países desarrollados, con detección del VEB en el 26-59% de los pacientes (diagnosticados mediante HIS-EBER) y entre el 26-54% (diagnostico mediante IH-LMP1), resultados como podemos ver muy similares. [75]

El VEB en el LHc se asocia en nuestro trabajo especialmente con el grupo de pacientes mayores de 45 años, donde lo observamos entre el 61% (HIS-EBER) y el 72% (IH-LMP1) de los pacientes, y en segundo lugar lo observamos en el grupo de pacientes de 0-21 años, observándose infección por VEB entre el 33% (IH-LMP1) y el 39% de los casos (HIS-EBER).

Un primer aspecto a remarcar es la elevada presencia del VEB en los casos de LHc pediátricos, especialmente importante en los pacientes de 0-10 años, al igual que ocurre como ya describimos en el trabajo de la Dra. De Matteo realizado en Buenos Aires. [249]

En nuestro trabajo obtenemos una positividad del VEB en el 63-81% de estos pacientes, cifras muy similares a las suyas, pese a que en nuestro medio se considera que la primoinfección por el VEB ocurre de forma más tardía que en Argentina.

En segundo lugar podemos estudiar qué ocurre con los resultados que nos aportan las diferentes técnicas. Observamos una alta concordancia entre EBER y LMP1 en los pacientes pediátricos y en los mayores de 45 años. Si revisamos trabajos que realicen ambas técnicas diagnósticas podemos observar por ejemplo que el trabajo de Jarret et al. muestra cifras muy similares a las nuestras, con un 22.8% de infección por VEB en adultos jóvenes y un 51.8% en pacientes de edad avanzada. [235]. Keegan et al, en su estudio poblacional, en este caso incluyendo también población pediátrica, refieren un 44% de casos LHc VEB positivos entre 0-14 años, 19% entre 15 y 44 años y un 41% en pacientes mayores de 45 años. [57] Armstrong et al. refieren valores muy similares a los de nuestro trabajo. [69]

Así pues, nuestros valores son muy similares a los que se observan en los estudios realizados en Reino Unido y USA.

En el grupo de 21-44 años observamos una diferencia estadísticamente significativa en cuanto a la infección por el VEB en función de la técnica diagnóstica, puesto que vemos un 21% de casos positivos por HIS-EBER y un 46% por IH-LMP1. No hay ningún trabajo que haga mención explícita de esta diferente capacidad diagnóstica de ambas pruebas en este grupo concreto de pacientes y no disponemos de una explicación al respecto, aunque debido al pequeño tamaño muestral esa diferencia significativa debe interpretarse con precaución.

Cuando estudiamos al VEB mediante PCR-DNA gp220 observamos que existe una clara asociación entre VEB y el grupo de 0-20 años, que es positivo en el 31% de los casos, siendo solo positivo en el 6.6% de los casos en los pacientes de 21-44 años y en el 15.7% de los casos de pacientes >45 años. La interpretación de estos datos es difícil por los motivos explicados en puntos anteriores.

Por último, las pruebas de concordancia estadística mostraron una moderada concordancia entre EBER y LMP1, y baja concordancia entre gp220 y cualquiera de las otras 2 técnicas. Existe una baja concordancia en el grupo de 21-44 años, que hace que la concordancia global sea moderada, puesto que tanto en el grupo de 0-20 años como en el de mayores de 45 años la concordancia es alta. El único trabajo existente que estudia la concordancia entre estas pruebas obtiene mejores cifras de concordancia que las que obtenemos nosotros, aunque esto podría ser debido a que el número de casos evaluados es mayor, a la diferente metodología utilizada, etc. [59]

Consideramos que esta metodología estadística debería aplicarse a los estudios que se desarrollen en el futuro para garantizar la calidad y fiabilidad de los mismos.

Distribución del LHc por sexo

En nuestra muestra, un 61.7% de los pacientes afectados de LHc son de sexo masculino y un 38.3% son de sexo femenino. Esto refleja la incidencia que refiere la literatura. Observamos además en nuestro trabajo que este predominio en el sexo masculino es más acentuado cuanto mayores son los pacientes (44% en 0-20 años, 63% en 21-44 años y 83% en mayores de 45 años). Esto podría sugerir que existan factores que predispongan a un mayor grado de

inmunosupresión en varones de edad avanzada que en mujeres. No obstante, algún trabajo refiere incidencias algo diferentes de las nuestras, y nuestro pequeño tamaño muestral nos impide extraer conclusiones en este aspecto. [305]

Se observa también una tendencia a la asociación entre el VEB y pacientes de sexo masculino, que está muy cerca de alcanzar la significación estadística ($p=0.07$), siendo VEB positivos un 46.5% de los pacientes varones y únicamente un 25% de las mujeres. Estos datos son prácticamente idénticos a los que Glaser et al reflejaron en su revisión epidemiológica internacional en la que analizaron 1546 pacientes de 14 estudios diferentes, observando que el 47,7% de los pacientes varones era VEB positivo frente al 29,2% de los casos de LHc en pacientes de sexo femenino. [257]

Distribución de LHc por subtipo histológico

Es conocido que la distribución del LHc en subtipos histológicos varía en función del nivel socioeconómico, del origen étnico etc. [257]

La distribución que presenta nuestra muestra es la propia de un país desarrollado, con un 60% de casos subtipo EN y un 26% de los casos subtipo CM. El 14% restante serán DL (5.5%), PL (3.3%) e IF (4.4%). Estos datos son muy similares a los que presentó Montalbán et al en su trabajo de revisión del LHc en España, en el que obtenían una frecuencia de 58% de casos subtipo EN, 33% subtipo CM, 5.8% de casos PL y 2.3% DL. [76]

Por edades, predomina el subtipo EN tanto en el grupo de 0-20 años (81%) como en el grupo de 21-44 años (61%). Este dato es llamativo, puesto que no existe un predominio de subtipo EN en otras series, como la de Glasser, revisión multicéntrica de varios trabajos, o la de Keegan et al, en Reino Unido, donde en ambos trabajos la frecuencia de subtipo EN entre 0-14 años es de un 40% aproximadamente, al igual que subtipo CM que también supone un 40% aprox. [57, 257] Tras revisar nuestra serie podemos decir que probablemente los pacientes incluidos en el grupo pediátrico de entre 15 y 20 años, la mayoría de ellos subtipo EN, son los responsables de esa diferencia apreciada.

En el grupo de mayores de 45 años el subtipo CM es el predominante (34%), seguido de cerca por EN (30%). Esto es lo esperable, dado que es éste grupo el que más se relaciona con el VEB. Es además en este grupo de pacientes donde se presentan prácticamente todos los casos de subtipo histológico DL y PL (7 de los 8 existentes). Estos resultados son diferentes de los que refieren Stark et al y Keegan et al, en los que predominaba el subtipo EN (45% aprox en ambos), seguido de CM (35% aprox). En estos trabajos esto podría ser debido al origen étnico de los pacientes (muestra multirracial) y a la edad (elevado número de pacientes entre 45-50 años). Efectivamente, el trabajo de Glaser, en el que se analizan los pacientes de forma muy detallada, observa en el grupo de pacientes caucásicos mayores de 54 años un claro predominio de CM respecto a EN. Esto parecería solucionar la pregunta, pero existe otro trabajo realizado en Reino Unido por Stark et al únicamente en población de edad avanzada, mayores de 60 años, en el que claramente predomina también el subtipo EN; el único sesgo posible es que no especifica el origen étnico de los mismos. [57, 78, 257]

Subtipo histológico y VEB

En nuestro trabajo se observa una clara dependencia entre el subtipo histológico CM y el VEB. El 68% de los casos de LHc CM son VEB positivos, y en cambio solo el 20% de los casos de LHc EN son VEB positivos. Esta dependencia únicamente es estadísticamente significativa cuando hacemos la determinación de la infección por VEB mediante EBER, no así mediante LMP1 ni mediante gp220.

Si lo analizamos por grupos de edades, esta dependencia entre subtipo CM y VEB existe, y es estadísticamente significativa, tanto en el grupo de 0-20 años como en el grupo de >45 años, pero no se observa en el grupo de 20-44 años.

Esta asociación la recogen la mayoría de los trabajos que hemos citado previamente, y también en estos dos grupos de edad, que se conocen como los grupos de LHc dependientes o asociados al VEB. El motivo que la provoca aun no es bien conocido, aunque algunos trabajos apoyan la hipótesis de que el propio VEB induce una alteración del microambiente tumoral que contribuiría al aspecto morfológico que caracteriza al subtipo CM.[306].

Estadio de presentación y VEB

No existe dependencia entre la edad de los pacientes y el estadio de presentación. Así, un 17,6% de los pacientes se presentó en estadio I, un 34.1% en estadio II, un 25.9% en estadio III y un 22.4% en estadio IV. La distribución en los 3 grupos de edad es muy similar a la citada para el grupo general.

Esta distribución es similar a la del trabajo de Montalbán et al en la serie del estado español, pero es algo diferente a la serie de Keegan et al en California, cuyos pacientes pediátricos acostumbran a presentarse en estadio I, y en cambio los otros 2 grupos debutan predominantemente en estadios II-III. [57, 76] Jarret et al, en su serie de pacientes (no incluye pacientes menores de 15 años), observan una distribución similar a la nuestra, tanto en global, como al estudiarlo tras dividirla en tres grupos de edad (15-35, 35-50 y >50 años). Flavell et al, en Birmingham, con una serie de 273 pacientes (todos ellos mayores de 15 años, refieren un 8% estadio I, 36% estadio II, 34% estadio III y 22% estadio IV. [72, 307]

No obstante, en función de la presencia o no del VEB sí se aprecian dependencias que pese a ser estadísticamente significativas, deberemos interpretar con cautela, dado que son aparentemente contradictorias. Nuestra serie muestra una mayor tasa de infección del VEB (determinado mediante gp220) en los LHc estadio IV, y en cambio se observa más infección por el VEB en los LHc estadio I cuando lo determinamos mediante EBER.

Esta observación, que estadísticamente es significativa para toda nuestra muestra población, se genera básicamente a partir del grupo de 0-20 años, pues en los otros dos grupos de edad no se observan diferencias significativas en el estadio de presentación del LHc en función de la presencia o no del VEB.

Escasos trabajos reflejan posibles relaciones entre el VEB y estadio de presentación de la enfermedad. Así, la serie americana de Keegan et al también parece presentar una tendencia a relación entre VEB (estudiado mediante EBER y LMP1) y estadios más bajos de presentación, aunque sin significación estadística. La serie de Flavell no presenta ninguna

asociación entre estadio de presentación y VEB (estudiado mediante EBER), pero la serie de casos-controles de Jarret et al, con sus 437 casos (16 a 74 años, estudio VEB mediante EBER), observa exactamente la misma relación que observamos en nuestro trabajo entre VEB y estadio I, es decir, predominio de VEB en estadios I, que se observa en el grupo general, pero especialmente en el grupo de 15-35 años, y no se observa en los mayores de 50 años. Únicamente Enblad et al, en una serie más pequeña (117 pacientes) parece apreciar tendencia a asociación del VEB (EBER Y LMP1) con estadios avanzados. El mismo autor refiere, al presentar resultados que difieren en algunos aspectos de lo que parece observar la mayoría, que el hecho de ser pacientes seleccionados podría suponer un sesgo. [232]

Respuesta al tratamiento

En nuestro trabajo se consigue la remisión completa de la enfermedad en la gran mayoría de los pacientes de nuestro estudio, concretamente en el 86% de los mismos. Este valor es de alrededor del 90% en los pacientes de 0-20 años y en los mayores de 45 años (90.9% y 89.4% respectivamente), siendo algo menor en el grupo de 21-44 años (80,0%). Dada la alta respuesta observada, no se pueden extraer resultados en función de la presencia o no del VEB.

Existen algunos trabajos, como el de Murray et al, que observan una mejor respuesta a la quimioterapia en los casos LHC VEB positivos que en los casos LHC VEB negativos. Este trabajo sugiere la hipótesis de que la sensibilidad a la apoptosis inducida por la quimioterapia de las células HRS VEB positivas podría ser mayor que la de las células HRS VEB negativas, pero no han aparecido trabajos posteriores que apoyen esa teoría. [226]

Supervivencia desde el diagnóstico y relación con el VEB

La probabilidad de supervivencia es algo mejor en el grupo de 0-20 años que en los otros 2 grupos, sin que las diferencias sean estadísticamente significativas.

Observamos además que no existe diferencia de supervivencia en el grupo global en función de la presencia o no del VEB, ya sea determinándolo mediante gp220, mediante EBER o mediante LMP-1.

El significado clinicopatológico del VEB como factor pronóstico en los pacientes afectos de LHC ha sido un tema controvertido, probablemente debido a cuestiones metodológicas, pero actualmente la mayoría de trabajos parecen coincidir en que el VEB se asocia a una disminución de la supervivencia en pacientes de edad avanzada. Algunos autores, como Glavina-Durdov et al y Flavell et al observan que los LHC VEB positivos se asocian con una mayor supervivencia libre de evento, aunque sin afectación de la supervivencia global, en adultos jóvenes.[72, 308]

Murray et al. no solo refieren una mejor respuesta al tratamiento quimioterápico sino un mejor pronóstico de los pacientes afectos de LHC VEB positivos frente a los pacientes LHC VEB negativos, independientemente de la edad. [226]

Pero tanto los trabajos de Clarke y Stark, como el trabajo de Enblad et al y especialmente los trabajos poblacionales de Keegan et al y Jarret et al reflejan una marcada disminución de la supervivencia en pacientes de edad avanzada VEB positivos respecto a los pacientes VEB negativos. [57, 78, 232, 297, 307]

Por último, únicamente el estudio poblacional de la Dra. T. Keegan et al. en California observa una tendencia muy cercana a la significación estadística ($p=0.07$) a mejor pronóstico y mayor supervivencia en pacientes pediátricos (0-15 años) cuando el VEB es positivo respecto a los pacientes LHc VEB negativos. También observan una tendencia similar en el grupo de adultos jóvenes, al igual que los trabajos citados anteriormente.

En conclusión, los trabajos existentes parecen demostrar un impacto diferencial del status del VEB sobre el pronóstico de los pacientes, diferente en los pacientes jóvenes (mejor pronóstico) de en los pacientes de edad avanzada (peor pronóstico). Esto podría reflejar que la presencia del VEB hace que el LHc en estos dos grupos de edad sea biológicamente diferente, o simplemente indicativo de que los pacientes de edad avanzada pueden presentar una situación de inmunodeficiencia que puede contribuir al desarrollo de LHc VEB positivos.

10.4. Análisis de las alteraciones de ciclo celular y apoptosis

Las células HRS son células que han adquirido la capacidad de proliferar y de escapar a la apoptosis. Una vez establecido cual era su origen celular, el conseguir conocer los mecanismos mediante los cuales estas células adquirirían estas habilidades se convirtió en una cuestión capital en el LHc. Así, en los últimos años numerosos estudios se han dirigido a investigar los mecanismos que hacen que esto sea posible. De esta forma se ha constituido la evidencia de que estas células presentan múltiples y profundas alteraciones a nivel de las proteínas de ciclo celular y a nivel de la regulación de la apoptosis.

Diferentes trabajos han demostrado sobreexpresión de ciclinas y de quinasas dependientes de ciclinas, sobreexpresión de proteínas antiapoptóticas, alteraciones de diferentes vías de señalización y alteraciones a nivel de vías supresoras tumorales. Además, se ha estudiado insistentemente el papel que el VEB puede jugar a nivel de todas estas alteraciones, y cuales son los mecanismos por los que actuaría. [40]

Existe una importante variabilidad entre los resultados que muestran los diferentes trabajos existentes en la literatura. Esta variabilidad la observaremos tanto en la determinación del grado de expresión de estas proteínas como en la relación entre ellas y el VEB.

Existen diferentes factores que pueden explicar dicha variabilidad, como pueden ser el diferente número de pacientes analizado en cada serie, sesgos atribuibles a los criterios de selección de los pacientes, diferencias en los anticuerpos utilizados, diferencias en cuanto a los criterios diagnósticos de células HRS, diferencias en relación a lo que se considera sobreexpresión de una proteína (25%, 50%, 75%..), diferencias de los criterios diagnósticos de infección por el VEB, etcétera.

Además debemos considerar que puede existir un sesgo atribuible al tipo de muestra utilizada (MTA o estudios individuales en cada paciente). Algunos trabajos actualmente aun consideran que el hecho de que las secciones de tejido sean muy pequeñas (1 mm de diámetro) puede motivar que haya una infrarrepresentación de la muestra total. [309] No obstante, la mayoría de grupos que empezaron a trabajar con MTA realizaron estudios de concordancia en los que comparaban secciones tumorales convencionales y los MTA, y los resultados obtenidos fueron excelentes, con una muy alta identificación de células HRS en

los cilindros de biopsia (90% de los casos) y con alta concordancia entre los resultados obtenidos mediante ambas técnicas (también alrededor del 90%). Así, actualmente se considera que la MTA es una técnica perfectamente estandarizada y que ofrece la gran ventaja de poder estudiar diferentes proteínas de forma simultánea en un gran número de pacientes, con lo que es más fácil analizar las complejas interacciones existentes entre estas proteínas y las vías de señalización.

El trabajo más completo en este sentido, tanto a nivel metodológico como de resultados, hasta el punto de ser una publicación de referencia en el campo del LHC y alteraciones de ciclo celular y apoptosis es el de García et al, realizado además en población del estado español, por lo que analizaremos en profundidad sus resultados. [56]

En nuestro trabajo hemos analizado estas proteínas de ciclo celular y de apoptosis. En primer lugar las hemos estudiado en la muestra global; posteriormente hemos intentado determinar que ocurre con ellas en relación a la presencia o no del VEB; a continuación, partiendo del supuesto de que el LHC es una “enfermedad diferente” en cada grupo de edad, y tras detectar que no existe prácticamente literatura que estudie estas alteraciones de forma diferencial por grupos de edad, hemos realizado estos estudios de forma individualizada en cada uno de nuestros tres grupos de pacientes.

Por último hemos analizado relaciones descritas en la literatura entre estas proteínas, con la posibilidad añadida que ofrece nuestro diseño de estudiarlas también en función de la presencia o no del VEB y de forma individual en cada grupo de edad.

