

Prevalencia del ADN del Virus Epstein Barr en Linfoma Orbitario Primario en Perú

ARTÍCULO ORIGINAL

RESUMEN

La infección por el virus de Epstein Barr (VEB) ha sido recientemente reportada en numerosas manifestaciones oculares y /o procesos inflamatorios sistémicos, incluyendo tumores oculares. Tejidos incluidos en parafina de 23 casos de linfoma orbitario

primario (LOP) fueron investigados para el ADN-VEB empleando la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). La expresión génica del VEB se determinó por hibridación in situ para la región EBER1.

En el 73% de (16/22) casos se detectó la presencia del genoma del VEB por PCR; 16/16 (100%) correspondieron al VEB tipo 1 y uno de ellos (6.3%) albergó además el tipo 2 simultáneamente. EBER-1 fue detectado por hibridación in situ (HIS) en el 37.5 % de los casos positivos al ADN-VEB.

Nuestros hallazgos sugieren que la frecuencia con la cual fue detectado el VEB en linfoma orbitario primario en pacientes peruanos eleva la posibilidad del rol oncogénico viral en su patogénesis.

SUMMARY

Infection with Epstein-Barr virus (EBV) has recently been reported to have numerous ocular manifestations and/or systemic inflammatory processes including ocular tumors.

Paraffin-embedded tissues from 23 primary orbital lymphoma (POL) cases were investigated for Epstein-Barr virus DNA (EBV-DNA) by polymerase chain reaction (PCR). EBV gene expression was determined by in situ hybridization (ISH) for EBER1.

In the 73% of (16/22) cases was detected the EBV genome by PCR; 16/16 (100%) harbored EBV type-1 and one of them (6.3%) was besides positive for the type 2 simultaneously. EBV-EBER1 was detected by in situ hybridization (ISH) in the 37.5 % of EBV-DNA positive cases.

Our findings suggest that the high frequency with which EBV was found in orbital lymphoma in Peruvian patients raises the possibility of viral involvement in its pathogenesis.

Autores: Dres.*Ivonne Guerrero, ** Mayer Zaharia, *** Raúl Cordero, * Roberto Mejía, **** Luis Casanova, ***** José Avendaño, * Jaime Burneo, * Marco Galarza, **Gustavo Sarria, *** Claudio Flores, *****Carlos Barrionuevo, **Luis Pinillos

*Unidad de Biología Molecular Oncológica-Centro de Investigación y Docencia Maes-Heller, ** Departamento de Radioterapia, *** Departamento de Medicina, **** Departamento de Patología, ***** Departamento de Cabeza y Cuello del Instituto Especializado de Enfermedades Neoplásicas e *** Instituto de Oftalmología, Lima-Perú

Palabras claves: VEB, PCR, HIS, LOP

Key words: EBV, PCR, ISH, POL.

INTRODUCCIÓN

El virus Epstein Barr es un conspicuo miembro de la familia de los herpesvirus, generalmente se comporta como una infección silenciosa clínicamente. Es el agente etiológico de la mononucleosis infecciosa, con tendencia para vida larga y persistencia asintomática. El VEB también es asociado con linfoma de Burkitt, enfermedad de Hodgkin, linfoma de células T o B, y carcinoma nasofaríngeo.(15, 2, 1)

La afinidad de algunos miembros de la familia de los herpesvirus por los tejidos retro ocular e intra ocular ha sido observado usando métodos moleculares. VEB ha sido detectado en el iris, cornea, conjuntiva, cuerpos ciliares, glándula lagrimal, retina, y epitelio pigmentado de la retina (11, 10, 5, 17) en asociación con neoplasias.

VEB tiene numerosas manifestaciones sistémicas y oculares y ha sido observada una asociación entre VEB y desordenes inflamatorios oculares incluyendo tejido normal de los ojos. Usui

y colaboradores (21) reportaron casos de uveítis causada por VEB como una nueva entidad clínica.

Investigaciones virológicas han demostrado la presencia de VEB en el saco lagrimal de pacientes con carcinoma indiferenciado, en células mononucleares de sangre periférica, glándula lagrimal y glándulas de pacientes con el síndrome crónico Sjogren, considerado un factor de riesgo para el linfoma infraorbitario (17, 13, 23).

