



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MEXICO

FACULTAD DE MEDICINA

DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSTGRADO E INVESTIGACION
HOSPITAL GENERAL DR MANUEL GEA GONZÁLEZ

**“DETERMINACIÓN DE LOS ALELOS DE LOS GENES HLA-DRB1, -A, -B Y -C EN
MUESTRAS DE SANGRE DE LOS PACIENTES CON LINFOMA DE CÉLULAS T/NK
EXTRANODAL TIPO NASAL Y POSITIVOS A VIRUS DE EPSTEIN BARR”**

**TESIS:
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE ESPECIALISTA EN
DERMATOLOGÍA**

**PRESENTA:
CAREN JOCELYN AQUINO FARRERA**

**ASESOR:
DRA. LORENA LAMMOGLIA ORDIALES. ADSCRITA DIVISIÓN DE
DERMATOLOGÍA. HOSPITAL GENERAL DR. MANUEL GEA
GONZÁLEZ**

MEXICO D.F AGOSTO DEL 2015



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

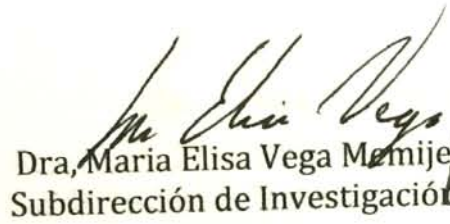
El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

HOSPITAL GENERAL DR. MANUEL GEA GONZÁLEZ

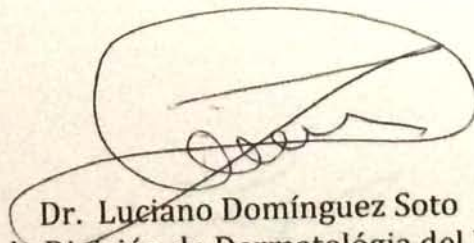
AUTORIZACIONES



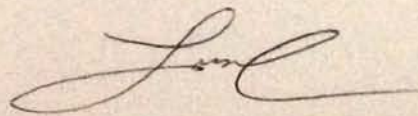
Dr. Octavio Sierra Martínez
Director de Enseñanza



Dra. Maria Elisa Vega Memije
Subdirección de Investigación

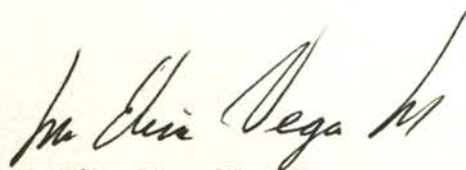


Dr. Luciano Domínguez Soto
Jefe de la División de Dermatología del Hospital

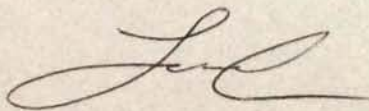


Dra. Lorena Lammoglia Ordiales
Investigador principal

Este trabajo de tesis con No. 06-34-2015. Presentado por la alumna Caren Jocelyn Aquino Farrera se presenta en forma con visto bueno por el tutor principal de la Tesis Dra. Lorena Lammoglia Ordiales, con fecha del 10 de Agosto para su impresión final.



Dra, Maria Elisa Vega Memije
Subdirección de Investigación



Dra. Lorena Lammoglia Ordiales
Investigador principal

Este trabajo fue realizado en el Hospital General “Dr. Manuel Gea
González” en la División de Dermatología bajo la dirección de la Dra.
Lorena Lammoglia Ordiales

INDICE

Dedicatoria6
Agradecimientos7
Resumen8
Introducción9
Material y métodos10
Resultados10
Discusión11
Conclusión12
Referencias12
Anexos1

DEDICATORIA

Agradezco y dedico el presente trabajo a toda mi familia por el apoyo incondicional que me han dado a mi mamá que siempre me ha dado muchos consejos e impulsado en mejorar como persona dando me todas las herramientas, mi papá que siempre ha sido un ejemplo de trabajo y perseverancia profesional, a mi hermano Miguel por que es un ejemplo de perseverancia y su gran corazón, a mi hermana Carol que siempre se ha superado a sí misma a pesar de las adversidades, esta haciendo lo que su corazón le dicta.

AGRADECIMIENTO

A la Dra. Jordana Lemus por darme la oportunidad de realizar esta hermosa subespecialidad que es Medicina del Enfermo en Estado Crítico.