Ciclina D1

Las células HRS característicamente expresan ciclina D2 y también ciclina D3. La expresión de ciclina D1, proteína cuyo papel oncogénico en diferentes tumores es bien conocido, es controvertida en el LHC. Pese a que la literatura refiere de forma mayoritaria (salvo algunos trabajos aislados) que su expresión es baja, en nuestro

trabajo observamos que ciclina D1 se expresa en aproximadamente el 50% de los pacientes. Además, como dato sorprendente y totalmente novedoso, demostramos que los pacientes mayores de 45 años presentan una expresión de esta ciclina cercana al 100%, los pacientes de 21-45 años también muestran una expresión elevada, cercana al 75%, pero en cambio los pacientes de 0-20 años tienen una expresión del 0%. No existe ningún trabajo que realice esta observación, y constituye otra evidencia a favor de que las alteraciones que presentan estas células son diferentes en función de la edad de los pacientes.

Además observamos en el grupo total de pacientes una dependencia inversa entre ciclina D1 y el VEB (determinado mediante gp220) que es estadísticamente significativa, siendo la ciclina D1 generalmente negativa cuando el VEB es positivo y viceversa. Esta asociación tampoco está reflejada en la literatura. Podríamos pensar que es el propio VEB el que provoca la subexpresión de la ciclina D1, pero en ese caso, porque existe esa sobreexpresión de ciclina D1 en los mayores de 45 años, en los que la presencia del VEB también es muy alta? Una posible explicación es que el VEB provoque alteraciones diferentes a nivel molecular en los dos grupos de pacientes, pero por el momento es una pregunta para la que no hay respuesta.

Ciclina E

El complejo ciclina E-cdk2 es uno de los componentes del punto de control que permitirá a la célula pasar de fase G1 a fase S. La literatura refiere que esta proteína está característicamente sobreexpresada en el LHc, entre un 82% y un 90% de los casos. Esto podría explicar, al menos parcialmente, la alta actividad proliferativa de las células HRS, pues se correlaciona con expresión de Ki-67 y expresión de ciclina A y ciclina B1.[56]

En cuanto a la relación entre ciclina E y VEB, existen escasos trabajos que evalúen esta relación. Uno de los más importantes es el de Tzankov et al, que evalúan 330 casos de LHc, sin llegar a detectar correlación entre ambos. [179] En cambio García et al. observan una correlación inversa cercana a la significación estadística entre el VEB y ciclina E.[56]

En nuestra serie observamos que ciclina E está sobreexpresada en el 81.9% de los pacientes, mostrando una gran similitud por lo tanto con los datos referidos. No existe dependencia estadísticamente significativa entre ciclina E y la edad, aunque es positiva con más frecuencia en el grupo de pacientes mayores de 45 años (94.4%) y en el de los pacientes de 0-20 años (81.4%) que en el grupo de 21-44 años (74%).

No observamos dependencia entre ciclina E y el VEB en nuestro grupo muestral, pero sí apreciamos una tendencia a la correlación positiva con el VEB (determinado mediante EBER) en el grupo de 0-20 años, al contrario de lo que observan García et al. Este dato no consta en la literatura, y es único de este grupo de edad. Es posible que con un mayor tamaño muestral esta dependencia alcanzase la significación estadística. Esto podría sugerir que el VEB desempeña algún papel en la expresión de la ciclina E únicamente en este grupo de pacientes, cuyo base molecular aun estaría por establecer. En este sentido existen trabajos recientes realizados en líneas celulares de carcinoma nasofaríngeo que demuestran que el VEB podría activar a p21 y disminuir secundariamente la actividad del complejo ciclina E-CDK2. Este modelo, aunque no es aplicable a LHc, muestra de forma inequívoca las relaciones entre el VEB y estas proteínas y puede generar nuevas líneas de investigación. [310]

Ciclina A

El complejo ciclina A – cdk1 se encarga de la regulación del transito a través de la fase S hacia la fase G2 del ciclo celular y también, junto con el complejo ciclina B1-cdk2, de regular la entrada en la fase M.

De nuevo, al igual que ciclina E y que como veremos, ciclina B1, su sobreexpresión es un hallazgo común en el LHc (90-95%). Este hallazgo podría explicar el gran número de mitosis alteradas que presentan las células HRS. [40]

En cuanto a la relación entre ciclina A y el VEB, Ohshima et al. en una serie de únicamente 11 pacientes, no detectan que el VEB tenga relación con la expresión de ciclinas.[187] También Chang et al. evalúa esta relación en una serie de 34 casos de LHc y no observa diferente expresión de ciclina A en función del VEB; no obstante, a partir de estudios realizados in vitro, el mismo autor sugiere que ciclina A podría ser responsable de los rasgos morfológicos propios de las células HRS, inducida por LMP1 en los casos en que el VEB sea positivo o por otros mecanismos cuando VEB es negativo. [311]

En nuestra muestra ciclina A es positiva en el 80.3% de los pacientes, presentando máxima positividad en los pacientes mayores de 45 años (94.4%) y encontrándose menos expresada, alrededor del 75%, en los otros dos grupos de edad.

Aunque estas diferencias no son significativas, el hecho de que la edad media de nuestra muestra sea menor que la edad media de los pacientes de otros trabajos (realizados predominantemente en población adulta), podría explicar que en nuestro caso ciclina A se exprese en un porcentaje algo menor de lo que refiere la literatura.

Al igual que ocurre con ciclina E, no observamos relación entre ciclina A y el VEB en el grupo global de pacientes, pero sí en el grupo de 0-20 años, y éste también es un dato novedoso que no se encuentra reflejado en la literatura. En ellos se constata una dependencia entre ciclina A y VEB (determinado por EBER) que es estadísticamente significativa, siendo la ciclina A positiva siempre que el VEB es positivo. Esa relación también existe cuando el VEB se estudia mediante LMP1, sin alcanzar significación estadística. Esto de nuevo nos podría sugerir que el VEB puede contribuir en ese grupo de edad a la positividad de ciclina A y por lo tanto ser un agente que estimule la proliferación celular, y de nuevo deberíamos plantear la misma hipótesis que en el caso de ciclina E, es decir, que activa mecanismos o vías moleculares específicas de ese grupo de pacientes, o que la sobreexpresión de ciclina E puede ser mediada por el VEB en niños y por otras vías en el resto de pacientes.

Ciclina B1

El complejo ciclina B – cdk2 regula el paso de la fase G2 a la fase M del ciclo celular, y constituye el Factor Promotor de la Mitosis. Junto con ciclina A, se considera que son las proteínas responsables del control de la mitosis.

La literatura refiere una sobreexpresión de ciclina B1 en las células HRS prácticamente constante, del 90-95%, igual que ocurre con ciclina A.

Su relación con el VEB es controvertida y poco estudiada. Ohshima et al. no detectan relación entre ciclina B1 y VEB, pero un trabajo reciente realizado en China por Zhao et al., en una muestra de 60 pacientes, observa una correlación positiva estadísticamente significativa entre ciclina B1 y VEB (diagnosticado mediante LMP1)[312]. Además, algunos estudios experimentales apoyan la teoría de que el VEB mediante EBNA2 sería el responsable de la sobreexpresión de ciclina B1. [313]

Observamos en nuestra serie que ciclina B1 es positiva en el 79.2% de los pacientes. Presenta un comportamiento muy similar a ciclina A.

No existe dependencia estadística entre ciclina B1 y edad en nuestra serie, pero al igual que ocurría con ciclina A, sí existe una tendencia a mayor positividad en el grupo de pacientes mayores de 45 años.

En cuanto a la relación entre ciclina B1 y el VEB, observamos exactamente lo mismo que ocurre con ciclina E y con ciclina A. No existe relación entre ciclina B1 y el VEB en nuestro grupo de pacientes, pero sí existe una marcada tendencia a la correlación positiva entre ciclina B1 y VEB (determinado por LMP1) en el grupo de 0-20 años, cercana a ser estadísticamente significativa. Este dato, que tampoco consta en la literatura, nos lleva a la misma hipótesis que en los casos anteriores.

Podríamos decir, por tanto, que el VEB parece contribuir a la expresión de estas 3 proteínas inductoras de ciclo celular en el grupo de 0-20 años, por mecanismos que aun no conocemos.

P16

P16 forma parte de la familia de proteínas INK4, proteínas reguladoras de fase G1 del ciclo celular. P16 actúa bloqueando la progresión de G1 a S, al unirse a CDK4 e impedir así la formación del complejo CDK4-ciclina D1 activo. Este complejo activo estimularía, mediante fosforilación de pRb y liberación del factor de transcripción E2F1, la progresión del ciclo celular.

Existen escasos trabajos que estudien si la vía supresora tumoral p16-Rb, que se encuentra alterada en muchos tumores, juega algún papel en LHc. Algunos autores que muestran subexpresión de p16 en sus series sugieren que la inactivación de la vía supresora tumoral p16-Rb podría ser un hecho característico y patogénico en el LHc. [205] Pese a que este argumento es a priori consistente, la literatura muestra una expresión de p16 muy variable en función de los trabajos, con valores entre el 18 y el 73%. [40, 56]

También es controvertida su relación con el VEB. Zhao et al. y al Salam et al refieren una mayor expresión de p16 en los casos LHc VEB positivos que en los casos LHc VEB negativos, postulando que el VEB juega un papel dominante en la expresión de p16. Así, existen trabajos in vitro que muestran que la proteína EBNA3c del VEB podría inactivar a pRb y esto provocar la sobreexpresión de p16.[309]

Pero existen otros trabajos que no encuentran correlación entre VEB y p16, y otros incluso que refieren correlación negativa, puesto que demuestran, a nivel experimental, que LMP1 podría bloquear de forma directa a p16. [314, 315]

En nuestra serie observamos que p16 es positiva en el 77% de los casos estudiados, dato concordante con lo que refiere la literatura.

Obtenemos dos resultados interesantes y novedosos. El primero es que se observa una dependencia muy cercana a la significación estadística entre p16 y edad ($p=0.08$), expresándose p16 especialmente en el grupo de pacientes mayores de 45 años (94%) y menos en el grupo de 0-20 años (66%). Este dato no está referido en la literatura.

El segundo, en la línea de los resultados obtenidos por Kim et al, es que observamos una correlación negativa entre p16 y el VEB (determinado mediante gp220) muy cercana a la significación estadística ($p=0.06$). Así, cuando el VEB es positivo p16 suele ser negativa. Esta tendencia no se observa si lo estudiamos por separado en cada grupo de edad. Nuestros datos por lo tanto apoyan la teoría de que el VEB bloquea a p16 y contribuye por lo tanto a la progresión del ciclo celular. En este caso esperaríamos, como ocurría con las ciclinas, que esa relación fuese más marcada en el grupo pediátrico o el de pacientes de edad avanzada, pero en esta ocasión esto no ocurre. Nuestros resultados deben interpretarse con precaución, dados los tamaños muestrales con los que trabajamos, pero de nuevo podría deberse a que la acción del VEB active diferentes vías moleculares.

P21

P21 es, junto con p27 y p53 un miembro de la familia de proteínas KIP (CIP), proteínas inhibidoras de cdk.

La expresión de p21 en el LHc es variable en los estudios analizados; gran número de ellos refieren que suele estar sobreexpresada (60-80%) pero algunos observan baja expresión. Como vimos anteriormente, son numerosos los motivos que pueden explicar esta variabilidad.

Liu et al. recogen una relación clara entre presencia del VEB y supresión de p21, y muestran en estudios experimentales realizados en líneas celulares de LHc que concretamente los EBERs podrían tener acción antiapoptótica al inhibir a p21 mediante p53. [316] No obstante, otros trabajos como el de Kolar et al. observan justo lo contrario, una tendencia (no estadísticamente significativa) a mayor expresión de p21 en los casos VEB positivos que en los VEB negativos. Este trabajo, no obstante, también observa la asociación entre p21 y mayor actividad antiapoptótica.[203]

En nuestra serie, p21 es positiva en el 40.3% de los casos. Esta cifra está dentro de lo que refiere la literatura. Pero los resultados novedosos y que no refleja ningún trabajo son los siguientes:

- p21 es mucho mas frecuente en los pacientes de 0-20 años y este hallazgo es estadísticamente significativo.
- Observamos una correlación negativa muy significativa entre p21 y el VEB (determinado mediante LMP1), pero esta correlación negativa se establece a expensas principalmente del grupo de mayores de 45 años. En este grupo la correlación es más intensa, ya se determine el VEB mediante EBER, LMP1 o PCR DNAgp220, y en cambio no existe relación en los otros dos grupos de edad.

Nuestros resultados están por lo tanto en la línea de los obtenidos por Liu, y aportan además esos dos datos diferenciales de cada grupo de edad. No podemos analizar estos resultados comparándolos con otros trabajos porque no existen en la literatura estudios que realicen estos subanálisis, pero podrían ayudar a entender algunas aparentes discrepancias existentes; por ejemplo, la diferencia de expresión de p21 en función de la edad que detectamos en nuestro trabajo podría ayudar a explicar el hecho de la gran variabilidad de expresión que muestra la literatura. Así mismo, en relación al papel del VEB en la regulación de p21, podríamos plantear la hipótesis de que el VEB realmente podría desempeñar algún papel en la regulación de esta vía, pero tal vez únicamente en los pacientes mayores de 45 años. ¿Cuál es entonces la explicación para que exista esa sobreexpresión en el grupo pediátrico y en cambio en ese grupo no apreciamos esa correlación p21-VEB? Podríamos plantear la hipótesis de que p21 está activa en ese grupo de edad de forma constitutiva, independientemente del VEB.

P27

P27 es otro de los miembros de la familia KIP, proteínas inhibidoras de cdk. Además de su conocida acción supresora de la proliferación celular, se ha sugerido que puede ejercer

también un papel regulador de la apoptosis en diferentes tumores, con acción pro o antiapoptótica en función de activación o inactivación de determinadas vías de señalización etc. Así, algunos trabajos observan acción antiapoptótica en LHc en relación a la expresión de p27. Estos casos además, tendrían una tendencia (no significativa) a ser VEB positivo, con lo que podría ser que VEB jugase algún papel en la expresión de p27. [203] Otros trabajos, como el de García et al observan justo lo contrario, una relación inversa entre VEB y p27 que es estadísticamente significativa.[56]

La literatura refleja de forma unánime que p27 suele estar subexpresada en el LHc (23-33% de los pacientes), dato congruente con la sobreexpresión observada de ciclina E y CDK2.[40, 202]

En nuestra serie observamos que p27 es positivo en el 17% de los casos.

Observamos que existe una dependencia significativa entre p27 y VEB (diagnosticado por gp220) idéntica a la que sugiere Kolar et al. en su trabajo. Así, cuando el VEB es positivo p27 suele ser también positiva. No observamos relación entre ellos cuando lo estudiamos de forma individual en cada grupo de edad.

Por lo tanto nuestro trabajo apoyaría la hipótesis de que efectivamente el VEB desempeña algún papel en la activación o expresión de p27. Los mecanismos que determinen su acción final (pro o antiapoptóticos) en el momento actual aun no son conocidos. No se observan diferencias en función de la edad, posiblemente debido a que la baja expresión de esta proteína dificulta el estudio por grupos de edad.

P53

La proteína p53 en condiciones normales se acumula en respuesta a lesiones en el ADN y actúa interrumpiendo el ciclo celular a nivel de G1 y/o promoviendo la apoptosis. La alta expresión de p53 en las células HRS, en contraste con la ausencia de expresión en las células no tumorales que las rodean, sugiere que ésta p53 es inactiva y por ello no puede frenar el ciclo celular.[309]

Tanto la expresión de p53 como su asociación con VEB es variable y controvertida según los diferentes trabajos existentes. Suele detectarse sobreexpresada, entre el 50-70% de los casos según los trabajos que lo estudian, aunque García et al., en su trabajo realizado también en MTA observaron positividad de p53 únicamente en el 15% de los casos. [56, 314]

Al Salam et al. observan una clara asociación entre la expresión de p53 y del VEB, lo que sugeriría que el VEB podría ser un factor dominante en la expresión de p53. Además observan una alta actividad Ki-67 y un índice apoptótico disminuido en los casos p53 positivo respecto los casos p53 negativos, lo que sería otra prueba mas a favor de que el papel de p53 en la apoptosis es relevante y está afectado.[309]

Diferentes trabajos apoyan esta teoría; se cree que LMP1 podría jugar ser clave en la inactivación de p53 o que podrían ser este, junto con mecanismos indirectos aun no conocidos, los que podrían provocar la inactivación de p53.[315] No obstante, otros trabajos como el de García et al observan una relación inversa entre p53 y VEB, y que es estadísticamente significativa. [56, 309]Son necesarias mas investigaciones en este sentido.

En nuestra serie observamos que p53 es positivo en el 19% de los casos, lo que estaría más en la línea del primer trabajo de García et al. No observamos diferencias por grupos de edad ni tampoco observamos ninguna relación con el VEB, ni en la muestra global ni estudiando cada grupo de edad de forma individualizada, por lo que no podemos aportar nuevas evidencias en este punto.

Bcl-2

Bcl-2 fue la primera proteína de la familia de proteínas bcl que se describió, concretamente en 1988. [317] Existen múltiples estudios que analizan la expresión de esta proteína antiapoptótica en el LHC, obteniéndose resultados diversos, con bcl-2 positiva entre el 30 y 80% de los casos [211]

Algunos autores han estudiado si realmente bcl-2 se correlaciona con actividad antiapoptótica en el LHC, pero solo Wang et al lo han demostrado. [225]

Los mecanismos genéticos que provocarían la sobreexpresión de bcl-2 no son bien conocidos. Se hipotetizó que t(14;18) podría estar implicada, pero diversos trabajos descartaron esta teoría.[318]

Se ha estudiado en profundidad el posible papel que pueda desempeñar el VEB en la expresión de bcl-2. Esta idea surge a partir del modelo de los trastornos linfoproliferativos post-trasplante, en los que se ha demostrado esta asociación, y a partir de estudios experimentales que muestran sobreexpresión de bcl-2 en línea celulares al ser expuestos a LMP1. [319, 320]De nuevo los trabajos existentes son discordantes, puesto que algunos grupos como el de Preciado et al., concretamente en casos pediátricos observan correlación positiva entre VEB y bcl-2, otros como el de Kim et al. o el grupo de Khan et al. o el de Vasallo et al. refieren una relación inversa entre bcl-2 y VEB, y otros como el de Lauritzen et al. no aprecian ninguna relación. [211, 221, 321-324]

A raíz de estos resultados, como veremos a continuación, algunos grupos sugieren que posiblemente bcl-xl juegue un papel mas importante que bcl-2 en la inhibición de la apoptosis que caracteriza a las células HRS.

En nuestra muestra la expresión de bcl-2 ha sido del 20.8%.