LOP es una entidad rara, menos del 1% de los casos de linfoma no Hodgkin incluyendo lesiones premalignas como la hiperplasia linfoide reactiva (el 20% progresa a linfoma dentro de los 5 años) e hiperplasia linfoide atípica (el 40% progresa a linfoma dentro de los 5 años). Típicamente estas lesiones son monoclonales con presentación clínica de proptosis, diplopia, irritación de los ojos, ptosis, efecto de masa. Hay un 60% de incidencia en la orbita (especialmente en la glándula lagrimal), 30% en la conjuntiva, y el 5% en el párpado.

El genoma viral del VEB y sus productos de expresión han sido estudiados usando métodos inmunológicos, inmunohistoquímicos, y moleculares como hibridación in situ, southern blot y PCR.(15, 8). La PCR es considerada como el procedimiento mas sensible para detectar el VEB en tejido incluido en parafina (16, 9). Conociendo la susceptibilidad reportada que presenta el tejido orbitario para albergar algunos agentes virales, nosotros decidimos determinar la prevalencia del ADN del VEB en LOP en pacientes peruanos.

MATERIAL Y MÉTODOS

Especímenes biológicos fueron retrospectivamente colectados de 23 pacientes con diagnóstico clínico y patológico de LOP quienes fueron admitidos al Instituto Especializado de Enfermedades Neoplásicas e Instituto Nacional de Oftalmología, de Lima-Perú, entre los años de 1970 y 1994.

Los casos estudiados, fueron previamente seleccionados mediante el análisis de calidad del ADN amplificando el gen de la beta globina humana.

Extracción de ADN de tejido parafinado

El ADN fue extraído de cortes de tejido incluidos en parafina, de 5µ de espesor tomados de cada caso bajo condiciones exigentes de bioseguridad para prevenir la contaminación cruzada, desparafinados y posteriormente digeridos a 55° C durante 24 horas en una solución de 0.02gr/ml de una proteasa, 1M TRIS-HCl, 0.5 M EDTA, 0.3 M NaCl y 20% SDS ph 7.0. El ADN purificado fue cuantificado y se almacenó a -80 °C hasta el momento de proceder con la PCR.

Reacción en cadena de la polimerasa

La PCR se realizó utilizando 0.5 unidades de taq polimerasa en 50 µl de reacción, conteniendo 5 µl del ADN genómico molde; 50 pmol de cada cebador EBNA 3C sentido / antisentido (19); 400mM de cada dNTP; buffer PCR 2X II; 3 mM MgCl2.

Cada ciclo de amplificación incluyó un paso de denaturación a 94°C por 1 minuto, hibridación del cebador a 60°C por 1 minuto, y una extensión a 72°C por 1 minuto durante 45 ciclos (20). Como control positivo incluimos la línea celular Daudi (AT-CCCCL213) y ADN genómico de células blancas como control negativo en todas las corridas.

Los productos de PCR fueron analizados por electroforesis mediante geles de agarosa al 4% en buffer TBE 1X con bromuro de etidio.

Para asegurar la presencia del ADN amplificable, cada muestra fue amplificada primero con cebadores para un fragmento del gen de la beta globina humana PCO4: CAA CTT CAT CCA CGT TCA CC y GH20: GAA GAG CCA AGG ACA GGT AC (4). Sólo aquellos casos que produjeron un amplicón de 268 pares de bases (pb) fueron sometidos al estudio de detección viral.

Hibridación in situ

El plásmido lineal recombinante RA386 con la secuencia completa EBER1 inserta fue transcrito y usado como sonda para la detección del VEB en cortes de tejidos parafinados y depositados en láminas previamente tratadas. La sonda marcada fue hibridada, y detectada empleando un anticuerpo monoclonal conjugado fosfatasa alcalina – anti digoxigenina, la reacción nuclear de color púrpura dada fue desarrollada con nitroblue tetrazolium NBT e indicativa de reacción positiva. El citoplasma se contrastó con eosina. Como control positivo se empleó la línea celular Raji y como control negativo un caso conocido negativo para VEB (22).

RESULTADOS

Analizamos retrospectivamente 23 especímenes tumorales de pacientes con linfoma orbitario primario. La edad media del grupo fue de 60 años (rango, 2-81), 12 (52%) fueron mujeres y 11 (48%) fueron hombres, TABLA 1.