Al Dr. Guillermo Cárdenas Membrilla por ser el autor y el capitán en este mar de ideas que fue este proyecto.

DETERMINACIÓN DE LOS ALELOS DE LOS GENES HLA-DRB1, -A, -B Y -C EN MUESTRAS DE SANGRE DE LOS PACIENTES CON LINFOMA DE CÉLULAS T/NK EXTRANODAL TIPO NASAL Y POSITIVOS A VIRUS DE EPSTEIN BARR

Caren Aquino-Farrera*, Lorena Lammoglia-Ordiales*, Adalberto Mosqueda-Taylor**, Julio Granados-Arriola***, María Teresa Vega-González***, Sonia Toussaint-Caire*

* División de Dermatología. Hospital General Dr. Manuel Gea González

** Departamento de Atención a la Salud Universidad Autónoma Metropolitana Xochimilco

*** Investigador del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán

**** Servicio de Piel y partes blandas. Instituto Nacional de Cancerología

CORRESPONDENCIA

Caren Jocelyn Aquino Farrera
Calzada de Tlalpan 4800, Colonia Sección XVI
CP 14080, Delegación Tlalpan
Ciudad de México, D.F.
Teléfono: (55) 4000 3057.
Correo electrónico: aquino.caren@gmail.com

RESUMEN

Introducción. El linfoma T/NK extranodal es una neoplasia rara de curso clínico muy agresivo. Se desconoce la incidencia exacta y a pesar de que se considera muy baja, sobre todo en la población occidental, es más frecuente en algunos países de Asia y América Latina.

Material y métodos: De un total de 6 pacientes con diagnóstico de linfoma T/NK extranodal tipo nasal positivos a virus de Epstein Barr en la división de Dermatología en el periodo comprendido de Julio de 2013 a Julio de 2015, un paciente falleció antes de la toma de muestra, y otro paciente se tuvo muestra no viable, al resto se determinaron los alelos de los genes HLA-DRB1, -A, -B y -C mediante amplificación de DNA por PCR y secuencia específica de oligonucleótidos.

Resultados: Del total de pacientes fueron 3 hombres y una mujer, la media de edad fue 49.6 años (23 a 67 años), la presentación clínica fue nasal (centrofacial) en 3 pacientes, cutánea en un pacientes. Al estudio histopatológico todos presentaron infiltrado por linfocitos atípicos de medianos a grandes con angiocentricidad, con Inmunohistoquímica positiva para CD56, CD3, TIA-1, negativo para CD8, CD20 y CD30, variable para CD5 y TCR-BF1, además de prueba de hibridación in situ para EBER positiva. Dos paciente fueron homocigotos para el haplotipo B39 (3902), DR4 (0411), DQB1* 0302, en tanto que los otros dos pacientes lo tienen en estado heterocigoto.

Conclusiones. Los datos que encontramos en este estudio sugieren que los genes del sistema HLA participan tanto en la susceptibilidad genética para presentar linfoma T/NK.

Palabras clave. Linfoma T/NK extranodal tipo nasal, angiocéntrico, centrofacial, HLA, virus de Epstein Barr.

ABSTRACT

Introduction. The extranodal nasal type NK/T lymphoma is a rare neoplasm with a poor outcome. the incidence is unknown but is much more frequent in Asian and Latin American countries than in Western countries.

Materials and methods. Six patients with diagnosis of extranodal nasal type NK/T lymphoma positive Epstein Barr in the Dermatology service at the period July 2013 to July 2015, one patient died before sampling, another patient had no viable sample. Blood samples were collected from 4 patients and HLA-DRB1, -A, -B and -C genes were determined by PCR amplification of DNA and sequence specific oligonucleotides.

Results: Of all patients, there was 3 men and one woman, mean age was 49.6 years (23-67 years), the clinical presentation was nasal (centrofacial) in 3 patients, cutaneous in a patient. Histopathological study all had atypical lymphocytes infiltrated by medium to large with angiocentricity, with positive immunohistochemistry for CD56, CD3, TIA-1, negative for CD8, CD20 and CD30, CD5 and TCR variable-BF1, plus hybridization test in positive for EBER situ. Two patients were homozygous for the haplotype B39 (3902), DR4 (0411), DQB1 *0302, while the other two patients have the heterozygote.