No observamos diferencia de expresión de bcl-2 entre grupos de edad. Tampoco observamos concordancia entre bcl-2 y el VEB por ninguna de las tres técnicas ni tampoco si lo analizamos de forma individual en cada uno de los 3 grupos, con lo que estaríamos en la línea del trabajo de Lauritzen o de Jiwa que no apreciaban relaciones entre bcl-2 y VEB.

Bcl-xl

Bcl-xl es otra de las proteínas que forman parte del sistema antiapoptótico celular. Fue descubierta en 1993 y desde entonces ha sido objeto de numerosos estudios. [325]. Bcl-xl se encuentra sobreexpresada en las células HRS en una elevada proporción de casos, de forma más marcada que bcl-2 (67-94% de los casos según los diferentes trabajos). Además existen trabajos que demuestran que efectivamente esta sobreexpresión se correlaciona con actividad antiapoptótica.[211, 326, 327]

En cuanto a la relación entre VEB y bcl-xl, García et al observan una relación inversa entre ambos, que es estadísticamente significativa. [56]

En nuestra muestra bcl-xl es positivo en el 54.8% de los pacientes.

Existe una dependencia muy significativa y no descrita en la literatura entre edad y bcl-xl, observándose que bcl-xl es negativo con gran frecuencia en el grupo de 0-20 años (85% de los casos), siendo en los otros 2 grupos mayoritariamente positivo (77% en el grupo 20-45 y 83% en el grupo de >45 años). De nuevo consideramos que este hallazgo podría explicar la diferente expresión de la proteína que observan los trabajos realizados.

Se aprecia correlación positiva que casi muestra significación estadística entre bcl-xl y el VEB determinado mediante LMP-1, siendo bcl-xl más frecuentemente positivo cuando el VEB es positivo ($p=0.06$)

Por grupos de edad, en el grupo de 0-20 años de nuevo observamos la misma tendencia a la dependencia positiva entre bcl-xl y el VEB, en este caso cuando se determina mediante gp220.

Estos resultados pueden sugerir que bcl-xl podría desempeñar un papel importante en la evasión de la apoptosis en adultos, pero que en cambio en niños su papel sería mucho menor. Su intrigante asociación con el VEB en el grupo de 0-20 años, en el que curiosamente presenta muy baja expresión, puede ser debida a cuestiones meramente metodológicas o puede traducir disrupciones de vías de señalización que por el momento desconocemos.

Bax

Bax es uno de los miembros proapoptóticos de la familia de proteínas bcl-2, concretamente fue el primer homólogo de bcl-2 que se demostró que tenía acción agonista de la muerte celular. [328] Esta proteína está expresada en la mayoría de casos de LHc (74-95% de los casos), pero esto no se traduce en un aumento demostrado de actividad apoptótica o de sensibilidad a agentes quimioterápicos inductores de apoptosis. Además se ha demostrado que estos tumores muy frecuentemente coexpresan proteínas bax y bcl-2 o bax y bcl-xl, o incluso las tres.

Así, se cree que tal vez, más que la expresión de cada una de estas proteínas, lo que determina el grado de resistencia o tendencia a la apoptosis en estos tumores es el equilibrio entre las diferentes proteínas pro y antiapoptóticas.[327, 329]

En nuestra serie, bax es positivo en 63.2% de los pacientes (43/68)

Se observa clara tendencia a una mayor positividad, cercana a la significación estadística, en el grupo de 0-20 años, observándose que bax es positivo en el 79% de los casos, siendo solo positivo en el 53-55% de los casos en los otros 2 grupos de pacientes. Rassidakis et al también observaron correlación entre mayor positividad de bax con edad joven, sin poder sugerir una base biológica a esta asociación. [329]

En nuestra serie tampoco observamos relación entre bax y VEB, aunque sí se observa una tendencia a la correlación negativa entre el VEB (determinado por gp220) y bax en el grupo de 0-20 años. Este hecho, la elevada expresión de bax en el grupo pediátrico junto con la correlación negativa con el VEB concretamente en ese grupo (en el que el VEB está claramente presente), es aparentemente contradictorio, y de nuevo debe ser interpretado

con cautela, pues posiblemente se deba únicamente a los tamaños muestrales. En caso de que fuese real traduciría complejas alteraciones biológicas que por el momento no son conocidas. No se observan dependencias en los otros 2 grupos de pacientes, ni tampoco por las otras 2 técnicas.

Relaciones entre proteínas

Relación entre ciclina E y p27

Es conocido que ciclina E y CDK2 suelen estar sobreexpresados en LHC y p27, que interactúa con ellos bloqueándolos, está generalmente subexpresada. Esta relación, que se observa de forma prácticamente universal en este tumor, puede explicar el elevado crecimiento que muestran las células HRS. [56]

En nuestro estudio comprobamos que efectivamente existe una tendencia a que cuando ciclina E es positiva p27 en la mayoría de los casos es negativa. Esta correlación negativa es mas potente y muy cercana a la significación estadística en el grupo de 0-20 años y en los otros dos grupos de edad no apreciamos relación. Esto tal vez nos está explicando que esa relación es exclusiva de ese grupo de edad. Además, al analizar como influye el VEB sobre la relación entre esas dos proteínas, observamos como la relación negativa es más importante cuando el VEB (determinado por gp220) es positivo, y en cambio no existe relación entre ciclina E y p27 cuando el VEB es negativo.

No existen trabajos que refieran hallazgos similares a los nuestros, puesto que los trabajos existentes no analizan la relación entre estas dos proteínas en función de la edad y del VEB.

Los mecanismos moleculares que mantienen o hacen posible esa interacción entre ciclina E, p27 y VEB, aun no bien conocidos, posiblemente sean diferentes en función de la edad. Consideramos que nuestros resultados apoyan y ratifican la teoría de que el LHC se comporta de forma diferente en función de la edad de los pacientes, probablemente debido a la acción del VEB.

Relación entre ciclina A y p27

La literatura refiere que suele apreciarse conjuntamente sobreexpresión de ciclina A y subexpresión de p27 [203]. En ocasiones se observa sobreexpresión de ambas, pero se considera que es debida a que existe una expresión aberrante de p27 inactiva. [56]

En nuestra serie también se observa esta tendencia a la correlación inversa entre ciclina A y p27 ($p=0.10$). Al igual que en el caso anterior, esta relación inversa es especialmente importante en el grupo de 0-20 años, donde llega a alcanzar la significación estadística ($p=0.04$), en cambio no hay relación en los otros dos grupos de edad. Pero en este caso observamos que esta relación es más intensa cuando el VEB es negativo (determinado mediante LMP1), cercana a ser estadísticamente significativa ($p=0.13$), y en cambio no existe relación alguna cuando el VEB es positivo. De nuevo, nuestros datos son novedosos dado que no están descrito en la literatura y podrían contribuir a una mejor comprensión de los mecanismos disregulados en las células HRS y del papel del VEB en el LHC.

Relación entre ciclina B1 y p27

No observamos en nuestro trabajo la esperable relación inversa entre estas dos proteínas, pero sí observamos una tendencia en ese sentido cuando el VEB es positivo. Este dato tampoco existe en la literatura y también puede ser de utilidad para mejorar la comprensión de la fisiopatología del LHc.

Relación entre ciclina A y p53

La mayoría de trabajos existentes en la literatura refieren sobreexpresión de p53 (inactivada) asociada a sobreexpresión de ciclina A, por pérdida de su función. [176, 187]

Al estudiar nuestra serie no observamos ninguna relación destacable en el grupo general, pero aparece una interesante tendencia a la correlación inversa entre ciclina A y p53, que es casi estadísticamente significativa, en el grupo de 21-44 años y cuando el VEB es negativo. Este hallazgo, que no está referido en la literatura, sería conceptualmente coherente, puesto que ese es el grupo de pacientes que habitualmente son VEB negativos. El porque existe esa relación inversa concretamente en este grupo no es conocido, pero muy probablemente esté en relación a los mecanismos moleculares que el VEB regula o desregula, sea de forma directa o indirecta. De nuevo recordar que las diferentes edades de los pacientes recogidos en los trabajos puede ser la responsable, al menos parcialmente, de la variabilidad de los resultados que dichos trabajos obtienen.

Relación entre ciclina B1 y p53

Estudiamos si la sobreexpresión de ciclina B1 se correlaciona con baja expresión de p53 como describe la literatura. Al igual que con ciclina A y p53, observamos que efectivamente parece existir una tendencia a la relación inversa entre ellas, pero esa relación es más potente, muy cercana a ser estadísticamente significativa, en el grupo de edad de 21-44 años ($p=0.07$) y cuando el VEB es negativo (determinado mediante gp220). Estos hallazgos tampoco están referidos en la literatura. Podríamos por lo tanto sugerir la misma explicación que en el caso anterior.

Relación entre ciclina D1 y p16

Estudiamos si la sobreexpresión de ciclina D1, como describe la literatura, se correlaciona con baja expresión de p16.[40] Sorpresivamente observamos el efecto contrario, es decir, cuando ciclina D1 es positiva p16 suele ser positiva, y esta observación tiene una fuerte significación estadística ($p=0.00012$)

Al igual que ocurre en los 2 casos anteriores (ciclina A-p53, ciclina B1-p53), vemos que esta asociación positiva es muy potente en el grupo de pacientes de 21-44 años ($p=0.00017$), y en cambio no se aprecia en los otros dos grupos de edad, y también es muy potente cuando el VEB es negativo. Estos datos, de nuevo, tampoco existe en la literatura.

En este caso los datos estadísticos son rotundas y, pese a ir en contra de lo que refleja mayoritariamente la literatura, debemos tomarlos en consideración. Es posible que encon-

tremos esta correlación positiva entre ciclina D1 y p16 a expensas del grupo de 20-44 años, es decir, que únicamente se produzca en ese grupo y que al ser tan potente estadísticamente también lo observemos en el grupo global. Nos reiteramos en las hipótesis formuladas al analizar las relaciones anteriores.

Relación entre p53 y bcl2

Algunos trabajos estudian esta relación pero los resultados son poco concluyentes. [56, 76, 225]. En nuestra serie observamos una correlación positiva entre ambas que está cercana a la significación estadística ($p=0.12$)

Como en los casos anteriores, esta correlación es a expensas del grupo de edad de 21-44 años y también se aprecia cuando el VEB es negativo, y en cambio no se aprecia en los otros dos grupos de edad ni tampoco cuando el VEB es positivo. Ambas asociaciones son estadísticamente significativas. Estos hallazgos no constan en la literatura, y sugerirían de nuevo que la ausencia del VEB sería necesaria para que esa relación ocurriese.

Relación entre p53 y bax

Algunos trabajos estudian la relación entre p53 y bax, no encontrándose relaciones. En nuestra serie tampoco observamos ninguna relación, ni en la muestra global, ni estudiándolo por grupos de edad ni en relación a la presencia o no del VEB. Esto apoyaría la teoría de que realmente no existe un equilibrio o una influencia mutua entre estas dos proteínas.

Relación entre proteínas de ciclo celular y de apoptosis con pronóstico

Existen numerosos trabajos que estudian la relación entre expresión de estas proteínas, presencia o no del VEB y pronóstico de la enfermedad. Los resultados que ofrecen estos trabajos son en ocasiones contradictorios y el poder predictivo que ofrecen, ya sea de forma independiente o combinada, es escaso, por lo no han conseguido establecerse como marcadores biológicos universalmente aceptados.

Se han referido alteraciones de la expresión de proteína p53, alteraciones de la expresión de proteína p21, disregulación de los miembros de la familia bcl-2, aumento de los índices de proliferación y/o apoptosis, etc.

Varios trabajos parecen coincidir en que la sobreexpresión de Bcl-2 o de bcl-xl se asocia con disminución de la supervivencia global y/o de la supervivencia libre de evento [56, 330] aunque alguno en cambio le confiere buen pronóstico. [221]

En referencia a bax, García et al. refieren empeoramiento significativo de la supervivencia cuando existe sobreexpresión de bax, dato a priori no esperable, pero en cambio Raskin et al no observan influencia de la expresión de bax sobre el pronóstico.[56, 329]

En relación a p53, los trabajos existentes parecen coincidir en la observación de que la expresión de p53 se asocia con una disminución significativa de la supervivencia. [56, 76, 220]. En cambio, en relación a p21, Liu et al observan peor pronóstico en relación a supresión de p21 [316] y en cambio Kolar et al observan una tendencia no significativa a peor

pronóstico en relación a expresión de p21. Este mismo grupo observa también tendencia a peor pronóstico asociado a expresión de p27.[203]

En nuestro trabajo únicamente 3 proteínas podrían tener valor pronóstico. Tanto la expresión de ciclina D1 como la expresión de bcl-2 y bcl-xl se asocian a mal pronóstico, con una potencia cercana a la significación estadística ($p=0.10$). Como hemos referido, está bien descrito y existe un cierto consenso en cuanto al valor pronóstico desfavorable de las proteínas de la familia bcl-2. En referencia a ciclina D, únicamente Kolar et al. estudian su capacidad predictora de pronóstico pero no obtienen resultados concluyentes. Si consideramos que esta proteína es uno de los componentes de la vía Rb-p16-ciclina D1, existe algún trabajo que observa que la pérdida de expresión de Rb se asocia de forma estadísticamente significativa con mal pronóstico. [164] Dado que Rb se caracteriza por su actividad supresora tumoral, su pérdida de expresión podría asociarse con la sobreexpresión de ciclina D1 que nosotros observamos, y por lo tanto sería lógica y esperable nuestra observación.

Para terminar y como resumen de todos los datos analizados podemos decir que nuestro grupo de pacientes y los subgrupos cuando los estudiamos por franjas de edad, presentan un perfil inmunohistoquímico específico y se caracterizan de la siguientes forma:

- Las células HRS sobreexpresan ciclina E, ciclina A ciclina B1 y p16. Presentan moderada expresión de ciclina D1, p21, bax y bcl-xl, y presentan baja expresión de p27, p53 y bcl-2
- Los pacientes de 0-20 años sobreexpresan p21 y bax, y este es un hallazgo exclusivo de este grupo de edad.
- Los pacientes mayores de 45 años sobreexpresan las cuatro ciclinas pero muy especialmente ciclina D1. También sobreexpresan p16 y bcl-xl. Estos hallazgos también son exclusivos de este grupo de edad.
- El VEB presenta una correlación positiva en la población general con p27 y bcl-xl. Presenta correlación negativa con ciclina D1, p16 y p21.
- La presencia del VEB en el grupo de pacientes de 0-20 años se asocia a la sobreexpresión de ciclina E, ciclina A, ciclina B1, bcl-xl y con subexpresión de bax.
- La presencia del VEB en pacientes mayores de 45 años se asocia con subexpresión de p21.
- Las correlaciones inversas entre ciclina A-p53 y entre ciclina B1-p53 son mas importantes en el grupo de pacientes de 21-44 años y cuando el VEB es negativo que en el grupo global.
- Las correlaciones positivas entre ciclina D1 y p16 y entre p53 y bcl-2 son más importante en el grupo de pacientes de 21-44 años y cuando el VEB es negativo que en la población global
- Existe una tendencia a la correlación inversa entre ciclina B1 y p27 únicamente cuando el VEB es positivo.
- Existe una tendencia a la correlación inversa entre ciclina E y p27, que es especialmente importante en el grupo de pacientes de 0-20 años y cuando el VEB es positivo.
- Existe una tendencia a la correlación inversa entre ciclina A y p27, que es especial-

mente importante en el grupo de pacientes de 0-20 años. Su relación con el VEB es discutible.

En resumen, en nuestro trabajo hemos analizado una serie de pacientes afectados de LHc de forma global y de forma comparativa en función de la edad. Esto ha permitido obtener una serie de resultados no descritos previamente en la literatura.

Consideramos que estos resultados apoyan el modelo teórico de las “tres enfermedades” propuesto por MacMahon, y también apoyan el papel patogénico del VEB. El conocimiento de los diferentes mecanismos patogénicos existentes en el LHc debe ayudar a la mejor comprensión de la enfermedad.

Demostramos que cada grupo de edad presenta un patrón de disregulación molecular específico, y que la presencia del VEB, tanto en los pacientes de 0-20 años como en los pacientes mayores de 45 años, condiciona que presenten perfiles inmunohistoquímicos característicos.

Son necesarios nuevos trabajos con mayor número de pacientes pediátricos y adultos en los que se relacionen los estudios moleculares y los factores clínicos y epidemiológicos. Esto podría permitir en el futuro identificar a los pacientes de riesgo de mala respuesta al tratamiento que pudieran beneficiarse de los tratamientos dirigidos.

11. CONCLUSIONES

1. El VEB está presente en las células tumorales de los pacientes afectos de LHC de nuestra población en el 47% de los casos. Esta presencia del VEB es más elevada en los pacientes de edad avanzada y en los de edad pediátrica, especialmente en los menores de 10 años y en los mayores de 60 años.
2. Las técnicas LMP1 y EBER para la determinación de la infección latente por el VEB presentan una elevada concordancia. La utilización de técnicas de PCR para detección de ADN gp220 únicamente tiene una correcta sensibilidad y concordancia en los pacientes de 0 a 20 años.
3. El LHC se presenta habitualmente en estadio III-IV. La presencia del VEB en el tumor se asocia con estadios más bajos en el momento del diagnóstico.
4. Las variables que se asocian con mayor supervivencia en nuestro grupo de pacientes son la edad entre 0 y 20 años y la positividad del VEB en el tumor.
5. Las células HRS presentan complejas disregulaciones de las proteínas del ciclo celular y de la apoptosis que se caracterizan por sobreexpresión de ciclina E, ciclina A y p16 y subexpresión de p27, p53 y bcl-2
6. Existen patrones inmunohistoquímicos de expresión de las proteínas de ciclo celular y de la apoptosis que son característicos y específicos de cada grupo de edad.
7. La presencia del VEB en las células HRS se asocia con la expresión de un patrón de proteínas determinado y tiene un efecto modulador de las relaciones entre las proteínas inductoras del ciclo celular y de sus inhibidores. Estos datos apoyan que no solo la patogenia sino también los mecanismos fisiopatológicos alterados en el LHC son diferente en función de la edad de los pacientes, probablemente en relación al VEB.
8. Se observa una tendencia a que haya una disminución de la supervivencia en relación con la sobreexpresión de ciclina D1 y de bcl-xl.