22 de 23 casos (95.6%) amplificaron un segmento del gen de la [̢]-globina humana, estos casos fueron seleccionados para analizar la secuencia genómica del VEB usando la PCR y determinar EBER1 con HIS. En 16 de los 22 casos (73%) el ADN del VEB fue detectado, 16/16 (100 %) albergó ADN-VEB tipo 1 expresado por un amplicón de 153 pb, mientras que sólo un caso de los 16 (6.3%) fue positivo además para ADN-VEB del tipo 2 simultáneamente expresado por un amplicón de 246 pb, FIG. 1, TABLA 2. Usando HIS con una sonda específica de ARN antisentido para EBER1, el virus fue detectado en 6 de los 22 casos estudiados (27.3%) correspondiendo al 37.5% de los casos positivos al ADN-VEB por PCR. La reacción positiva por HIS para el VEB fue observada como una reacción intranuclear intensa de color púrpura en la casi totalidad de las células tumorales. FIG. 2 .

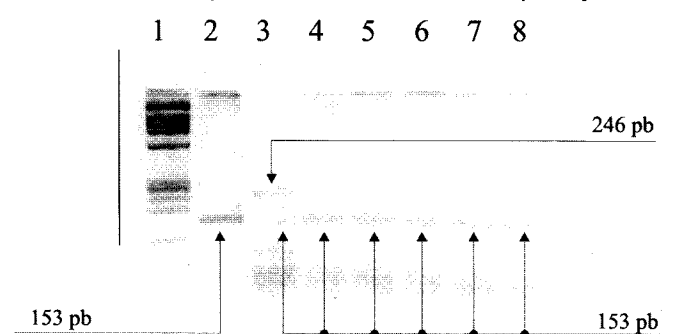
TABLA 1.- Características de los pacientes

VARIABLES	PACIENTES	%
Total de casos	22	
Media – Edad	60	
Rango – Edad	2 – 81	
Sexo – Femenino	12	52
Sexo – Masculino	11	48

TABLA 2.- Prevalencia del virus de Epstein Barr en linfoma orbitario primario

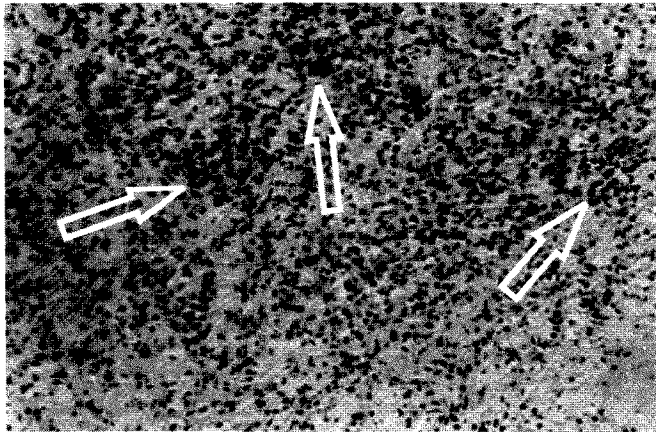
	EBNA 3C PCR	% HIS	EBER 1	%
Total de Casos	22	100	22	100
VEB +	16 / 22	73	6 / 22	27.7
VEB -	6 / 22	27		
VEB Tipo 1 +	16 / 16	100	6 / 16	37.5
VEB Tipo 1 -	0 / 16	0		
VEB Tipo 2 +	1 / 16	6.3	0 / 16	0
VEB Tipo 2 -	15 / 16	93.7		

FIGURA 1.- Amplicones EBNA 3C de los VEB tipos 1 y 2.



Pozo 1: marcador de peso molecular, pozo 2: ADN-VEB tipo 1 +, pozo 3 ADN-VEB tipos 1 y 2 +, pozos 4-8: ADN-VEB tipo 1 +.

FIGURA 2.- Núcleos de color púrpura correspondientes a la expresión de EBER 1 por HIS en LOP.