Conclusions. The data found in this study suggest that HLA genes involved in genetic susceptibility to present both T / NK lymphoma.

Keywords. Extranodal NK/T lymphoma nasal type, angiocentric, centrofacial, HLA, Epstein Barr virus.

INTRODUCCIÓN

El linfoma T/NK extranodal es una neoplasia muy rara de curso clínico muy agresivo de la cual se tiene poca información en la literatura¹. A pesar de no contar con estadística exacta a sobre la prevalencia mundial de linfoma extranodal T/NK, estudios reportan que forma parte de 7-10% de todos linfomas malignos y 74% de linfomas que involucran cavidad nasal y senos paranasales⁸. La gran mayoría de los casos reportados de esta rara neoplasia se encuentran distribuidos en Asia, y países de Latinoamérica como Perú, Brasil y México, con una incidencia de 4 a 10 veces mayor que en países europeos²⁻¹³ y se ha observado que la enfermedad tiene un predominio masculino con una edad media de unos 50 años que se presenta como una enfermedad localizada restringido a la cavidad nasal y las estructuras adyacentes.

Se desconoce la etiología del linfoma T/NK extranodal, sin embargo existe evidencia de la asociación del virus Epstein Barr (VEB) con el linfoma T/NK tipo nasal, virus linfotrófico del grupo de los herpes virus humanos ampliamente distribuidos en el hombre por transmisión horizontal^{2,13}

Las moléculas del complejo principal de histocompatibilidad fueron identificadas originalmente por su capacidad de provocar rechazo de los injertos entre diferentes miembros de una misma especie pero se ha demostrado que desempeñan un papel importante en la susceptibilidad a varias enfermedades¹⁴⁻¹⁶. En nuestra especie también llamadas antígenos leucocitarios humanos (HLA, del inglés *human leucocyte antigen*), se consideran el sistema más complejo y polimórfico conocido por el hombre. Son el producto de un conjunto de genes responsables de que los linfocitos rechacen o detecten elementos extraños. Estas moléculas participan además en la inducción de la respuesta inmune específica, a través de la presentación de antígenos a los linfocitos T. De esta forma son marcadores moleculares, ubicados

en la superficie celular, que ayudan a exteriorizar el ambiente intracelular y le confieren al individuo una identidad tisular propia, reconocida por su sistema inmune. Hasta el momento es poca la información que existe sobre la asociación de los genes de HLA y el linfoma T/NK extranodal tipo nasal, pero existe gran evidencia acumulada sobre asociación de enfermedades con distintos tipos de HLA, esto despierta la inquietud de estudiar la frecuencia de los alelos de estas moléculas en los pacientes con diagnóstico de linfoma T/NK extranodal positivos para virus de Epstein Barr que puedan contribuir en un futuro a un mayor entendimiento de esta rara entidad.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se realizó un estudio abierto, en el que se seleccionaron a todos los pacientes mayores de 18 años de cualquier sexo con diagnóstico de linfoma T/NK extranodal tipo nasal confirmado por clínica, histopatología e Inmunohistoquímica que presentaban virus de Epstein Barr mediante prueba de hibridación in situ EBER en cortes histológicos en la división de dermatología y otorrinolaringología del Hospital General Dr. Manuel Gea González de la ciudad de México en el periodo comprendido de Julio de 2013 a Julio de 2015. Se documentaron los datos clínicos incluyendo edad, sexo, tiempo de evolución al momento del diagnóstico, presentación clínica topográfica y morfológica, características histopatológicas, de inmunohistoquímica y prueba de hibridación in situ realizados de manera rutinaria para diagnóstico. Previa autorización del paciente se tomaron 5 ml de sangre periférica; de un total de 6 casos, un paciente falleció antes de la toma de muestra, de otro paciente se tuvo muestra no viable, del resto se determinaron los alelos de los genes HLA-DRB1, -A, -B y -C mediante el estuche comercial Tepnel-Luminex SSO (del inglés, *sequence specific oligonucleotide*), que consiste en amplificación del DNA (PCR, del inglés *polymerase chain reaction*) e hibridación con oligonucleótidos.