12. BIBLIOGRAFÍA

1. R., V., *Omnis cellula ex cellula*. Die cellularpathologie in ihrer Begründung auf physiologische und pathologische Gewebenlehre 1858.
2. Thomas, L., *Notes of a biology-watcher. On cloning a human being*. N Engl J Med, 1974. **291**(24): p. 1296-7.
3. Sherr, C.J., *The Pezcoller lecture: cancer cell cycles revisited*. Cancer Res, 2000. **60**(14): p. 3689-95.
4. Alberts, B., *Biología molecular de la célula*. 3ª edición ed1996, Barcelona.
5. Grana, X. and E.P. Reddy, *Cell cycle control in mammalian cells: role of cyclins, cyclin dependent kinases (CDKs), growth suppressor genes and cyclin-dependent kinase inhibitors (CKIs)*. Oncogene, 1995. **11**(2): p. 211-9.
6. Martinez-Carpio, P.A. and M.A. Navarro Moreno, *[Growth factors, cell damage, cyclin-dependent kinases and their inhibitors: relevance in molecular pathology of human cancer]*. Med Clin (Barc), 2003. **120**(7): p. 265-71.
7. Elledge, S.J., *Cell cycle checkpoints: preventing an identity crisis*. Science, 1996. **274**(5293): p. 1664-72.
8. Landgren, O., et al., *Risk factors for lymphoproliferative disorders after allogeneic hematopoietic cell transplantation*. Blood, 2009. **113**(20): p. 4992-5001.
9. Fuster, J.J., et al., *Control of cell proliferation in atherosclerosis: insights from animal models and human studies*. Cardiovasc Res, 2010. **86**(2): p. 254-64.
10. Kerr, J.F., A.H. Wyllie, and A.R. Currie, *Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics*. Br J Cancer, 1972. **26**(4): p. 239-57.
11. Thompson, C.B., *Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease*. Science, 1995. **267**(5203): p. 1456-62.
12. Lowe, S.W. and A.W. Lin, *Apoptosis in cancer*. Carcinogenesis, 2000. **21**(3): p. 485-95.
13. Cotter, T.G., *Apoptosis and cancer: the genesis of a research field*. Nat Rev Cancer, 2009. **9**(7): p. 501-7.
14. Hanahan, D. and R.A. Weinberg, *The hallmarks of cancer*. Cell, 2000. **100**(1): p. 57-70.
15. Thompson, M.P. and R. Kurzrock, *Epstein-Barr virus and cancer*. Clin Cancer Res, 2004. **10**(3): p. 803-21.
16. Delecluse, H.J., et al., *Epstein Barr virus-associated tumours: an update for the attention of the working pathologist*. J Clin Pathol, 2007. **60**(12): p. 1358-64.
17. Rickinson, A., *Epstein-Barr virus*. Virus Res, 2002. **82**(1-2): p. 109-13.
18. Williams, H. and D.H. Crawford, *Epstein-Barr virus: the impact of scientific advances on clinical practice*. Blood, 2006. **107**(3): p. 862-9.
19. Kuppers, R., *B cells under influence: transformation of B cells by Epstein-Barr virus*. Nat Rev Immunol, 2003. **3**(10): p. 801-12.
20. Gandhi, M.K., J.T. Tellam, and R. Khanna, *Epstein-Barr virus-associated Hodgkin's lymphoma*. Br J Haematol, 2004. **125**(3): p. 267-81.
21. Thorley-Lawson, D.A., *Epstein-Barr virus: exploiting the immune system*. Nat Rev Immunol, 2001. **1**(1): p. 75-82.

22. Qu, L. and D.T. Rowe, *Epstein-Barr virus latent gene expression in uncultured peripheral blood lymphocytes*. J Virol, 1992. **66**(6): p. 3715-24.
23. Miyashita, E.M., et al., *Identification of the site of Epstein-Barr virus persistence in vivo as a resting B cell*. J Virol, 1997. **71**(7): p. 4882-91.
24. Hochberg, D., et al., *Demonstration of the Burkitt's lymphoma Epstein-Barr virus phenotype in dividing latently infected memory cells in vivo*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(1): p. 239-44.
25. Bollard, C.M., C.M. Rooney, and H.E. Heslop, *T-cell therapy in the treatment of post-transplant lymphoproliferative disease*. Nat Rev Clin Oncol, 2012. **9**(9): p. 510-9.
26. Weiss, L.M., et al., *Detection of Epstein-Barr viral genomes in Reed-Sternberg cells of Hodgkin's disease*. N Engl J Med, 1989. **320**(8): p. 502-6.
27. Thomas, J.A., et al., *Immunohistology of Epstein-Barr virus-associated antigens in B cell disorders from immunocompromised individuals*. Transplantation, 1990. **49**(5): p. 944-53.
28. Andersson-Anvret, M., et al., *Relationship between the Epstein-Barr virus genome and nasopharyngeal carcinoma in Caucasian patients*. Int J Cancer, 1979. **23**(6): p. 762-7.
29. Epstein, M.A., B.G. Achong, and Y.M. Barr, *Virus Particles in Cultured Lymphoblasts from Burkitt's Lymphoma*. Lancet, 1964. **1**(7335): p. 702-3.
30. Herbst, H., et al., *Epstein-Barr virus latent membrane protein expression in Hodgkin and Reed-Sternberg cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1991. **88**(11): p. 4766-70.
31. Deacon, E.M., et al., *Epstein-Barr virus and Hodgkin's disease: transcriptional analysis of virus latency in the malignant cells*. J Exp Med, 1993. **177**(2): p. 339-49.
32. Brooks, L., et al., *Epstein-Barr virus latent gene transcription in nasopharyngeal carcinoma cells: coexpression of EBNA1, LMP1, and LMP2 transcripts*. J Virol, 1992. **66**(5): p. 2689-97.
33. Hatzubai, A., et al., *Down-regulation of the EBV-encoded membrane protein (LMP) in Burkitt lymphomas*. Int J Cancer, 1987. **40**(3): p. 358-64.
34. Young, L.S. and P.G. Murray, *Epstein-Barr virus and oncogenesis: from latent genes to tumours*. Oncogene, 2003. **22**(33): p. 5108-21.
35. Young, L.S. and A.B. Rickinson, *Epstein-Barr virus: 40 years on*. Nat Rev Cancer, 2004. **4**(10): p. 757-68.
36. Amon, W. and P.J. Farrell, *Reactivation of Epstein-Barr virus from latency*. Rev Med Virol, 2005. **15**(3): p. 149-56.
37. Flavell, J.R., et al., *Down-regulation of the TGF-beta target gene, PTPRK, by the Epstein-Barr virus encoded EBNA1 contributes to the growth and survival of Hodgkin lymphoma cells*. Blood, 2008. **111**(1): p. 292-301.
38. Rezk, S.A. and L.M. Weiss, *Epstein-Barr virus-associated lymphoproliferative disorders*. Hum Pathol, 2007. **38**(9): p. 1293-304.
39. Ambinder, R.F., *Epstein-barr virus and hodgkin lymphoma*. Hematology Am Soc Hematol Educ Program, 2007: p. 204-9.

40. Bai, M., et al., *Cell cycle and apoptosis deregulation in classical Hodgkin lymphomas*. In Vivo, 2005. **19**(2): p. 439-53.
41. Caldwell, R.G., et al., *Epstein-Barr virus LMP2A drives B cell development and survival in the absence of normal B cell receptor signals*. Immunity, 1998. **9**(3): p. 405-11.
42. Mancao, C. and W. Hammerschmidt, *Epstein-Barr virus latent membrane protein 2A is a B-cell receptor mimic and essential for B-cell survival*. Blood, 2007. **110**(10): p. 3715-21.
43. Portis, T., P. Dyck, and R. Longnecker, *Epstein-Barr Virus (EBV) LMP2A induces alterations in gene transcription similar to those observed in Reed-Sternberg cells of Hodgkin lymphoma*. Blood, 2003. **102**(12): p. 4166-78.
44. Liu, T.Y., et al., *EBV-positive Hodgkin lymphoma is associated with suppression of p21cip1/waf1 and a worse prognosis*. Mol Cancer. **9**: p. 32.
45. Amoroso, R., et al., *Quantitative studies of Epstein-Barr virus-encoded microRNAs provide novel insights into their regulation*. J Virol, 2011. **85**(2): p. 996-1010.
46. Vockerodt, M., et al., *The Epstein-Barr virus oncoprotein, latent membrane protein-1, reprograms germinal centre B cells towards a Hodgkin's Reed-Sternberg-like phenotype*. J Pathol, 2008. **216**(1): p. 83-92.
47. Kuppers, R., *The biology of Hodgkin's lymphoma*. Nat Rev Cancer, 2009. **9**(1): p. 15-27.
48. Pallesen, G., et al., *Expression of Epstein-Barr virus latent gene products in tumour cells of Hodgkin's disease*. Lancet, 1991. **337**(8737): p. 320-2.
49. Gulley, M.L. and W. Tang, *Laboratory assays for Epstein-Barr virus-related disease*. J Mol Diagn, 2008. **10**(4): p. 279-92.
50. Anagnostopoulos, I., et al., *Demonstration of monoclonal EBV genomes in Hodgkin's disease and Ki-1-positive anaplastic large cell lymphoma by combined Southern blot and in situ hybridization*. Blood, 1989. **74**(2): p. 810-6.
51. Herbst, H., et al., *High incidence of Epstein-Barr virus genomes in Hodgkin's disease*. Am J Pathol, 1990. **137**(1): p. 13-8.
52. Weiss, L.M., et al., *Epstein-Barr viral DNA in tissues of Hodgkin's disease*. Am J Pathol, 1987. **129**(1): p. 86-91.
53. Pallesen, G., S.J. Hamilton-Dutoit, and X. Zhou, *The association of Epstein-Barr virus (EBV) with T cell lymphoproliferations and Hodgkin's disease: two new developments in the EBV field*. Adv Cancer Res, 1993. **62**: p. 179-239.
54. Qi, Z.L., et al., *Comparison of three methods for the detection of Epstein-Barr virus in Hodgkin's lymphoma in paraffin-embedded tissues*. Mol Med Rep, 2013. **7**(1): p. 89-92.
55. Kuppers, R., A. Engert, and M.L. Hansmann, *Hodgkin lymphoma*. J Clin Invest, 2012. **122**(10): p. 3439-47.
56. Garcia, J.F., et al., *Hodgkin and Reed-Sternberg cells harbor alterations in the major tumor suppressor pathways and cell-cycle checkpoints: analyses using tissue microarrays*. Blood, 2003. **101**(2): p. 681-9.
57. Keegan, T.H., et al., *Epstein-Barr virus as a marker of survival after Hodgkin's lymphoma: a population-based study*. J Clin Oncol, 2005. **23**(30): p. 7604-13.

58. Gulley, M.L., et al., *Guidelines for interpreting EBER in situ hybridization and LMP1 immunohistochemical tests for detecting Epstein-Barr virus in Hodgkin lymphoma*. Am J Clin Pathol, 2002. **117**(2): p. 259-67.
59. Glaser, S.L., et al., *Inter- and intra-observer reliability of Epstein-Barr virus detection in Hodgkin lymphoma using histochemical procedures*. Leuk Lymphoma, 2004. **45**(3): p. 489-97.
60. Kapatai, G. and P. Murray, *Contribution of the Epstein Barr virus to the molecular pathogenesis of Hodgkin lymphoma*. J Clin Pathol, 2007. **60**(12): p. 1342-9.
61. Gallagher, A., et al., *Detection of Epstein-Barr virus (EBV) genomes in the serum of patients with EBV-associated Hodgkin's disease*. Int J Cancer, 1999. **84**(4): p. 442-8.
62. Lei, K.I., et al., *Quantitative analysis of circulating cell-free Epstein-Barr virus (EBV) DNA levels in patients with EBV-associated lymphoid malignancies*. Br J Haematol, 2000. **111**(1): p. 239-46.
63. Wagner, H.J., et al., *Detection of Epstein-Barr virus DNA in peripheral blood of paediatric patients with Hodgkin's disease by real-time polymerase chain reaction*. Eur J Cancer, 2001. **37**(15): p. 1853-7.
64. Landgren, O. and N.E. Caporaso, *New aspects in descriptive, etiologic, and molecular epidemiology of Hodgkin's lymphoma*. Hematol Oncol Clin North Am, 2007. **21**(5): p. 825-40.
65. Campo, E., et al., *The 2008 WHO classification of lymphoid neoplasms and beyond: evolving concepts and practical applications*. Blood. **117**(19): p. 5019-32.
66. Hjalgrim, H., *On the aetiology of Hodgkin lymphoma*. Dan Med J, 2012. **59**(7): p. B4485.
67. Correa, P. and G.T. O'Connor, *Epidemiologic patterns of Hodgkin's disease*. Int J Cancer, 1971. **8**(2): p. 192-201.
68. MacMahon, B., *Epidemiology of Hodgkin's disease*. Cancer Res, 1966. **26**(6): p. 1189-201.
69. Armstrong, A.A., et al., *Epstein-Barr virus and Hodgkin's disease: further evidence for the three disease hypothesis*. Leukemia, 1998. **12**(8): p. 1272-6.
70. Alexander, F.E., et al., *Epidemiological evidence for the 'two-disease hypothesis' in Hodgkin's disease*. Int J Epidemiol, 1991. **20**(2): p. 354-61.
71. Armstrong, A.A., et al., *Prognostic significance of Epstein-Barr virus association in Hodgkin's disease*. Eur J Cancer, 1994. **30A**(7): p. 1045-6.
72. Flavell, K.J., et al., *The effect of Epstein-Barr virus status on outcome in age- and sex-defined subgroups of patients with advanced Hodgkin's disease*. Ann Oncol, 2003. **14**(2): p. 282-90.
73. Kwon, J.M., et al., *The effect of Epstein-Barr virus status on clinical outcome in Hodgkin's lymphoma*. Ann Hematol, 2006. **85**(7): p. 463-8.
74. Macfarlane, G.J., et al., *International patterns in the occurrence of Hodgkin's disease in children and young adult males*. Int J Cancer, 1995. **61**(2): p. 165-9.
75. Cartwright, R.A. and G. Watkins, *Epidemiology of Hodgkin's disease: a review*. Hematol Oncol, 2004. **22**(1): p. 11-26.

76. Montalban, C., et al., *Influence of biologic markers on the outcome of Hodgkin's lymphoma: a study by the Spanish Hodgkin's Lymphoma Study Group*. J Clin Oncol, 2004. **22**(9): p. 1664-73.
77. Au, W.Y., et al., *Hodgkin's lymphoma in Chinese migrants to British Columbia: a 25-year survey*. Ann Oncol, 2004. **15**(4): p. 626-30.
78. Stark, G.L., et al., *Hodgkin's disease in the elderly: a population-based study*. Br J Haematol, 2002. **119**(2): p. 432-40.
79. Flavell, K.J. and P.G. Murray, *Hodgkin's disease and the Epstein-Barr virus*. Mol Pathol, 2000. **53**(5): p. 262-9.
80. Harris, N.L., et al., *The World Health Organization classification of hematological malignancies report of the Clinical Advisory Committee Meeting, Airlie House, Virginia, November 1997*. Mod Pathol, 2000. **13**(2): p. 193-207.
81. Harris, N.L., et al., *Lymphoma classification--from controversy to consensus: the R.E.A.L. and WHO Classification of lymphoid neoplasms*. Ann Oncol, 2000. **11 Suppl 1**: p. 3-10.
82. Harris, N.L., et al., *The World Health Organization classification of neoplastic diseases of the haematopoietic and lymphoid tissues: Report of the Clinical Advisory Committee Meeting, Airlie House, Virginia, November 1997*. Histopathology, 2000. **36**(1): p. 69-86.
83. Marafioti, T., et al., *Origin of nodular lymphocyte-predominant Hodgkin's disease from a clonal expansion of highly mutated germinal-center B cells*. N Engl J Med, 1997. **337**(7): p. 453-8.
84. Cossman, J., et al., *Reed-Sternberg cell genome expression supports a B-cell lineage*. Blood, 1999. **94**(2): p. 411-6.
85. Brauninger, A., et al., *Identification of common germinal-center B-cell precursors in two patients with both Hodgkin's disease and non-Hodgkin's lymphoma*. N Engl J Med, 1999. **340**(16): p. 1239-47.
86. Kuppers, R. and K. Rajewsky, *The origin of Hodgkin and Reed/Sternberg cells in Hodgkin's disease*. Annu Rev Immunol, 1998. **16**: p. 471-93.
87. Brauninger, A., et al., *Typing the histogenetic origin of the tumor cells of lymphocyte-rich classical Hodgkin's lymphoma in relation to tumor cells of classical and lymphocyte-predominance Hodgkin's lymphoma*. Cancer Res, 2003. **63**(7): p. 1644-51.
88. Tzankov, A., et al., *Rare expression of T-cell markers in classical Hodgkin's lymphoma*. Mod Pathol, 2005. **18**(12): p. 1542-9.
89. Seitz, V., et al., *Detection of clonal T-cell receptor gamma-chain gene rearrangements in Reed-Sternberg cells of classic Hodgkin disease*. Blood, 2000. **95**(10): p. 3020-4.
90. Brune, V., et al., *Origin and pathogenesis of nodular lymphocyte-predominant Hodgkin lymphoma as revealed by global gene expression analysis*. J Exp Med, 2008. **205**(10): p. 2251-68.
91. Weiss, L.M., et al., *Epstein-Barr virus and Hodgkin's disease. A correlative in situ hybridization and polymerase chain reaction study*. Am J Pathol, 1991. **139**(6): p. 1259-65.