DISCUSIÓN

El VEB fue identificado primero en células de linfoma de Burkitt endémico hace más de 34 años y desde entonces ha sido asociado al desarrollo de otras malignidades humanas, incluyendo la enfermedad de Hodgkin, linfoma nasal, carcinoma nasofaríngeo, etc. Fue Mitra (14) quien reportó el primer caso de linfoma ocular primario, linfoma non Hodgkin, asociado con VEB. Nosotros estudiamos biopsias de pacientes con LOP para detectar el genoma y el transcrito del VEB. Los hallazgos en nuestro estudio mostraron una gran frecuencia del genoma del VEB por PCR sugiriéndonos que el virus de Epstein Barr puede contribuir con la linfomagénesis de LOP, probablemente interactuando con genes celulares a través de rutas moleculares las cuales continuamos estudiando y posteriormente reportaremos.

La frecuente asociación de VEB detectado en nuestro grupo de LOP, mayor que el reportado por Daibata y colaboradores en Japón (6) quienes también usaron la PCR para su detección en linfoma ocular primario, pero muy similar al reportado en linfomas de la cavidad nasal en Perú por Arber 93% (3), Guerrero 81% (7) y el 96% por Quintanilla (18), todos utilizando HIS, nos permite inferir a la infección por VEB como endémica en nuestro país lo cual podría reflejar la gran frecuencia detectada en esta población estudiada y no la frecuencia en estos tumores.

Sin embargo la infección viral con expresión de EBER1, localizada en los núcleos de las células tumorales que observamos es evidencia suficiente para apoyar la asociación del VEB con el fenotipo maligno de POL como fue reportado por Komano (12) cuando definió el rol oncogénico de los EBERs en las células de linfoma de Burkitt a quien le atribuyó la responsabilidad de su fenotipo. Es preciso mencionar que en estudios de transfección de los genes EBER en clonas de la línea celular Akata negativas para el VEB se restaura la capacidad para crecer en agar blando, la tumorigenicidad en ratones SCID, la resistencia a los inductores de apoptosis y la sobre regulación de la expresión de la oncoproteína bcl-2, eventos que son originalmente retenidos en las células Akata progenitoras VEB positivas y perdidas en las sub-clonas VEB negativas. Estos efectos relacionan a los pequeños ARNs codificados por VEB conocidos como EBERs con funciones oncogénicas evidenciadas en los LOP que estudiamos.

Serías mas grandes, analíticas y multidisciplinarias son requeridas para aclarar la relación precisa existente entre VEB, linfoma orbitario primario y el curso clínico, mas allá de otros factores moleculares que puedan jugar un rol en la patogénesis de este linfoma en pacientes peruanos.