RESULTADOS

De los 4 pacientes incluidos en el estudio 3 fueron hombres y una mujer, la edad media al momento de diagnóstico fue 49.6 años (23 a 67 años), la presentación topográfica fue nasal en 3 pacientes caracterizadas morfológicamente por úlceras nasales, en un paciente acompañadas de neoformaciones nodulares amigdalinas y uno cutánea uno localizado a abdomen, caracterizado por dos neoformaciones unidas de 7x10 cm de diámetro, de aspecto nodular, blandas, infiltradas, dolorosas con ulceración espontánea. Los síntomas predominantes fueron dolor, fiebre y cuadro de rinosinusitis en los casos de presentación nasal (tabla 1).

Al estudio histopatológico todos presentaron infiltrado por linfocitos atípicos de tamaño mediano a grande con angiocentricidad. Los marcadores de Inmunohistoquímica fueron en todos los casos positivos para CD56, CD3, negativo para CD8, CD20 y resultados variables para CD30, CD5 y CD43, además de prueba de hibridación in situ para EBER positiva (tabla 2).

En los resultados de la tipificación del sistema HLA se encontró que dos casos que corresponden al paciente más joven con 23 años de edad con presentación nasal y

el paciente mayor de 67 años con presentación cutánea localizada son homocigotos para el haplotipo B39 (3902), DR4 (0411), DQB1* 0302, en tanto que los otros dos pacientes ambos con presentación nasal, de 39 y 60 años respectivamente lo tienen en estado heterocigoto, por lo que 6 (75%) de los 8 haplotipos de estos pacientes son B39(3902)-DR4(0411)-DQB1*0302. Este haplotipo se presenta en el 2% de la población normal mexicana.

DISCUSIÓN.

Presentamos aquí una serie de 4 casos de linfoma de células T/NK extranodal tipo nasal, de población mexicana, en los que el diagnóstico se realizó bajo estrictos criterios clínicos, histopatológicos, incluyendo la prueba de hibridación *in situ* EBER. Del total de pacientes a 4 de ellos se les realizó determinación de los alelos de los genes HLA-DRB1, -A, -B y -C, que mostró marcada similitud.

Al igual que reportes previos en asiáticos y latinoamericanos nosotros observamos un predominio del sexo masculino con una media de edad de 49 años²⁻⁵. La presentación clínica de 3 casos fueron centofaciales y uno cutáneo, presentación clínica aún mas rara que se considera el 10% de todos los linfomas de ésta estirpe, que a su vez confiere mejor pronóstico¹⁷.

Sin encontrar diferencias en cuanto a otros estudios los hallazgos histopatológicos característicos fueron un infiltrado por linfocitos atípicos de tamaño mediano a grande, y angiocentricidad, que de acuerdo a estudios realizados por Lee y cols. (2013) se presenta en un 74% de los casos¹⁷.

Al estudio de inmunohistoquímica se encontraron positivos los marcadores CD56, y CD3 que se encuentran positivos en un 77% y 100 % de los casos reportados en la literatura respectivamente. Se presentaban con estudios de granzima B únicamente dos pacientes y TIA-1 un paciente, los cuales se encontraron positivos, marcadores reportados con anterioridad positivos en el 100% de los casos¹⁷. Todos los pacientes con éste diagnóstico presentaron prueba de hibridación para VEB positiva, que permitió la inclusión al estudio, característica encontrada en otros reportes en un 88-98%, considerado actualmente criterio diagnóstico de linfoma T/NK extranodal tipo nasal.

En lo referido al HLA en las células atípicas del linfoma de ésta estirpe, un estudio previo realizado por Kanno y cols. en 2000 describieron una frecuencia significativamente baja del alelo HLA-A*0201 en células tumorales de pacientes japoneses con diagnóstico de linfoma nasal tipo reticulosis polimorfa (ahora linfoma T/NK) e infección por VEB, en comparación con población sana⁶⁵, sugiriendo que los linfocitos citotóxicos que reconocen a la proteína LMP en el contexto del HLA-A*0201 en células del linaje NK preneoplásicas y/o neoplásicas infectadas con VEB pueden funcionar *in vivo* para suprimir el desarrollo de un linfoma.

Este trabajo encontró que 6 de los 8 haplotipos provenientes de 4 pacientes mestizos mexicanos con linfoma T/NK están marcados por los alelos: HLA A68, B39 (3902), CW*0702, DR4 (0411), DQB*0302.

Este es el primer trabajo que muestra asociación del polimorfismo del sistema HLA con el linfoma T/NK.