92. Kupperts, R., *New insights in the biology of Hodgkin lymphoma*. Hematology Am Soc Hematol Educ Program, 2012. **2012**: p. 328-34.
93. Rajewsky, K., *Clonal selection and learning in the antibody system*. Nature, 1996. **381**(6585): p. 751-8.
94. Kupperts, R., et al., *Tracing B cell development in human germinal centres by molecular analysis of single cells picked from histological sections*. Embo J, 1993. **12**(13): p. 4955-67.
95. Kupperts, R., et al., *Hodgkin disease: Hodgkin and Reed-Sternberg cells picked from histological sections show clonal immunoglobulin gene rearrangements and appear to be derived from B cells at various stages of development*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1994. **91**(23): p. 10962-6.
96. Kanzler, H., et al., *Hodgkin and Reed-Sternberg cells in Hodgkin's disease represent the outgrowth of a dominant tumor clone derived from (crippled) germinal center B cells*. J Exp Med, 1996. **184**(4): p. 1495-505.
97. Hertel, C.B., et al., *Loss of B cell identity correlates with loss of B cell-specific transcription factors in Hodgkin/Reed-Sternberg cells of classical Hodgkin lymphoma*. Oncogene, 2002. **21**(32): p. 4908-20.
98. Schwering, I., et al., *Loss of the B-lineage-specific gene expression program in Hodgkin and Reed-Sternberg cells of Hodgkin lymphoma*. Blood, 2003. **101**(4): p. 1505-12.
99. Kupperts, R., et al., *Molecular Ig gene analysis reveals that monocytoid B cell lymphoma is a malignancy of mature B cells carrying somatically mutated V region genes and suggests that rearrangement of the kappa-deleting element (resulting in deletion of the Ig kappa enhancers) abolishes somatic hypermutation in the human*. Eur J Immunol, 1996. **26**(8): p. 1794-800.
100. Mathas, S., et al., *Intrinsic inhibition of transcription factor E2A by HLH proteins ABF-1 and Id2 mediates reprogramming of neoplastic B cells in Hodgkin lymphoma*. Nat Immunol, 2006. **7**(2): p. 207-15.
101. Takahashi, H., et al., *Immunophenotypes of Reed-Sternberg cells and their variants: a study of 68 cases of Hodgkin's disease*. Tohoku J Exp Med, 1995. **177**(3): p. 193-211.
102. van den Berg, A., L. Visser, and S. Poppema, *High expression of the CC chemokine TARC in Reed-Sternberg cells. A possible explanation for the characteristic T-cell infiltrate in Hodgkin's lymphoma*. Am J Pathol, 1999. **154**(6): p. 1685-91.
103. Stein, H., et al., *Down-regulation of BOB.1/OBF.1 and Oct2 in classical Hodgkin disease but not in lymphocyte predominant Hodgkin disease correlates with immunoglobulin transcription*. Blood, 2001. **97**(2): p. 496-501.
104. Re, D., et al., *Oct-2 and Bob-1 deficiency in Hodgkin and Reed Sternberg cells*. Cancer Res, 2001. **61**(5): p. 2080-4.
105. Torlakovic, E., et al., *The transcription factor PU.1, necessary for B-cell development is expressed in lymphocyte predominance, but not classical Hodgkin's disease*. Am J Pathol, 2001. **159**(5): p. 1807-14.

106. Kupperts, R., et al., *Identification of Hodgkin and Reed-Sternberg cell-specific genes by gene expression profiling*. J Clin Invest, 2003. **111**(4): p. 529-37.
107. Renne, C., et al., *Aberrant expression of ID2, a suppressor of B-cell-specific gene expression, in Hodgkin's lymphoma*. Am J Pathol, 2006. **169**(2): p. 655-64.
108. Foss, H.D., et al., *Frequent expression of the B-cell-specific activator protein in Reed-Sternberg cells of classical Hodgkin's disease provides further evidence for its B-cell origin*. Blood, 1999. **94**(9): p. 3108-13.
109. Jundt, F., et al., *Aberrant expression of Notch1 interferes with the B-lymphoid phenotype of neoplastic B cells in classical Hodgkin lymphoma*. Leukemia, 2008. **22**(8): p. 1587-94.
110. Ushmorov, A., et al., *Epigenetic processes play a major role in B-cell-specific gene silencing in classical Hodgkin lymphoma*. Blood, 2006. **107**(6): p. 2493-500.
111. Ushmorov, A., et al., *Epigenetic silencing of the immunoglobulin heavy-chain gene in classical Hodgkin lymphoma-derived cell lines contributes to the loss of immunoglobulin expression*. Blood, 2004. **104**(10): p. 3326-34.
112. Scheeren, F.A., et al., *IL-21 is expressed in Hodgkin lymphoma and activates STAT5: evidence that activated STAT5 is required for Hodgkin lymphomagenesis*. Blood, 2008. **111**(9): p. 4706-15.
113. Willenbrock, K., et al., *Common features and differences in the transcriptome of large cell anaplastic lymphoma and classical Hodgkin's lymphoma*. Haematologica, 2006. **91**(5): p. 596-604.
114. Kupperts, R., *Molecular biology of Hodgkin lymphoma*. Hematology Am Soc Hematol Educ Program, 2009: p. 491-6.
115. Farrell, K. and R.F. Jarrett, *The molecular pathogenesis of Hodgkin lymphoma*. Histopathology. **58**(1): p. 15-25.
116. Gilmore, T.D., *Introduction to NF-kappaB: players, pathways, perspectives*. Oncogene, 2006. **25**(51): p. 6680-4.
117. Bargou, R.C., et al., *Constitutive nuclear factor-kappaB-RelA activation is required for proliferation and survival of Hodgkin's disease tumor cells*. J Clin Invest, 1997. **100**(12): p. 2961-9.
118. Fiumara, P., et al., *Functional expression of receptor activator of nuclear factor kappaB in Hodgkin disease cell lines*. Blood, 2001. **98**(9): p. 2784-90.
119. Carbone, A., et al., *Expression of functional CD40 antigen on Reed-Sternberg cells and Hodgkin's disease cell lines*. Blood, 1995. **85**(3): p. 780-9.
120. Kato, M., et al., *Frequent inactivation of A20 in B-cell lymphomas*. Nature, 2009. **459**(7247): p. 712-6.
121. Schmitz, R., et al., *TNFAIP3 (A20) is a tumor suppressor gene in Hodgkin lymphoma and primary mediastinal B cell lymphoma*. J Exp Med, 2009. **206**(5): p. 981-9.
122. Murray, P.J., *The JAK-STAT signaling pathway: input and output integration*. J Immunol, 2007. **178**(5): p. 2623-9.
123. Joos, S., et al., *Genomic imbalances including amplification of the tyrosine kinase gene JAK2 in CD30+ Hodgkin cells*. Cancer Res, 2000. **60**(3): p. 549-52.

124. Mottok, A., et al., *Somatic hypermutation of SOCS1 in lymphocyte-predominant Hodgkin lymphoma is accompanied by high JAK2 expression and activation of STAT6*. *Blood*, 2007. **110**(9): p. 3387-90.
125. Green, M.R., et al., *Integrative analysis reveals selective 9p24.1 amplification, increased PD-1 ligand expression, and further induction via JAK2 in nodular sclerosing Hodgkin lymphoma and primary mediastinal large B-cell lymphoma*. *Blood*, 2010. **116**(17): p. 3268-77.
126. Georgakis, G.V., et al., *Inhibition of the phosphatidylinositol-3 kinase/Akt promotes G1 cell cycle arrest and apoptosis in Hodgkin lymphoma*. *Br J Haematol*, 2006. **132**(4): p. 503-11.
127. Dutton, A., et al., *Constitutive activation of phosphatidyl-inositide 3 kinase contributes to the survival of Hodgkin's lymphoma cells through a mechanism involving Akt kinase and mTOR*. *J Pathol*, 2005. **205**(4): p. 498-506.
128. Mathas, S., et al., *Aberrantly expressed c-Jun and JunB are a hallmark of Hodgkin lymphoma cells, stimulate proliferation and synergize with NF-kappa B*. *Embo J*, 2002. **21**(15): p. 4104-13.
129. Nagel, S., et al., *Comprehensive analysis of homeobox genes in Hodgkin lymphoma cell lines identifies dysregulated expression of HOXB9 mediated via ERK5 signaling and BMI1*. *Blood*, 2007. **109**(7): p. 3015-23.
130. Renne, C., et al., *Autocrine- and paracrine-activated receptor tyrosine kinases in classic Hodgkin lymphoma*. *Blood*, 2005. **105**(10): p. 4051-9.
131. Zheng, B., et al., *MEK/ERK pathway is aberrantly active in Hodgkin disease: a signaling pathway shared by CD30, CD40, and RANK that regulates cell proliferation and survival*. *Blood*, 2003. **102**(3): p. 1019-27.
132. Sanchez-Aguilera, A., et al., *Silencing of the p18INK4c gene by promoter hypermethylation in Reed-Sternberg cells in Hodgkin lymphomas*. *Blood*, 2004. **103**(6): p. 2351-7.
133. Dukers, D.F., et al., *Unique polycomb gene expression pattern in Hodgkin's lymphoma and Hodgkin's lymphoma-derived cell lines*. *Am J Pathol*, 2004. **164**(3): p. 873-81.
134. Raaphorst, F.M., et al., *Coexpression of BMI-1 and EZH2 polycomb group genes in Reed-Sternberg cells of Hodgkin's disease*. *Am J Pathol*, 2000. **157**(3): p. 709-15.
135. Guan, H., et al., *KLF4 is a tumor suppressor in B-cell non-Hodgkin lymphoma and in classic Hodgkin lymphoma*. *Blood*, 2010. **116**(9): p. 1469-78.
136. Aldinucci, D., et al., *Expression of CCR5 receptors on Reed-Sternberg cells and Hodgkin lymphoma cell lines: involvement of CCL5/Rantes in tumor cell growth and microenvironmental interactions*. *Int J Cancer*, 2008. **122**(4): p. 769-76.
137. Biggar, R.J., et al., *Hodgkin lymphoma and immunodeficiency in persons with HIV/AIDS*. *Blood*, 2006. **108**(12): p. 3786-91.
138. Aldinucci, D., et al., *Expression of functional interleukin-3 receptors on Hodgkin and Reed-Sternberg cells*. *Am J Pathol*, 2002. **160**(2): p. 585-96.
139. Jundt, F., et al., *Hodgkin/Reed-Sternberg cells induce fibroblasts to secrete eotaxin, a potent chemoattractant for T cells and eosinophils*. *Blood*, 1999. **94**(6): p. 2065-71.

140. Gandhi, M.K., et al., *Expression of LAG-3 by tumor-infiltrating lymphocytes is coincident with the suppression of latent membrane antigen-specific CD8+ T-cell function in Hodgkin lymphoma patients*. Blood, 2006. **108**(7): p. 2280-9.
141. Marshall, N.A., et al., *Immunosuppressive regulatory T cells are abundant in the reactive lymphocytes of Hodgkin lymphoma*. Blood, 2004. **103**(5): p. 1755-62.
142. Tan, T.T. and L.M. Coussens, *Humoral immunity, inflammation and cancer*. Curr Opin Immunol, 2007. **19**(2): p. 209-16.
143. Gandhi, M.K., et al., *Galectin-1 mediated suppression of Epstein-Barr virus specific T-cell immunity in classic Hodgkin lymphoma*. Blood, 2007. **110**(4): p. 1326-9.
144. Kapp, U., et al., *Disseminated growth of Hodgkin's-derived cell lines L540 and L540cy in immune-deficient SCID mice*. Ann Oncol, 1994. **5 Suppl 1**: p. 121-6.
145. Skinnider, B.F. and T.W. Mak, *The role of cytokines in classical Hodgkin lymphoma*. Blood, 2002. **99**(12): p. 4283-97.
146. Alvaro, T., et al., *Outcome in Hodgkin's lymphoma can be predicted from the presence of accompanying cytotoxic and regulatory T cells*. Clin Cancer Res, 2005. **11**(4): p. 1467-73.
147. Kelley, T.W., et al., *The ratio of FOXP3+ regulatory T cells to granzyme B+ cytotoxic T/NK cells predicts prognosis in classical Hodgkin lymphoma and is independent of bcl-2 and MAL expression*. Am J Clin Pathol, 2007. **128**(6): p. 958-65.
148. Van Vlierberghe, P., et al., *Comparison of miRNA profiles of microdissected Hodgkin/Reed-Sternberg cells and Hodgkin cell lines versus CD77+ B-cells reveals a distinct subset of differentially expressed miRNAs*. Br J Haematol, 2009. **147**(5): p. 686-90.
149. Steidl, C., J.M. Connors, and R.D. Gascoyne, *Molecular pathogenesis of Hodgkin's lymphoma: increasing evidence of the importance of the microenvironment*. J Clin Oncol, 2011. **29**(14): p. 1812-26.
150. Gulley, M.L., et al., *Epstein-Barr virus DNA is abundant and monoclonal in the Reed-Sternberg cells of Hodgkin's disease: association with mixed cellularity subtype and Hispanic American ethnicity*. Blood, 1994. **83**(6): p. 1595-602.
151. Renne, C., et al., *The aberrant coexpression of several receptor tyrosine kinases is largely restricted to EBV-negative cases of classical Hodgkin's lymphoma*. Int J Cancer, 2007. **120**(11): p. 2504-9.
152. Mancao, C., et al., *Rescue of "crippled" germinal center B cells from apoptosis by Epstein-Barr virus*. Blood, 2005. **106**(13): p. 4339-44.
153. Chaganti, S., et al., *Epstein-Barr virus infection in vitro can rescue germinal center B cells with inactivated immunoglobulin genes*. Blood, 2005. **106**(13): p. 4249-52.
154. Bechtel, D., et al., *Transformation of BCR-deficient germinal-center B cells by EBV supports a major role of the virus in the pathogenesis of Hodgkin and posttransplantation lymphomas*. Blood, 2005. **106**(13): p. 4345-50.
155. Brauninger, A., et al., *Molecular biology of Hodgkin's and Reed/Sternberg cells in Hodgkin's lymphoma*. Int J Cancer, 2006. **118**(8): p. 1853-61.
156. Farrell, K. and R.F. Jarrett, *The molecular pathogenesis of Hodgkin lymphoma*. Histopathology, 2011. **58**(1): p. 15-25.

157. Hjalgrim, H., et al., *HLA-A alleles and infectious mononucleosis suggest a critical role for cytotoxic T-cell response in EBV-related Hodgkin lymphoma*. Proc Natl Acad Sci U S A. **107**(14): p. 6400-5.
158. Galloway, D.A. and J.K. McDougall, *The oncogenic potential of herpes simplex viruses: evidence for a 'hit-and-run' mechanism*. Nature, 1983. **302**(5903): p. 21-4.
159. Gallagher, A., et al., *Hodgkin lymphoma and Epstein-Barr virus (EBV): no evidence to support hit-and-run mechanism in cases classified as non-EBV-associated*. Int J Cancer, 2003. **104**(5): p. 624-30.
160. Ambinder, R.F., *Gammaherpesviruses and "Hit-and-Run" oncogenesis*. Am J Pathol, 2000. **156**(1): p. 1-3.
161. Niller, H.H., H. Wolf, and J. Minarovits, *Viral hit and run-oncogenesis: genetic and epigenetic scenarios*. Cancer Lett, 2011. **305**(2): p. 200-17.
162. Delecluse, H.J., et al., *Disappearance of the Epstein-Barr virus in a relapse of Hodgkin's disease*. J Pathol, 1997. **182**(4): p. 475-9.
163. Kanavaros, P., et al., *Expression of p53, p21/waf1, bcl-2, bax, Rb and Ki67 proteins in Hodgkin's lymphomas*. Histol Histopathol, 2000. **15**(2): p. 445-53.
164. Morente, M.M., et al., *Adverse clinical outcome in Hodgkin's disease is associated with loss of retinoblastoma protein expression, high Ki67 proliferation index, and absence of Epstein-Barr virus-latent membrane protein 1 expression*. Blood, 1997. **90**(6): p. 2429-36.
165. Leoncini, L., et al., *Mitotic activity and nuclear DNA damage of large cells in Hodgkin's disease: comparison with the expression of p53 and bcl-2 proteins and the presence of Epstein-Barr virus*. Leuk Lymphoma, 1997. **25**(1-2): p. 153-61.
166. Spina, D., et al., *Growth vs. DNA strand breaks in Hodgkin's disease: impaired proliferative ability of Hodgkin and Reed-Sternberg cells*. Int J Cancer, 1996. **66**(2): p. 179-83.
167. Leoncini, L., et al., *Abortive mitoses and nuclear DNA fragmentation in CD30+ large cells of Hodgkin's disease*. Leuk Lymphoma, 1996. **22**(1-2): p. 119-24, follow 186, color plate XI.
168. Garcia, J.F., et al., *Hodgkin and Reed-Sternberg cells harbor alterations in the major tumor suppressor pathways and cell-cycle checkpoints: analyses using tissue microarrays*. Blood, 2003. **101**(2): p. 681-9.
169. Kallioniemi, O.P., et al., *Tissue microarray technology for high-throughput molecular profiling of cancer*. Hum Mol Genet, 2001. **10**(7): p. 657-62.
170. Nocito, A., et al., *Tissue microarrays (TMAs) for high-throughput molecular pathology research*. Int J Cancer, 2001. **94**(1): p. 1-5.
171. Torhorst, J., et al., *Tissue microarrays for rapid linking of molecular changes to clinical endpoints*. Am J Pathol, 2001. **159**(6): p. 2249-56.
172. Hedvat, C.V., et al., *Macrophage-derived chemokine expression in classical Hodgkin's lymphoma: application of tissue microarrays*. Mod Pathol, 2001. **14**(12): p. 1270-6.
173. Hinz, M., et al., *Constitutive NF-kappaB maintains high expression of a characteristic gene network, including CD40, CD86, and a set of antiapoptotic genes in Hodgkin/Reed-Sternberg cells*. Blood, 2001. **97**(9): p. 2798-807.