En conclusión, nuestros resultados sugieren que los tejidos oculares en linfomas orbitarios, similares a otros linfomas, podrían ser blancos potenciales para la infección latente del VEB; este hecho podría determinar su transformación celular o podría ser considerado como un portador ocasional.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Ambinder RF, Mann RB. Detection and characterization of Epstein-Barr virus in clinical specimens. *Am J Pathol* 1994;145 : 239-52.
2. Anagnostopoulos I, Hummel M, Kreschel C, Stein H. Morphology, immunophenotype, and distribution of latently and/or productively Epstein-Barr virus-infected cells in acute infectious mononucleosis: implications for the inter-individual infection route of Epstein-Barr virus. *Blood* 1995 ;85 :744-50.
3. Arber DA, Weiss LM, Albuja P, Chen Y-Y, Jaffe ES. Nasal Lymphoma in Peru. *Am J Surg Pathol* 1993;17:392-9
4. Bauer HM, Ting Y, Greer CE, Chambers JC, Tashiro CJ, Cimeria J, Reingold A, et.al. Genital human papillomavirus infection in female university students as determined by a PCR-based method. *JAMA* 1991;265:472-7.
5. Crouse CA, Pflugfelder SC, Pereira I, Cleary T, Rabinowitz S, Atherton SS. Detection of herpes viral genomes in normal and diseased corneal epithelium. *Curr Eye Res.* 1990;9 :569-81.
6. Daibata M, Komatsu T, Taguchi H. Human herpes virus in primary ocular lymphoma. *Leuk Lymphoma* 2000;37 :361-5.
7. Guerrero I., Franklin JL, Narres KN, Caceres E, Bhatia K, Oconnor G, et.al. P53 expression ,bcl-2 expression and EBV association in Peruvian nasal lymphomas. *Blood* 1994; 84 (suppl 1):522.
8. Hedrick JA, Watry D, Speiser C, O'Donnell P, Lambris JD, Tsoukas CD. Interaction between Epstein-Barr virus and a T cell line (HSB-2) via a receptor phenotypically distinct from complement receptor type 2. *Eur J. Immunol.* 1992; 22:1123-31.
9. Hiraiwa H, Hamazaki M, Murata H., Taniguchi K., Sakurai M. Epstein-Barr virus infection ,Hodgkin s disease, non-Hodgkin lymphoma, and reactive follicular hyperplasia in Japanese children :evaluation of paraffin-embedded specimens using polymerase chain reaction and immunohistochemistry. *Acta Paediatr Jpn.* 1997, 39:158-65.
10. Huemer HP, Larcher C, Kirchebner W, Klingenschmid J, Gottinger W., Irschick EU. Susceptibility of human retinal pigment epithelial cells to different viruses. *Graefes Arch. Clin. Exp. Ophthalmol.* 1996; 234: 177-85.
11. Jones DT, Monroy D, Ji Z. Atherton SS., Pflugfelder SC. Sjogren s síndrome : cytokine and Epstein-Barr viral gene expression within the conjunctival epithelium. *Invest. Ophthalmol Vis Sci* 1994 (9) : 3493-505.
12. Komano J, Maruo S., Kuorozumi K, Oda T, Takada K. Oncogenic role of Epstein-Barr virus-encoded RNAs in Burkitt s lymphoma cell line Akata. *J.Virol.* 1999;73: 9827-31.
13. Leung SY, Chung LP, Ho CM, Yuen ST, Wong MP, Kwong WK. An Epstein-Barr virus positive undifferentiated carcinoma in the lachrymal sac. *Histopathology* 1996; 28: 71-5.
14. Mitra RA, Pulido JS, Hanson GA, Kejdacsy-Balla A., Brummitt CF. Primary ocular Epstein-Barr virus-associated non-Hodgkin s lymphoma in a patient with AIDS :a clinicopathologic report. *Retina* 1999;19:45-50.
15. Murray PG, Young LS, Rowe M, Crocker J. Immunohistochemical demonstration of the Epstein-Barr virus-encoded latent membrane protein in paraffin sections of Hodgkin s disease. *J. Pathol* 1992 ; 166:1-5.
16. Peiper SC, Myers JL, Broussard EE, Sixbey JW. Detection of Epstein-Barr virus genomes in archival tissues by polymerase chain reaction. *Arch. Pathol. Lab. Med.* 1990; 114: 711-4.
17. Pflugfelder SC, Crouse C, Pereira I, Atherton S. Amplification of Epstein-Barr virus genomic sequences in blood cells, lacrimal glands, and tears from primary Sjogren s syndrome patients. *Ophthalmology* 1990; 97 : 976-84.
18. Quintanilla L, Franklin JL, Guerrero I, Krenacs L, Narres KN, Rama-Rao C, et.al. Histological and immunophenotypic profile of nasal NK/T cell lymphomas from Peru : high prevalence of p53 over expression. *Human Pathol* 1999 ; 30: 849-55.
19. Sample J, Young L, Martín B, Chatman T, Kieff E, Rickinson A, et.al. Epstein-Barr virus types 1 and 2 differ in their EBNA-3 A, EBNA-3 B, and EBNA-3 C genes. *J.virol.* 1990; 64 : 4084-92.
20. Telenti A. PCR detection and typing of Epstein-Barr virus. In: *Diagnostic molecular microbiology.* Washington D.C., American Society for Microbiology, 1993 : 344-9.
21. Tsubota K, Fujishima H, Toda I, Katagiri S, Kawashima Y, Saito I. Increased levels of Epstein-Barr virus ADN in lachrymal glands of Sjogren s Syndrome patients. *Acta Ophthalmol Scand* 1995; 73 : 425-30.
22. Usui M, Sakai J. Three cases of EB virus-associated uveitis. *Int Ophthalmol* 1990; 14 : 371-6.
23. Weiss LM, Movahed LA, Warnke RA, Sklar J. Detection of Epstein-Barr viral genomes in Reed-Sternberg cells of Hodgkin s disease. *N. Engl. J. Med.* 1989; 320 :502-6.