Este haplotipo es particularmente prevalente en poblaciones orientales (China, Japón, Corea) y probablemente explique la alta prevalencia de este tumor en orientales, y también probablemente se relacione con la paleoancestría de las poblaciones mexicanas relacionadas con orientales aproximadamente hace 30,000 años.

Es interesante que el HLA B39 es el segundo alelo más frecuente en mexicanos (mestizos e indígenas), sin embargo al analizar los subtipos moleculares el alelo más frecuente es el HLA-B*3905 (f.g. 7%) en tanto que, los pacientes mostraron el 3902.

Si la frecuencia del alelo 3902 es 2%, el número esperado de homocigotos 3905 según la ley del equilibrio de Hardy-Weimberg es de 4 por 1000, en tanto que en esta serie de casos la mitad resultó homocigota.

La homocigocia para haplotipos de MHC haría más vulnerable al individuo ante la infección por el VEB probable detonador de ésta neoplasia de tejido linfoide de la mucosa nasal, por lo que en la población normal se desalienta cualquier tipo de homocigotos.

El hecho de que todos los pacientes expresen el B39 y el alelo 0702 también sugiere algún defecto en la interacción con los receptores de citotoxicidad en las células NK, dado que el producto del locus HLA-C es ligando de los receptores NK y también por el hecho de que el B39 pertenece a la familia Bw6 cuyos alelos tienden a progresar rápidamente ante las infecciones virales.

CONCLUSIONES

El linfoma T/NK extranodal es una neoplasia rara de curso clínico muy agresivo. A pesar de que se considera muy baja, es más frecuente en nuestra población.

Los datos que encontramos en este estudio sugieren que los genes del sistema HLA participan tanto en la susceptibilidad genética y no se descarta que tengan implicación en el pronóstico de los linfomas T/NK.

Referencias

1. Arndt K, Leboit P, Robinson J, Wintroub B. Cutaneous Lymphomas. *Sem Cutan Medic Surg* 2000;19:71-7.
2. Altemani A, Barbosa A, Kulka M, Takahashi T, et al. Characteristics of nasal T/NK-cell lymphoma among Brazilians. *Neoplasma* 2002;49(1):55-60.
3. Mosqueda T, Meneses G, Zárate O, Ruíz G, Ochoa C, Mohar B. Angiocentric lymphomas of the palate: clinico-pathological considerations in 12 cases. *J Oral Pathol Med* 1997;26(2):93-7.