174. Izban, K.F., et al., *Characterization of NF-kappaB expression in Hodgkin's disease: inhibition of constitutively expressed NF-kappaB results in spontaneous caspase-independent apoptosis in Hodgkin and Reed-Sternberg cells*. Mod Pathol, 2001. **14**(4): p. 297-310.
175. Hinz, M., et al., *Nuclear factor kappaB-dependent gene expression profiling of Hodgkin's disease tumor cells, pathogenetic significance, and link to constitutive signal transducer and activator of transcription 5a activity*. J Exp Med, 2002. **196**(5): p. 605-17.
176. Bai, M., et al., *Proliferation profile of classical Hodgkin's lymphomas. Increased expression of the protein cyclin D2 in Hodgkin's and Reed-Sternberg cells*. Mod Pathol, 2004. **17**(11): p. 1338-45.
177. Teramoto, N., et al., *Expression of cyclin D2 and D3 in lymphoid lesions*. Int J Cancer, 1999. **81**(4): p. 543-50.
178. Delmer, A., et al., *Overexpression of cyclin D2 in chronic B-cell malignancies*. Blood, 1995. **85**(10): p. 2870-6.
179. Tzankov, A., et al., *High-throughput tissue microarray analysis of G1-cyclin alterations in classical Hodgkin's lymphoma indicates overexpression of cyclin E1*. J Pathol, 2003. **199**(2): p. 201-7.
180. Sanchez-Beato, M., A. Sanchez-Aguilera, and M.A. Piris, *Cell cycle deregulation in B-cell lymphomas*. Blood, 2003. **101**(4): p. 1220-35.
181. Tzankov, A., et al., *Expression of B-cell markers in classical hodgkin lymphoma: a tissue microarray analysis of 330 cases*. Mod Pathol, 2003. **16**(11): p. 1141-7.
182. Li, Y.N., et al., *[The expression of p42/p44MAPK and cyclin D1 protein and their relationship in Hodgkin's disease]*. Hunan Yi Ke Da Xue Xue Bao, 2000. **25**(1): p. 6-8.
183. Kim, J.K. and J.A. Diehl, *Nuclear cyclin D1: an oncogenic driver in human cancer*. J Cell Physiol, 2009. **220**(2): p. 292-6.
184. Erlanson, M., et al., *Expression of cyclin E and the cyclin-dependent kinase inhibitor p27 in malignant lymphomas-prognostic implications*. Blood, 1998. **92**(3): p. 770-7.
185. Spruck, C.H., K.A. Won, and S.I. Reed, *Deregulated cyclin E induces chromosome instability*. Nature, 1999. **401**(6750): p. 297-300.
186. D'Angiolella, V., et al., *Role for cyclin-dependent kinase 2 in mitosis exit*. Curr Biol, 2001. **11**(15): p. 1221-6.
187. Ohshima, K., et al., *Expressions of cyclin E, A, and B1 in Hodgkin and Reed-Sternberg cells: not suppressed by cyclin-dependent kinase inhibitor p21 expression*. Pathol Int, 1999. **49**(6): p. 506-12.
188. den Elzen, N. and J. Pines, *Cyclin A is destroyed in prometaphase and can delay chromosome alignment and anaphase*. J Cell Biol, 2001. **153**(1): p. 121-36.
189. Smits, V.A. and R.H. Medema, *Checking out the G(2)/M transition*. Biochim Biophys Acta, 2001. **1519**(1-2): p. 1-12.
190. Leoncini, L., et al., *Cellular kinetic differences between Hodgkin's and anaplastic large cell lymphomas: relation to the expression of p34cdc2 and cyclin B-1*. Int J Cancer, 1998. **77**(3): p. 408-14.

191. Bellan, C., et al., *CDK9/CYCLIN T1 expression during normal lymphoid differentiation and malignant transformation*. J Pathol, 2004. **203**(4): p. 946-52.
192. Leoncini, L., et al., *Cell kinetics and cell cycle regulation in lymphomas*. J Clin Pathol, 2002. **55**(9): p. 648-55.
193. Hans, C.P., et al., *Confirmation of the molecular classification of diffuse large B-cell lymphoma by immunohistochemistry using a tissue microarray*. Blood, 2004. **103**(1): p. 275-82.
194. Sanchez-Beato, M., et al., *MDM2 and p21WAF1/CIP1, wild-type p53-induced proteins, are regularly expressed by Sternberg-Reed cells in Hodgkin's disease*. J Pathol, 1996. **180**(1): p. 58-64.
195. Kupper, M., et al., *MDM2 gene amplification and lack of p53 point mutations in Hodgkin and Reed-Sternberg cells: results from single-cell polymerase chain reaction and molecular cytogenetic studies*. Br J Haematol, 2001. **112**(3): p. 768-75.
196. Montesinos-Rongen, M., et al., *Mutation of the p53 gene is not a typical feature of Hodgkin and Reed-Sternberg cells in Hodgkin's disease*. Blood, 1999. **94**(5): p. 1755-60.
197. Garcia, J.F., et al., *Nucleolar p14(ARF) overexpression in Reed-Sternberg cells in Hodgkin's lymphoma: absence of p14(ARF)/Hdm2 complexes is associated with expression of alternatively spliced Hdm2 transcripts*. Am J Pathol, 2002. **160**(2): p. 569-78.
198. Maggio, E.M., et al., *TP53 gene mutations in Hodgkin lymphoma are infrequent and not associated with absence of Epstein-Barr virus*. Int J Cancer, 2001. **94**(1): p. 60-6.
199. Taylor, W.R., et al., *Mechanisms of G2 arrest in response to overexpression of p53*. Mol Biol Cell, 1999. **10**(11): p. 3607-22.
200. Malumbres, M. and M. Barbacid, *To cycle or not to cycle: a critical decision in cancer*. Nat Rev Cancer, 2001. **1**(3): p. 222-31.
201. Vermeulen, K., Z.N. Berneman, and D.R. Van Bockstaele, *Cell cycle and apoptosis*. Cell Prolif, 2003. **36**(3): p. 165-75.
202. Tzankov, A., et al., *Aberrant expression of cell cycle regulators in Hodgkin and Reed-Sternberg cells of classical Hodgkin's lymphoma*. Mod Pathol, 2005. **18**(1): p. 90-6.
203. Kolar, Z., et al., *Apoptosis of malignant cells in Hodgkin's disease is related to expression of the cdk inhibitor p27KIP1*. J Pathol, 2000. **190**(5): p. 604-12.
204. Naresh, K.N., et al., *A study of p53 protein, proliferating cell nuclear antigen, and p21 in Hodgkin's disease at presentation and relapse*. Hum Pathol, 1997. **28**(5): p. 549-55.
205. Garcia, J.F., et al., *Loss of p16 protein expression associated with methylation of the p16INK4A gene is a frequent finding in Hodgkin's disease*. Lab Invest, 1999. **79**(12): p. 1453-9.
206. Garcia, M.J., et al., *Different incidence and pattern of p15INK4b and p16INK4a promoter region hypermethylation in Hodgkin's and CD30-Positive non-Hodgkin's lymphomas*. Am J Pathol, 2002. **161**(3): p. 1007-13.

207. Sanchez-Beato, M., et al., *Anomalous high p27/KIP1 expression in a subset of aggressive B-cell lymphomas is associated with cyclin D3 overexpression. p27/KIP1-cyclin D3 colocalization in tumor cells.* Blood, 1999. **94**(2): p. 765-72.
208. Brink, A.A., et al., *Low p53 and high bcl-2 expression in Reed-Sternberg cells predicts poor clinical outcome for Hodgkin's disease: involvement of apoptosis resistance?* Mod Pathol, 1998. **11**(4): p. 376-83.
209. Kuppers, R., *Molecular biology of Hodgkin's lymphoma.* Adv Cancer Res, 2002. **84**: p. 277-312.
210. Messineo, C., et al., *Gene expression by single Reed-Sternberg cells: pathways of apoptosis and activation.* Blood, 1998. **91**(7): p. 2443-51.
211. Kim, L.H., et al., *Expression of Bcl-2 family members and presence of Epstein-Barr virus in the regulation of cell growth and death in classical Hodgkin's lymphoma.* Histopathology, 2004. **44**(3): p. 257-67.
212. Bowman, T., et al., *STATs in oncogenesis.* Oncogene, 2000. **19**(21): p. 2474-88.
213. Ihle, J.N., *The Stat family in cytokine signaling.* Curr Opin Cell Biol, 2001. **13**(2): p. 211-7.
214. Karin, M., Z. Liu, and E. Zandi, *AP-1 function and regulation.* Curr Opin Cell Biol, 1997. **9**(2): p. 240-6.
215. Chang, L. and M. Karin, *Mammalian MAP kinase signalling cascades.* Nature, 2001. **410**(6824): p. 37-40.
216. Vassallo, J., et al., *Expression of Epstein-Barr virus in classical Hodgkin's lymphomas in Brazilian adult patients.* Haematologica, 2001. **86**(11): p. 1227-8.
217. Barros, M.H., et al., *Cell cycle characteristics and Epstein-Barr virus are differentially associated with aggressive and non-aggressive subsets of Hodgkin lymphoma in pediatric patients.* Leuk Lymphoma. **51**(8): p. 1513-22.
218. Rassidakis, G.Z., et al., *BCL-2 expression in Hodgkin and Reed-Sternberg cells of classical Hodgkin disease predicts a poorer prognosis in patients treated with ABVD or equivalent regimens.* Blood, 2002. **100**(12): p. 3935-41.
219. Benharroch, D., et al., *Apoptotic index as a prognostic factor in Hodgkin's disease.* Leuk Lymphoma, 1999. **33**(3-4): p. 351-9.
220. Smolewski, P., et al., *Spontaneous apoptosis of Reed-Sternberg and Hodgkin cells; clinical and pathological implications in patients with Hodgkin's disease.* Int J Oncol, 2000. **17**(3): p. 603-9.
221. Vassallo, J., et al., *The prognostic relevance of apoptosis-related proteins in classical Hodgkin's lymphomas.* Leuk Lymphoma, 2003. **44**(3): p. 483-8.
222. Abele, M.C., et al., *Significance of cell proliferation index in assessing histological prognostic categories in Hodgkin's disease. An immunohistochemical study with Ki67 and MIB-1 monoclonal antibodies.* Haematologica, 1997. **82**(3): p. 281-5.
223. Smolewski, P., et al., *Prognostic factors in Hodgkin's disease: multivariate analysis of 327 patients from a single institution.* Clin Cancer Res, 2000. **6**(3): p. 1150-60.
224. Devilard, E., et al., *Gene expression profiling defines molecular subtypes of classical Hodgkin's disease.* Oncogene, 2002. **21**(19): p. 3095-102.

225. Wang, J. and C.R. Taylor, *Apoptosis and cell cycle-related genes and proteins in classical Hodgkin lymphoma: application of tissue microarray technique*. Appl Immunohistochem Mol Morphol, 2003. **11**(3): p. 206-13.
226. Murray, P.G., et al., *Effect of Epstein-Barr virus infection on response to chemotherapy and survival in Hodgkin's disease*. Blood, 1999. **94**(2): p. 442-7.
227. Montalban, C., et al., *Epstein-Barr virus-latent membrane protein 1 expression has a favorable influence in the outcome of patients with Hodgkin's Disease treated with chemotherapy*. Leuk Lymphoma, 2000. **39**(5-6): p. 563-72.
228. Harris, N.L., *The many faces of Hodgkin's disease around the world: what have we learned from its pathology?* Ann Oncol, 1998. **9 Suppl 5**: p. S45-56.
229. Khan, G., A.J. Norton, and G. Slavin, *Epstein-Barr virus in Hodgkin disease. Relation to age and subtype*. Cancer, 1993. **71**(10): p. 3124-9.
230. Delsol, G., et al., *Correlation of the expression of Epstein-Barr virus latent membrane protein and in situ hybridization with biotinylated BamHI-W probes in Hodgkin's disease*. Am J Pathol, 1992. **140**(2): p. 247-53.
231. Herbst, H., et al., *Distribution and phenotype of Epstein-Barr virus-harboring cells in Hodgkin's disease*. Blood, 1992. **80**(2): p. 484-91.
232. Enblad, G., et al., *Epstein-Barr virus distribution in Hodgkin's disease in an unselected Swedish population*. Acta Oncol, 1999. **38**(4): p. 425-9.
233. Lauritzen, A.F., U. Hording, and H.W. Nielsen, *Epstein-Barr virus and Hodgkin's disease: a comparative immunological, in situ hybridization, and polymerase chain reaction study*. APMIS, 1994. **102**(7): p. 495-500.
234. van Gorp, J., et al., *Encoded latent membrane protein 1 of Epstein-Barr virus on follicular dendritic cells in residual germinal centres in Hodgkin's disease*. J Clin Pathol, 1994. **47**(1): p. 29-32.
235. Jarrett, R.F., et al., *The Scotland and Newcastle epidemiological study of Hodgkin's disease: impact of histopathological review and EBV status on incidence estimates*. J Clin Pathol, 2003. **56**(11): p. 811-6.
236. Glaser, S.L., et al., *Racial/ethnic variation in EBV-positive classical Hodgkin lymphoma in California populations*. Int J Cancer, 2008. **123**(7): p. 1499-507.
237. Tomita, Y., et al., *Epstein-Barr virus in Hodgkin's disease patients in Japan*. Cancer, 1996. **77**(1): p. 186-92.
238. Trimeche, M., et al., *Association between Epstein-Barr virus and Hodgkin's lymphoma in Belgium: a pathological and virological study*. Leuk Lymphoma, 2007. **48**(7): p. 1323-31.
239. Keresztes, K., et al., *Association between the Epstein-Barr virus and Hodgkin's lymphoma in the North-Eastern part of Hungary: effects on therapy and survival*. Acta Haematol, 2006. **116**(2): p. 101-7.
240. Bosch Princep, R., et al., *[Hodgkin's disease. Etiopathogenic role of Epstein-Barr virus in Tarragona]*. Med Clin (Barc), 2000. **114**(11): p. 411-3.
241. Chang, K.C., et al., *Changing patterns in the frequency of Hodgkin lymphoma subtypes and Epstein-Barr virus association in Taiwan*. Cancer Sci, 2008. **99**(2): p. 345-9.

242. Al-Salam, S., et al., *Expression of Epstein-Barr virus in Hodgkin lymphoma in a population of United Arab Emirates nationals*. Leuk Lymphoma, 2008. **49**(9): p. 1769-77.
243. Weinreb, M., 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**(4): p. 365-9.
244. Kanavaros, P., et al., *Frequent detection of Epstein-Barr virus (EBV), EBER transcripts and latent membrane protein-1 (LMP-1) in tumor cells in Hodgkin's disease arising in childhood*. Pathol Res Pract, 1994. **190**(11): p. 1026-30.
245. Brousset, P., et al., *High incidence of Epstein-Barr virus detection in Hodgkin's disease and absence of detection in anaplastic large-cell lymphoma in children*. Histopathology, 1993. **23**(2): p. 189-91.
246. Armstrong, A.A., et al., *Association of Epstein-Barr virus with pediatric Hodgkin's disease*. Am J Pathol, 1993. **142**(6): p. 1683-8.
247. Ambinder, R.F., et al., *Epstein-Barr virus and childhood Hodgkin's disease in Honduras and the United States*. Blood, 1993. **81**(2): p. 462-7.
248. Razzouk, B.I., et al., *Epstein-Barr virus in pediatric Hodgkin disease: age and histiotype are more predictive than geographic region*. Med Pediatr Oncol, 1997. **28**(4): p. 248-54.
249. De Matteo, E., et al., *Comparison of Epstein-Barr virus presence in Hodgkin lymphoma in pediatric versus adult Argentine patients*. Arch Pathol Lab Med, 2003. **127**(10): p. 1325-9.
250. Elgui de Oliveira, D., et al., *Hodgkin disease in adult and juvenile groups from two different geographic regions in Brazil: characterization of clinicopathologic aspects and relationship with Epstein-Barr virus infection*. Am J Clin Pathol, 2002. **118**(1): p. 25-30.
251. Barros, M.H., R. Hassan, and G. Niedobitek, *Disease patterns in pediatric classical Hodgkin lymphoma: a report from a developing area in Brazil*. Hematol Oncol, 2011.
252. Barros, M.H., et al., *Tumor microenvironment composition in pediatric classical Hodgkin lymphoma is modulated by age and Epstein-Barr virus infection*. Int J Cancer, 2012. **131**(5): p. 1142-52.
253. Araujo, I., et al., *The high frequency of EBV infection in pediatric Hodgkin lymphoma is related to the classical type in Bahia, Brazil*. Virchows Arch, 2006. **449**(3): p. 315-9.
254. Dinand, V., et al., *Hodgkin's lymphoma in Indian children: prevalence and significance of Epstein-Barr virus detection in Hodgkin's and Reed-Sternberg cells*. Eur J Cancer, 2007. **43**(1): p. 161-8.
255. Engel, M., et al., *Improved prognosis of Epstein-Barr virus associated childhood Hodgkin's lymphoma: study of 47 South African cases*. J Clin Pathol, 2000. **53**(3): p. 182-6.
256. Zhou, X.G., et al., *Epstein-Barr virus (EBV) in Chinese pediatric Hodgkin disease: Hodgkin disease in young children is an EBV-related lymphoma*. Cancer, 2001. **92**(6): p. 1621-31.

257. Glaser, S.L., et al., *Epstein-Barr virus-associated Hodgkin's disease: epidemiologic characteristics in international data*. Int J Cancer, 1997. **70**(4): p. 375-82.
258. Goldgar, D.E., et al., *Systematic population-based assessment of cancer risk in first-degree relatives of cancer probands*. J Natl Cancer Inst, 1994. **86**(21): p. 1600-8.
259. Goldin, L.R., et al., *Familial aggregation of Hodgkin lymphoma and related tumors*. Cancer, 2004. **100**(9): p. 1902-8.
260. Lindelof, B. and G. Eklund, *Analysis of hereditary component of cancer by use of a familial index by site*. Lancet, 2001. **358**(9294): p. 1696-8.
261. Paltiel, O., et al., *The incidence of lymphoma in first-degree relatives of patients with Hodgkin disease and non-Hodgkin lymphoma: results and limitations of a registry-linked study*. Cancer, 2000. **88**(10): p. 2357-66.
262. Shugart, Y.Y., et al., *A genetic study of Hodgkin's lymphoma: an estimate of heritability and anticipation based on the familial cancer database in Sweden*. Hum Genet, 2000. **106**(5): p. 553-6.
263. Westergaard, T., et al., *Birth order, sibship size and risk of Hodgkin's disease in children and young adults: a population-based study of 31 million person-years*. Int J Cancer, 1997. **72**(6): p. 977-81.
264. Hjalgrim, H., et al., *HLA-A alleles and infectious mononucleosis suggest a critical role for cytotoxic T-cell response in EBV-related Hodgkin lymphoma*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2010. **107**(14): p. 6400-5.
265. Diepstra, A., et al., *Genetic susceptibility to Hodgkin's lymphoma associated with the human leukocyte antigen region*. Eur J Haematol Suppl, 2005(66): p. 34-41.
266. Niens, M., et al., *HLA-A*02 is associated with a reduced risk and HLA-A*01 with an increased risk of developing EBV+ Hodgkin lymphoma*. Blood, 2007. **110**(9): p. 3310-5.
267. Niens, M., et al., *The human leukocyte antigen class I region is associated with EBV-positive Hodgkin's lymphoma: HLA-A and HLA complex group 9 are putative candidate genes*. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, 2006. **15**(11): p. 2280-4.
268. Huang, X., et al., *HLA associations in classical Hodgkin lymphoma: EBV status matters*. PLoS One, 2012. **7**(7): p. e39986.
269. Enciso-Mora, V., et al., *A genome-wide association study of Hodgkin's lymphoma identifies new susceptibility loci at 2p16.1 (REL), 8q24.21 and 10p14 (GATA3)*. Nat Genet, 2010. **42**(12): p. 1126-30.
270. Urayama, K.Y., et al., *Genome-wide association study of classical Hodgkin lymphoma and Epstein-Barr virus status-defined subgroups*. J Natl Cancer Inst, 2012. **104**(3): p. 240-53.
271. Vianna, N.J., et al., *Hodgkin's disease: cases with features of a community outbreak*. Ann Intern Med, 1972. **77**(2): p. 169-80.
272. Mangoud, A., et al., *Space-time interaction in Hodgkin's disease in Greater Manchester*. J Epidemiol Community Health, 1985. **39**(1): p. 58-62.
273. Glaser, S.L., *Spatial clustering of Hodgkin's disease in the San Francisco Bay area*. Am J Epidemiol, 1990. **132**(1 Suppl): p. S167-77.

274. Benharroch, D., et al., *New candidate virus in association with Hodgkin's disease*. Leuk Lymphoma, 2003. **44**(4): p. 605-10.
275. Stiller, C.A., *What causes Hodgkin's disease in children?* Eur J Cancer, 1998. **34**(4): p. 523-8.
276. Bernard, S.M., et al., *Hodgkin's disease: case control epidemiological study in Yorkshire*. Br J Cancer, 1987. **55**(1): p. 85-90.
277. Gutensohn, N.M. and D.S. Shapiro, *Social class risk factors among children with Hodgkin's disease*. Int J Cancer, 1982. **30**(4): p. 433-5.
278. Gutensohn, N. and P. Cole, *Childhood social environment and Hodgkin's disease*. N Engl J Med, 1981. **304**(3): p. 135-40.
279. Baris, D. and S.H. Zahm, *Epidemiology of lymphomas*. Curr Opin Oncol, 2000. **12**(5): p. 383-94.
280. Rowlings, P.A., et al., *Increased incidence of Hodgkin's disease after allogeneic bone marrow transplantation*. J Clin Oncol, 1999. **17**(10): p. 3122-7.
281. List, A.F., F.A. Greco, and L.B. Vogler, *Lymphoproliferative diseases in immunocompromised hosts: the role of Epstein-Barr virus*. J Clin Oncol, 1987. **5**(10): p. 1673-89.
282. McCunney, R.J., *Hodgkin's disease, work, and the environment. A review*. J Occup Environ Med, 1999. **41**(1): p. 36-46.
283. Miligi, L., et al., *Occupational, environmental, and life-style factors associated with the risk of hematolymphopoietic malignancies in women*. Am J Ind Med, 1999. **36**(1): p. 60-9.
284. Adami, J., et al., *Smoking and the risk of leukemia, lymphoma, and multiple myeloma (Sweden)*. Cancer Causes Control, 1998. **9**(1): p. 49-56.
285. Grufferman, S., T. Duong, and P. Cole, *Occupation and Hodgkin's disease*. J Natl Cancer Inst, 1976. **57**(5): p. 1193-5.
286. Matanoski, G.M., P.E. Sartwell, and E.A. Elliott, *Letter: Hodgkin's disease mortality among physicians*. Lancet, 1975. **1**(7912): p. 926-7.
287. Alexander, F.E., et al., *Case clustering, Epstein-Barr virus Reed-Sternberg cell status and herpes virus serology in Hodgkin's disease: results of a case-control study*. Eur J Cancer, 1995. **31A**(9): p. 1479-86.
288. Mueller, N., *Epidemiologic studies assessing the role of the Epstein-Barr virus in Hodgkin's disease*. Yale J Biol Med, 1987. **60**(4): p. 321-32.
289. Mueller, N., et al., *Hodgkin's disease and Epstein-Barr virus. Altered antibody pattern before diagnosis*. N Engl J Med, 1989. **320**(11): p. 689-95.
290. Alexander, F.E., et al., *Risk factors for Hodgkin's disease by Epstein-Barr virus (EBV) status: prior infection by EBV and other agents*. Br J Cancer, 2000. **82**(5): p. 1117-21.
291. Hjalgrim, H., et al., *Risk of Hodgkin's disease and other cancers after infectious mononucleosis*. J Natl Cancer Inst, 2000. **92**(18): p. 1522-8.
292. Glaser, S.L., et al., *Exposure to childhood infections and risk of Epstein-Barr virus--defined Hodgkin's lymphoma in women*. Int J Cancer, 2005. **115**(4): p. 599-605.

293. Alexander, F.E., et al., *An epidemiologic study of index and family infectious mononucleosis and adult Hodgkin's disease (HD): evidence for a specific association with EBV+ve HD in young adults*. *Int J Cancer*, 2003. **107**(2): p. 298-302.
294. Hjalgrim, H., et al., *Characteristics of Hodgkin's lymphoma after infectious mononucleosis*. *N Engl J Med*, 2003. **349**(14): p. 1324-32.
295. Hjalgrim, H., et al., *Infectious mononucleosis, childhood social environment, and risk of Hodgkin lymphoma*. *Cancer Res*, 2007. **67**(5): p. 2382-8.
296. Jarrett, R.F., et al., *Impact of tumor Epstein-Barr virus status on presenting features and outcome in age-defined subgroups of patients with classic Hodgkin lymphoma: a population-based study*. *Blood*, 2005. **106**(7): p. 2444-51.
297. Clarke, C.A., et al., *Epstein-Barr virus and survival after Hodgkin disease in a population-based series of women*. *Cancer*, 2001. **91**(8): p. 1579-87.
298. Stark, G.L., et al., *Hodgkin's disease in the elderly: a population-based study*. *Br J Haematol*, 2002. **119**(2): p. 432-40.
299. Diepstra, A., et al., *Latent Epstein-Barr virus infection of tumor cells in classical Hodgkin's lymphoma predicts adverse outcome in older adult patients*. *J Clin Oncol*, 2009. **27**(23): p. 3815-21.
300. Barros, M.H., et al., *Cell cycle characteristics and Epstein-Barr virus are differentially associated with aggressive and non-aggressive subsets of Hodgkin lymphoma in pediatric patients*. *Leuk Lymphoma*, 2010. **51**(8): p. 1513-22.
301. Rukavina, D., et al., *Age-related decline of perforin expression in human cytotoxic T lymphocytes and natural killer cells*. *Blood*, 1998. **92**(7): p. 2410-20.
302. Khan, G., et al., *Phenotype and frequency of Epstein-Barr virus-infected cells in pre-treatment blood samples from patients with Hodgkin lymphoma*. *Br J Haematol*, 2005. **129**(4): p. 511-9.
303. Jarrett, R.F., *Viruses and Hodgkin's lymphoma*. *Ann Oncol*, 2002. **13 Suppl 1**: p. 23-9.
304. Telenti, A., W.F. Marshall, and T.F. Smith, *Detection of Epstein-Barr virus by polymerase chain reaction*. *J Clin Microbiol*, 1990. **28**(10): p. 2187-90.
305. Glaser, S.L., *Reproductive factors in Hodgkin's disease in women: a review*. *Am J Epidemiol*, 1994. **139**(3): p. 237-46.
306. Barros, M.H., R. Hassan, and G. Niedobitek, *Tumor-associated macrophages in pediatric classical Hodgkin lymphoma: association with Epstein-Barr virus, lymphocyte subsets, and prognostic impact*. *Clin Cancer Res*, 2012. **18**(14): p. 3762-71.
307. Jarrett, R.F., et al., *Impact of tumor Epstein-Barr virus status on presenting features and outcome in age-defined subgroups of patients with classic Hodgkin lymphoma: a population-based study*. *Blood*, 2005. **106**(7): p. 2444-51.
308. Glavina-Durdov, M., et al., *Assessment of the prognostic impact of the Epstein-Barr virus-encoded latent membrane protein-1 expression in Hodgkin's disease*. *Br J Cancer*, 2001. **84**(9): p. 1227-34.
309. Al-Salam, S., et al., *Epstein-Barr virus infection correlates with the expression of COX-2, p16(INK4A) and p53 in classic Hodgkin lymphoma*. *Int J Clin Exp Pathol*, 2013. **6**(12): p. 2765-77.

310. Huang, S.Y., et al., *Epstein-Barr virus Rta-mediated transactivation of p21 and 14-3-3sigma arrests cells at the G1/S transition by reducing cyclin E/CDK2 activity.* J Gen Virol, 2012. **93**(Pt 1): p. 139-49.
311. Chang, K.C., et al., *Aberrant expression of cyclin a correlates with morphogenesis of reed-sternberg cells in Hodgkin lymphoma.* Am J Clin Pathol, 2009. **132**(1): p. 50-9.
312. Zhao, P., et al., *Aberrant cytoplasmic expression of cyclin B1 protein and its correlation with EBV-LMP1, P53 and P16(INK4A) in classical Hodgkin lymphoma in China.* Pathol Oncol Res, 2011. **17**(2): p. 369-73.
313. Yue, W., J. Shackelford, and J.S. Pagano, *cdc2/cyclin B1-dependent phosphorylation of EBNA2 at Ser243 regulates its function in mitosis.* J Virol, 2006. **80**(4): p. 2045-50.
314. Kim, L.H., S.C. Peh, and S. Poppema, *Expression of retinoblastoma protein and P16 proteins in classic Hodgkin lymphoma: relationship with expression of p53 and presence of Epstein-Barr virus in the regulation of cell growth and death.* Hum Pathol, 2006. **37**(1): p. 92-100.
315. Li, L., et al., *Latent membrane protein 1 of Epstein-Barr virus regulates p53 phosphorylation through MAP kinases.* Cancer Lett, 2007. **255**(2): p. 219-31.
316. Liu, T.Y., et al., *EBV-positive Hodgkin lymphoma is associated with suppression of p21cip1/waf1 and a worse prognosis.* Mol Cancer, 2010. **9**: p. 32.
317. Vaux, D.L., S. Cory, and J.M. Adams, *Bcl-2 gene promotes haemopoietic cell survival and cooperates with c-myc to immortalize pre-B cells.* Nature, 1988. **335**(6189): p. 440-2.
318. Hell, K., et al., *Hodgkin cells accumulate mRNA for bcl-2.* Lab Invest, 1995. **73**(4): p. 492-6.
319. Chetty, R., et al., *EBV latent membrane protein (LMP-1) and bcl-2 protein expression in Reed-Sternberg-like cells in post-transplant lymphoproliferative disorders.* Histopathology, 1996. **28**(3): p. 257-60.
320. Henderson, S., 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**(7): p. 1107-15.
321. Preciado, M.V., et al., *Oncogene expression in tumour cells of pediatric Hodgkin's disease in Argentina--correlation with Epstein Barr virus presence.* Pathol Res Pract, 1998. **194**(1): p. 25-31.
322. Khan, G., et al., *Epstein-Barr virus infection and bcl-2 proto-oncogene expression. Separate events in the pathogenesis of Hodgkin's disease?* Am J Pathol, 1993. **143**(5): p. 1270-4.
323. Lauritzen, A.F., et al., *Apoptosis-related genes and proteins in Hodgkin's disease.* APMIS, 1999. **107**(7): p. 636-44.
324. Jiwa, N.M., et al., *Expression of c-myc and bcl-2 oncogene products in Reed-Sternberg cells independent of presence of Epstein-Barr virus.* J Clin Pathol, 1993. **46**(3): p. 211-7.

325. Boise, L.H., et al., *bcl-x*, a *bcl-2*-related gene that functions as a dominant regulator of apoptotic cell death. *Cell*, 1993. **74**(4): p. 597-608.
326. Chu, W.S., et al., *Antiapoptotic marker Bcl-X(L)*, expression on Reed-Sternberg cells of Hodgkin's disease using a novel monoclonal marker, YTH-2H12. *Hum Pathol*, 1999. **30**(9): p. 1065-70.
327. Bai, M., et al., *Expression of bcl2 family proteins and active caspase 3 in classical Hodgkin's lymphomas*. *Hum Pathol*, 2007. **38**(1): p. 103-13.
328. Oltvai, Z.N., C.L. Milliman, and S.J. Korsmeyer, *Bcl-2 heterodimerizes in vivo with a conserved homolog, Bax, that accelerates programmed cell death*. *Cell*, 1993. **74**(4): p. 609-19.
329. Rassidakis, G.Z., et al., *BAX expression in Hodgkin and Reed-Sternberg cells of Hodgkin's disease: correlation with clinical outcome*. *Clin Cancer Res*, 2002. **8**(2): p. 488-93.
330. Sup, S.J., et al., *Expression of bcl-2 in classical Hodgkin's lymphoma: an independent predictor of poor outcome*. *J Clin Oncol*, 2005. **23**(16): p. 3773-9.

13. APÉNDICE

13.1 Tablas de contingencia de comparación de las técnicas diagnósticas de infección por el VEB

gp220EBV	EBER		Row Total
	neg	pos	
neg	40 68.966%	18 31.034%	58 81.690%
pos	3 23.077%	10 76.923%	13 18.310%
Column Total	43	28	71

Pearson's Chi-squared test

Chi² = 9.36 d.f. = 1 p = 0.00221

gp220EBV	EBER		Row Total
	neg	pos	
neg	40 68.966%	18 31.034%	58 81.690%
pos	3 23.077%	10 76.923%	13 18.310%
Column Total	43	28	71

Cohen Kappa and weighted Kappa correlation coefficients and confidence boundaries

unweighted kappa lower estimate upper
0.11 0.32 0.52

gp220EBV	LMP1		Row Total
	neg	pos	
neg	32 56.140%	25 43.860%	57 81.429%
pos	3 23.077%	10 76.923%	13 18.571%
Column Total	35	35	70

Pearson's Chi-squared test

Chi² = 4.63 d.f. = 1 p = 0.0314

gp220EBV	LMP1		Row Total
	neg	pos	
neg	32 56.140%	25 43.860%	57 81.429%
pos	3	10	13

	23.077%	76.923%	18.571%
Column Total	35	35	70

Cohen Kappa and weighted Kappa correlation coefficients and confidence boundaries

unweighted kappa lower estimate upper
0.021 0.2 0.38

EBER	LMP1		Row Total
	neg	pos	
neg	31 68.889%	14 31.111%	45 61.644%
pos	7 25.000%	21 75.000%	28 38.356%
Column Total	38	35	73

Pearson's Chi-squared test

chi² = 13.3 d.f. = 1 p = 0.000262

EBER	LMP1		Row Total
	neg	pos	
neg	31 68.889%	14 31.111%	45 61.644%
pos	7 25.000%	21 75.000%	28 38.356%
Column Total	38	35	73

Cohen Kappa and weighted Kappa correlation coefficients and confidence boundaries

unweighted kappa lower estimate upper
0.21 0.42 0.62

13.2 Supervivencia en función del VEB

Determinación mediante PCR DNA gp220

Test log rank

n=71, 23 observations deleted due to missingness.

	N	Observed	Expected	(O-E) ² /E	(O-E) ² /V
gp220EBV=neg	57	10	9.58	0.0180	0.0904
gp220EBV=pos	14	2	2.42	0.0716	0.0904

Chisq= 0.1 on 1 degrees of freedom,
p= 0.764

Modelo de Cox

coxph(formula = Surv(superviv, status) ~ gp220EBV, data = dades)

n= 71, number of events= 12
(23 observations deleted due to missingness)

	coef	exp(coef)	se(coef)	z	Pr(> z)
gp220EBVpos	-0.236	0.790	0.775	-0.3	0.76

	exp(coef)	exp(-coef)	lower .95	upper .95
gp220EBVpos	0.79	1.27	0.173	3.61

Concordance= 0.531 (se = 0.06)
Rsquare= 0.001 (max possible= 0.749)
Likelihood ratio test= 0.1 on 1 df, p=0.755
wald test = 0.09 on 1 df, p=0.761
Score (logrank) test = 0.09 on 1 df, p=0.76

Determinación mediante EBER

Test log rank

n=67, 27 observations deleted due to missingness.

	N	Observed	Expected	(O-E) ² /E	(O-E) ² /V
EBER=neg	42	8	6.47	0.363	0.895
EBER=pos	25	3	4.53	0.518	0.895

Chisq= 0.9 on 1 degrees of freedom,
p= 0.344

Modelo de Cox

coxph(formula = Surv(superviv, status) ~ EBER, data = dades)

n= 67, number of events= 11
(27 observations deleted due to missingness)

	coef	exp(coef)	se(coef)	z	Pr(> z)
EBERpos	-0.636	0.529	0.679	-0.94	0.35

	exp(coef)	exp(-coef)	lower .95	upper .95
EBERpos	0.529	1.89	0.14	2

Concordance= 0.599 (se = 0.077)
 Rsquare= 0.014 (max possible= 0.733)
 Likelihood ratio test= 0.95 on 1 df, p=0.329
 Wald test = 0.88 on 1 df, p=0.349
 Score (logrank) test = 0.91 on 1 df, p=0.341

Determinación mediante LMP1

Test log rank

n=66, 28 observations deleted due to missingness.