4. Li Y, Fang H, Liu Q, Lu J, Qi Sh, Wang H, et al. Clinical features and treatment outcome of nasal-type NK/T-cell lymphoma of Waldeyer ring. *Blood* 2008;112(8):3057-64.
5. Barrionuevo C, Zaharia M, Martínez M, Taxa L, Misad O, Moscol A, et al. Extranodal NK/T cell lymphoma, nasal type: study of clinicopathologic and prognosis factors in a series of 78 cases from Peru. *Appl immunohistochem Mol Morphol* 2007;15(1):38-44.
6. Elenitoba J, Zarate O, Meneses A, Krenacs L, Kingma D, Raffeld M, et al. Cytotoxic granular protein expression, Epstein-Barr virus strain type, and latent membrane protein-1 oncogene deletions in nasal T-lymphocyte/natural killer cell lymphomas from Mexico. *Mod Pathol* 1998;11(8):754-61.
7. Ho F, Choy D, Loke S, Kung I, Fu K, Liang R, et al. Polymorphic reticulosis and conventional lymphomas of the nose and upper aerodigestive tract: A clinicopathologic study of 70 cases, and immunophenotypic studies of 16 cases. *Hum Pathol* 1990;21(10):1041-50.
8. Nakamura S, Katoh E, Koshikawa T, Yatabe Y, Nagasaka T, Ishida H, et al. Clinicopathologic study of nasal T/NK-cell lymphoma among the Japanese. *Pathol Int* 1997;47(1):38-53.
9. Siu L, Chan J, Kwong Y. Natural killer cell malignancies: clinicopathologic and molecular features. *Histol Histopathol* 2002;17(2):539-54.
10. Tsang W, Tong A, Lam K, Tideman H. Nasal T/NK cell lymphoma: report of 3 cases involving the palate. *J Oral Maxillofac Surg* 2000;58(11):1323-7.
11. Ko Y, Kim C, Park C, Jang H, Lee S, Kim S, et al. REAL classification of malignant lymphomas in the Republic of Korea: Incidence of recently recognized entities and changes in clinicopathologic features. *Cancer* 1998;83(4):806-12.
12. Au W, Ma S, Chim C, Choy C, Loong F, Lie A, et al. Clinicopathologic features and treatment outcome of mature T-cell and natural killer-cell lymphomas diagnosed according to the World Health Organization classification scheme: A single center experience of 10 years. *Ann Oncol* 2005;16(2):206-14.
13. Lee J, Suh C, Park Y, Ko Y, Bang S, Lee J. Extranodal natural killer T-cell lymphoma, nasal-type: a prognostic model from a retrospective multicenter study. *J Clin Oncol* 2006;24(4):612-8.
14. Thomson G, Mack S, Valdes A, Barcellos L, Gourraud P, et al. HLA disease associations: detecting primary and secondary disease predisposing genes. The immunology database and analysis portal 2011; <http://www.immport.org>
15. Pérez RM. HLA y enfermedad. *Rev Med IMSS* 2005;43(1):91-3
16. Garrido F, Festenstein H, Schirmacher V. Further evidence for depression of H-2 and Ia-like specificities of foreign haplotypes in mouse tumour cell lines. *Nature* 1976;261(5562):705-7.
17. Lee W, Jung J, Won Ch, Chang S, Choi J, Moon K. Cutaneous extranodal natural killer/T-cell lymphoma: A comparative clinicopathologic and survival outcome analysis of 45 cases according to the primary tumor site. *J Am Acad Dermatol* 2014;70(6):1002-9.
18. Harabuchi Y, Yamanaka N, Kataura A, Imai S, Kinochita T, Mizuno F, et al. Epstein-Barr virus in nasal T-cell lymphomas in patients with lethal midline granuloma. *Lancet* 1990;335(8682):128-30.
19. Peh SC, Sandvej K, Pallesen G. Epstein-Barr virus (EBV) in Malaysian upper-aerodigestive-tract lymphoma: incidence and subtype. *Int J Cancer* 1995;61(3):327-32.

ANEXOS.

Caso	Procedencia	Edad	Sexo	Topografía	Morfología	Síntomas	Tiempo de evolución al diagnóstico
1	Chiapas	67a	M	Abdomen	Neoformación exofítica única infiltrada	Dolor intenso	4 meses
2	Guerrero	60a	M	Nasal	Neoformación exofítica en paladar	Dolor, rinorrea, obstrucción nasal, fiebre.	1 año
3	Oaxaca	23a	M	Nasal, amígdalas	Ulcera 1 cm de diámetro y neoformaciones amigdalinas	Rinorrea, fiebre, obstrucción nasal	3 meses
4	Distrito Federal	39a	F	Nasal	Ulcera en paladar duro 0.5 x 0.8 cm	Rinorrea, obstrucción nasal, epistaxis leve	4 meses

Tabla 1. Datos clínicos de pacientes con linfoma extranodal T/NK tipo nasal

Tabla 2. Datos histopatológicos, Inmunohistoquímica y EBER de pacientes con linfoma extranodal T/NK tipo nasal

Caso	Datos histopatológicos	Inmunohistoquímica	Hibridación in situ para EBER
1	Infiltrado por linfocitos atípicos medianos a grandes, citoplasma escaso, núcleo con membrana irregular hipercromática, polimorficos, nucleolo evidente, mitosis atípicas 3-5 por mm ² . Angioinvasión	(+) CD3, CD56 intenso, TIA-1, Ki 80%, CD4 debil focal en parte inferior. (-) CD8, CD20, CD5, CD30, TCR-BF1.	Positivo
2	Infiltrado linfoide atípico, células grandes	(+) CD3, CD56, Granzima B (-) CD20, CD57	Positivo
3	Infiltrado por linfocitos atípicos, con extensa necrosis	(+) CD3, CD56, CD30, CD43, Granzima B (-) CD4, CD8, LMP-1	Positivo
4	Infiltrado por linfocitos atípicos medianos a grandes con núcleos irregulares. Angioinvasión	(+) CD3, CD56 focal, CD7 (-) CD20, bcl-2	Positivo