	N	Observed	Expected	(O-E) ² /E	(O-E) ² /V
LMP1=neg	34	7	5.47	0.426	0.86
LMP1=pos	32	4	5.53	0.422	0.86

Chisq= 0.9 on 1 degrees of freedom,
 p= 0.354

Modelo de Cox

coxph(formula = Surv(superviv, status) ~ LMP1, data = dades)

n= 66, number of events= 11
 (28 observations deleted due to missingness)

	coef	exp(coef)	se(coef)	z	Pr(> z)
LMP1pos	-0.575	0.562	0.629	-0.92	0.36

	exp(coef)	exp(-coef)	lower .95	upper .95
LMP1pos	0.562	1.78	0.164	1.93

Concordance= 0.544 (se = 0.079)
 Rsquare= 0.013 (max possible= 0.737)
 Likelihood ratio test= 0.87 on 1 df, p=0.351
 Wald test = 0.84 on 1 df, p=0.36
 Score (logrank) test = 0.86 on 1 df, p=0.354

13.3 Tablas de contingencia: relaciones entre proteínas de ciclo celular y de apoptosis con la edad y con el VEB

Relación ciclina D1-DNA gp220

ciclinaD1	gp220EBV		Row Total
	neg	pos	
neg	19 36.538%	10 71.428%	29 43.939%
pos	33 63.461%	4 28.571%	37 56.061%
Column Total	52	14	66

Fisher's Exact Test for Count Data

Sample estimate odds ratio: 0.236

Alternative hypothesis: true odds ratio is not equal to 1

p = 0.0322

95% confidence interval: 0.0472 0.958

Relación ciclina E- EBER (0-20 años)

ciclinaE	EBER		Row Total
	neg	pos	
neg	4 26.666%	0 0.000%	4 15.385%
pos	11 73.333%	11 100.00%	22 84.615%
Column Total	15	11	26

Fisher's Exact Test for Count Data

Sample estimate odds ratio: Inf

Alternative hypothesis: true odds ratio is not equal to 1

p = 0.113

95% confidence interval: 0.519 Inf

Relación ciclina A - EBER (0-20 años)

ciclinaA	EBER		Row Total
	neg	pos	

neg	6	0	6
	40.000%	0.000%	24.000%
pos	9	10	19
	60.000%	100.00%	76.000%
Column Total	15	10	25

Fisher's Exact Test for Count Data

Sample estimate odds ratio: Inf

Alternative hypothesis: true odds ratio is not equal to 1

p = 0.0508

95% confidence interval: 0.951 Inf

Relación ciclina B1 - LMP1 (0-20 años)

ciclinaB1	LMP1		Row Total
	neg	pos	
neg	6	0	6
	33.333%	0.000%	23.077%
pos	12	8	20
	66.666%	100.00%	76.923%
Column Total	18	8	26

Fisher's Exact Test for Count Data

Sample estimate odds ratio: Inf

Alternative hypothesis: true odds ratio is not equal to 1

p = 0.132

95% confidence interval: 0.578 Inf

Relación p16- PCR DNAgp220

p16	gp220EBV		Row Total
	neg	pos	
neg	9	6	15
	17.647%	46.153%	23.438%
pos	42	7	49
	82.352%	53.846%	76.562%
Column Total	51	13	64

Fisher's Exact Test for Count Data

 Sample estimate odds ratio: 0.257

Alternative hypothesis: true odds ratio is not equal to 1
 p = 0.0606
 95% confidence interval: 0.0566 1.16

Relación p21-LMP1

p21	LMP1		Row Total
	neg	pos	
neg	15 40.540%	28 82.352%	43 60.563%
pos	22 59.459%	6 17.647%	28 39.437%
Column Total	37	34	71

Fisher's Exact Test for Count Data

 Sample estimate odds ratio: 0.151

Alternative hypothesis: true odds ratio is not equal to 1
 p = 0.000551
 95% confidence interval: 0.0406 0.487

Relación p21-LMP1 (>45 años)

p21	LMP1		Row Total
	neg	pos	
neg	1 25.000%	13 100.00%	14 77.778%
pos	4 75.000%	0 0.000%	4 22.222%
Column Total	5	13	18

Fisher's Exact Test for Count Data

 Sample estimate odds ratio: 0

Alternative hypothesis: true odds ratio is not equal to 1
 p = 0.00163
 95% confidence interval: 0 0.336

Relación p27-PCR DNA gp220

p27	gp220EBV		Row Total
	neg	pos	
neg	49 89.090%	8 61.538%	57 83.824%
pos	6 10.909%	5 38.461%	11 16.176%
Column Total	55	13	68

Fisher's Exact Test for Count Data

Sample estimate odds ratio: 4.94

Alternative hypothesis: true odds ratio is not equal to 1

p = 0.0286

95% confidence interval: 0.957 25.3

Relación bcl-xl - LMP1

bclxl	LMP1		Row Total
	neg	pos	
neg	21 55.263%	11 32.352%	32 44.444%
pos	17 44.736%	23 67.647%	40 55.556%
Column Total	38	34	72

Fisher's Exact Test for Count Data

Sample estimate odds ratio: 2.55

Alternative hypothesis: true odds ratio is not equal to 1

p = 0.0609

95% confidence interval: 0.894 7.59

Relación bcl-xl - PCR DNAGp220 (0-20 años)

bclxl	gp220EBV		Row Total
	neg	pos	
neg	15 93.750%	6 66.666%	21 84.000%
pos	1 6.250%	3 33.333%	4 16.000%

Column Total	16	9	25
--------------	----	---	----

Fisher's Exact Test for Count Data

Sample estimate odds ratio: 6.85

Alternative hypothesis: true odds ratio is not equal to 1

p = 0.116

95% confidence interval: 0.449 418

Relación bax-PCR DNA gp220 (0-20 años)

bax	gp220EBV		Row Total
	neg	pos	
neg	1 8.333%	4 44.444%	5 23.810%
pos	11 91.666%	5 55.555%	16 76.190%
Column Total	12	9	21

Fisher's Exact Test for Count Data

Sample estimate odds ratio: 0.127

Alternative hypothesis: true odds ratio is not equal to 1

p = 0.119

95% confidence interval: 0.00213 1.71

Relación ciclina E y p27

ciclinaE	p27		Row Total
	neg	pos	
neg	9 69.231%	4 30.769%	13 19.118%
pos	48 87.273%	7 12.727%	55 80.882%
Column Total	57	11	68

Fisher's Exact Test for Count Data

Sample estimate odds ratio: 0.335

Alternative hypothesis: true odds ratio is not equal to 1

p = 0.201

95% confidence interval: 0.0665 1.89

Pacientes VEB (DNA gp220) positivo: ciclina E-p27

ciclinaE	p27		Row Total
	neg	pos	
neg	0 0.000%	2 100.000%	2 15.385%
pos	8 72.727%	3 27.273%	11 84.615%
Column Total	8	5	13

Fisher's Exact Test for Count Data

Sample estimate odds ratio: 0

Alternative hypothesis: true odds ratio is not equal to 1

p = 0.1282051

95% confidence interval: 0 3.085754

0-20 años: Ciclina E-p27

ciclinaE	p27		Row Total
	neg	pos	
neg	2 40.000%	3 60.000%	5 20.833%
pos	16 84.211%	3 15.789%	19 79.167%
Column Total	18	6	24

Fisher's Exact Test for Count Data

Sample estimate odds ratio: 0.141

Alternative hypothesis: true odds ratio is not equal to 1

p = 0.0785

95% confidence interval: 0.00815 1.76

Relación ciclina A y p27

ciclinaA	p27		Row Total
	neg	pos	
neg	9 64.286%	5 35.714%	14 20.896%
pos	46	7	53

	86.792%	13.208%	79.104%
Column Total	55	12	67

Fisher's Exact Test for Count Data

Sample estimate odds ratio: 0.281

Alternative hypothesis: true odds ratio is not equal to 1

p = 0.109

95% confidence interval: 0.0593 1.38

Pacientes 0-20 años: ciclina A - p27

	p27		
ciclinaA	neg	pos	Row Total
neg	3 42.857%	4 57.143%	7 30.435%
pos	14 87.500%	2 12.500%	16 69.565%
Column Total	17	6	23

Fisher's Exact Test for Count Data

Sample estimate odds ratio: 0.122

Alternative hypothesis: true odds ratio is not equal to 1

p = 0.045

95% confidence interval: 0.00749 1.28

Ciclina A y p27: VEB (LMP1) positivo

	p27		
ciclinaA	neg	pos	Row Total
neg	4 80.000%	1 20.000%	5 15.152%
pos	24 85.714%	4 14.286%	28 84.848%
Column Total	28	5	33

Fisher's Exact Test for Count Data

Sample estimate odds ratio: 0.676

Alternative hypothesis: true odds ratio is not equal to 1
 p = 1
 95% confidence interval: 0.046 40.9

Ciclina A y p27: VEB (LMP1) negativo

ciclinaA	p27		Row Total
	neg	pos	
neg	5 62.500%	3 37.500%	8 24.242%
pos	22 88.000%	3 12.000%	25 75.758%
Column Total	27	6	33

Fisher's Exact Test for Count Data

Sample estimate odds ratio: 0.241

Alternative hypothesis: true odds ratio is not equal to 1
 p = 0.137
 95% confidence interval: 0.0239 2.33

Ciclina B1-p27: pacientes VEB (gp220) positivos

ciclinaB1	p27		Row Total
	neg	pos	
neg	0 0.000%	2 100.000%	2 16.667%
pos	7 70.000%	3 30.000%	10 83.333%
Column Total	7	5	12

Fisher's Exact Test for Count Data

Sample estimate odds ratio: 0

Alternative hypothesis: true odds ratio is not equal to 1
 p = 0.152
 95% confidence interval: 0 3.56

Relación ciclina A-p53

ciclinaA	p53		Row Total
	neg	pos	

neg	8	4	12
	66.667%	33.333%	18.750%
pos	43	9	52
	82.692%	17.308%	81.250%
Column Total	51	13	64

Fisher's Exact Test for Count Data

Sample estimate odds ratio: 0.425

Alternative hypothesis: true odds ratio is not equal to 1

p = 0.243

95% confidence interval: 0.0875 2.35

Ciclina A-p53: pacientes VEB (gp220) negativos

ciclinaA	p53		Row Total
	neg	pos	
neg	5	4	9
	55.556%	44.444%	18.000%
pos	34	7	41
	82.927%	17.073%	82.000%
Column Total	39	11	50

Fisher's Exact Test for Count Data

Sample estimate odds ratio: 0.2662989

Alternative hypothesis: true odds ratio is not equal to 1

p = 0.09278753

95% confidence interval: 0.04321439 1.691817

Ciclina A-p53: pacientes 21-44 años

ciclinaA	p53		Row Total
	neg	pos	
neg	2	3	5
	40.000%	60.000%	20.833%
pos	16	3	19
	84.211%	15.789%	79.167%
Column Total	18	6	24

Fisher's Exact Test for Count Data

Sample estimate odds ratio: 0.141

Alternative hypothesis: true odds ratio is not equal to 1

p = 0.0785

95% confidence interval: 0.00815 1.76

Ciclina B1-p53

ciclinaB1	p53		Row Total
	neg	pos	
neg	9 69.231%	4 30.769%	13 20.000%
pos	45 86.538%	7 13.462%	52 80.000%
Column Total	54	11	65

Fisher's Exact Test for Count Data

Sample estimate odds ratio: 0.357

Alternative hypothesis: true odds ratio is not equal to 1

p = 0.209

95% confidence interval: 0.0707 2.02

Ciclina B1-p53: pacientes 21-44 años

ciclinaB1	p53		Row Total
	neg	pos	
neg	3 50.000%	3 50.000%	6 25.000%
pos	16 88.889%	2 11.111%	18 75.000%
Column Total	19	5	24

Fisher's Exact Test for Count Data

Sample estimate odds ratio: 0.141

Alternative hypothesis: true odds ratio is not equal to 1

p = 0.0785

95% confidence interval: 0.00815 1.76

Ciclina D1-p16

ciclina D1	p16		Row Total
	neg	pos	
neg	13 43.333%	17 56.667%	30 46.875%
pos	1 2.941%	33 97.059%	34 53.125%
Column Total	14	50	64

Fisher's Exact Test for Count Data

Sample estimate odds ratio: 24.1

Alternative hypothesis: true odds ratio is not equal to 1

p = 0.000117

95% confidence interval: 3.14 1097

Ciclina D1 - p16: paciente VEB (gp220) negativo

ciclina D1	p16		Row Total
	neg	pos	
neg	7 41.176%	10 58.824%	17 35.417%
pos	1 3.226%	30 96.774%	31 64.583%
Column Total	8	40	48

Fisher's Exact Test for Count Data

Sample estimate odds ratio: 19.5

Alternative hypothesis: true odds ratio is not equal to 1

p = 0.00166

95% confidence interval: 2.12 971

Ciclina D1-p16: pacientes 21-44 años

ciclina D1	p16		Row Total
	neg	pos	
neg	5 83.333%	1 16.667%	6 26.087%
pos	0 0.000%	17 100.000%	17 73.913%
Column Total	5	18	23

Fisher's Exact Test for Count Data

 Sample estimate odds ratio: Inf

Alternative hypothesis: true odds ratio is not equal to 1

p = 0.000178

95% confidence interval: 5.29 Inf

p53-bcl2

p53	bcl2		Row Total
	neg	pos	
neg	45 83.333%	9 16.667%	54 80.597%
pos	8 61.538%	5 38.462%	13 19.403%
Column Total	53	14	67

Fisher's Exact Test for Count Data

 Sample estimate odds ratio: 3.06

Alternative hypothesis: true odds ratio is not equal to 1

p = 0.125

95% confidence interval: 0.637 13.9

p53-bcl2: pacientes VEB(EBER) negativo

p53	bcl2		Row Total
	neg	pos	
neg	29 85.294%	5 14.706%	34 82.927%
pos	4 57.143%	3 42.857%	7 17.073%
Column Total	33	8	41

Fisher's Exact Test for Count Data

 Sample estimate odds ratio: 4.15

Alternative hypothesis: true odds ratio is not equal to 1

p = 0.12

95% confidence interval: 0.467 34.4

P53-bcl2: pacientes 21-44 años

p53	bcl2		Row Total
	neg	pos	
neg	19 95.000%	1 5.000%	20 76.923%
pos	2 33.333%	4 66.667%	6 23.077%
Column Total	21	5	26

Fisher's Exact Test for Count Data

 Sample estimate odds ratio: 29.1

Alternative hypothesis: true odds ratio is not equal to 1

p = 0.00465

95% confidence interval: 1.9 1928

13.4 Supervivencia en función de las proteínas de ciclo celular y de la apoptosis

Supervivencia y ciclina D1

Test log rank

n=62, 32 observations deleted due to missingness.

	N	Observed	Expected	(O-E) ² /E	(O-E) ² /V
ciclinaD1=neg	30	3	5.96	1.47	2.95
ciclinaD1=pos	32	9	6.04	1.45	2.95

Chisq= 3 on 1 degrees of freedom,
p= 0.0858

Modelo de Cox

n= 62, number of events= 12
(32 observations deleted due to missingness)

	coef	exp(coef)	se(coef)	z	Pr(> z)
ciclinaD1pos	1.085	2.958	0.667	1.63	0.1

	exp(coef)	exp(-coef)	lower .95	upper .95
ciclinaD1pos	2.96	0.338	0.8	10.9

Concordance= 0.623 (se = 0.075)
 Rsquare= 0.048 (max possible= 0.783)
 Likelihood ratio test= 3.05 on 1 df, p=0.0808
 Wald test = 2.64 on 1 df, p=0.104
 Score (logrank) test = 2.91 on 1 df, p=0.088

Supervivencia y bcl-2

Test log rank

n=65, 29 observations deleted due to missingness.

	N	Observed	Expected	(O-E) ² /E	(O-E) ² /V
bcl2=neg	50	6	8.44	0.706	3.07
bcl2=pos	15	5	2.56	2.331	3.07

Chisq= 3.1 on 1 degrees of freedom,
p= 0.0799

Modelo de Cox

n= 65, number of events= 11
(29 observations deleted due to missingness)

	coef	exp(coef)	se(coef)	z	Pr(> z)

```

bcl-2pos 1.024      2.783      0.606 1.69      0.091 .
---
Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

      exp(coef) exp(-coef) lower .95 upper .95
bcl-2pos      2.78      0.359      0.849      9.13

Concordance= 0.592 (se = 0.067 )
Rsquare= 0.04 (max possible= 0.741 )
Likelihood ratio test= 2.66 on 1 df, p=0.103
Wald test = 2.85 on 1 df, p=0.0912
Score (logrank) test = 3.11 on 1 df, p=0.0778
    
```

Supervivencia y bcl-xl

Test log rank

n=67, 27 observations deleted due to missingness.

	N	Observed	Expected	(O-E) ² /E	(O-E) ² /V
Bcl-xl=neg	30	2	4.85	1.67	3.02
Bcl-xl=pos	37	9	6.15	1.32	3.02

Chisq= 3 on 1 degrees of freedom,
p= 0.0821

Modelo de Cox

coxph(formula = Surv(superviv, status) ~ bcl-xl, data = dades)

n= 67, number of events= 11
(27 observations deleted due to missingness)

	coef	exp(coef)	se(coef)	z	Pr(> z)
bcl-xlpos	1.264	3.539	0.782	1.62	0.11

	exp(coef)	exp(-coef)	lower .95	upper .95
bcl-xlpos	3.54	0.283	0.764	16.4

Concordance= 0.622 (se = 0.078)
Rsquare= 0.048 (max possible= 0.733)
Likelihood ratio test= 3.29 on 1 df, p=0.0697
Wald test = 2.61 on 1 df, p=0.106
Score (logrank) test = 2.98 on 1 df, p=0.0845

Supervivencia y Ciclina E

n=65, 29 observations deleted due to missingness.

	N	Observed	Expected	(O-E) ² /E	(O-E) ² /V
ciclinaE=neg	12	2	2.12	0.00653	0.00811
ciclinaE=pos	53	9	8.88	0.00156	0.00811

Chisq= 0 on 1 degrees of freedom,
p= 0.928

Supervivencia y Ciclina A

n=64, 30 observations deleted due to missingness.

	N	Observed	Expected	(O-E) ² /E	(O-E) ² /V
ciclinaA=neg	13	1	2.37	0.793	1.02
ciclinaA=pos	51	10	8.63	0.218	1.02

Chisq= 1 on 1 degrees of freedom,
p= 0.313

Supervivencia y Ciclina B1

n=65, 29 observations deleted due to missingness.

	N	Observed	Expected	(O-E) ² /E	(O-E) ² /V
ciclinaB1=neg	14	2	2.65	0.1593	0.206
ciclinaB1=pos	51	10	9.35	0.0451	0.206

Chisq= 0.2 on 1 degrees of freedom,
p= 0.65

Supervivencia y p21

n=65, 29 observations deleted due to missingness.

	N	Observed	Expected	(O-E) ² /E	(O-E) ² /V
p21=neg	40	7	6.79	0.00652	0.0172
p21=pos	25	4	4.21	0.01052	0.0172

Chisq= 0 on 1 degrees of freedom,
p= 0.896

Supervivencia y p53

n=61, 33 observations deleted due to missingness.

	N	Observed	Expected	(O-E) ² /E	(O-E) ² /V
p53=neg	49	10	8.81	0.162	0.827
p53=pos	12	1	2.19	0.650	0.827

Chisq= 0.8 on 1 degrees of freedom,
p= 0.363

Supervivencia y p16

n=60, 34 observations deleted due to missingness.

	N	Observed	Expected	(O-E) ² /E	(O-E) ² /V
p16=neg	15	1	2.84	1.196	1.64
p16=pos	45	10	8.16	0.417	1.64

Chisq= 1.6 on 1 degrees of freedom,

p= 0.2

Supervivencia y bax

n=61, 33 observations deleted due to missingness.

	N	Observed	Expected	(O-E)^2/E	(O-E)^2/V
bax=neg	22	4	3.98	0.000147	0.000232
bax=pos	39	7	7.02	0.000083	0.000232

Chisq= 0 on 1 degrees of freedom,
p= 0.988

