



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MEXICO

**FACULTAD DE MEDICINA
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO
HOSPITAL INFANTIL DE MÉXICO FEDERICO GÓMEZ**

**EXPRESIÓN DEL MARCADOR CD68 Y LOS miR-BART-22, -16 Y -5,
DEL VIRUS EPSTEIN BARR EN LINFOMA DE HODGKIN CLÁSICO
DE PACIENTES PEDIÁTRICOS**

**TESIS DE POSGRADO
PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
PATÓLOGO PEDIATRA**

**PRESENTA
DRA. KARINA LILIANA LÓPEZ FACIO**

**DIRECTOR DE TESIS
DR. JOSÉ MARIO PÉREZPEÑA DÍAZCONTI**

**ASESORES
DR. PEDRO FRANCISCO VALENCIA MAYORAL
DR. FRANCISCO JESÚS ARENAS HUERTERO**

**JEFE DEL DEPARTAMENTO DE PATOLOGÍA
DR. STANISLAW SADOWINSKI PINE**



HOSPITAL INFANTIL DE MÉXICO
FEDERICO GÓMEZ
Instituto Nacional de Salud

MÉXICO, D.F.



AGOSTO 2011



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MEXICO

**FACULTAD DE MEDICINA
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO
HOSPITAL INFANTIL DE MÉXICO FEDERICO GÓMEZ**

EXPRESIÓN DEL MARCADOR CD68 Y LOS miR-BART-22, -16 Y -5,
DEL VIRUS EPSTEIN BARR EN LINFOMA DE HODGKIN CLÁSICO
DE PACIENTES PEDIÁTRICOS

TESIS DE POSGRADO PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
PATÓLOGO PEDIATRA

PRESENTA

DRA. KARINA LILIANA LÓPEZ FACIO


DR. JOSÉ MARIO PÉREZPEÑA DÍAZCONTI
DIRECTOR DE TESIS


DR. PEDRO FRANCISCO VALENCIA MAYORAL
ASESOR


DR. FRANCISCO JESÚS ARENAS HUERTERO
ASESOR

DEDICATORIAS

A dios Por permitir mi existencia
A mis padres y hermanos Por su apoyo incondicional
A mis amigos..... Que siempre están en mis bendiciones
Al amor de mi vida..... Donde quiera que él esté

AGRADECIMIENTOS

Al Hospital Infantil de México, por recibirme y darme la oportunidad de crecer
como profesionista y ser humano
A mi director y asesores de tesis por su valiosa ayuda
A mis maestros por compartir sus conocimientos
A mis compañeros de trabajo por compartir momentos inolvidables en mi vida

ÍNDICE	Página
Resumen	6
1. Antecedentes	
1.1 Epidemiología	7
1.2 Clasificación	8
1.3 Etiología	10
1.4 Pronóstico	10
2. Marco teórico	11
3. Planteamiento del problema	14
4. Justificación	17
5. Objetivos	18
5.1 Objetivo general	18
5.2 Objetivos específicos	18
6. Hipótesis	19
7. Material y método	20
7.1 Tipo de estudio	20
7.2 Población de estudio	20
7.3 Tamaño de la muestra	20
7.4 Criterios de inclusión	20
7.5 Criterios de exclusión	20
7.6 Criterios de eliminación	20
8. Descripción de variables	21
8.1 Variables independientes	21
8.2 Variable dependiente	21
8.3 Definición operacional de variables	21
9. Metodología	22
10. Análisis estadístico	25

11. Resultados	26
11.1 Expresión de miR-BARTs	29
11.2 Expresión de CD 68	31
12. Discusión	33
13. Conclusiones	36
16. Referencias	40

RESUMEN:

En artículos recientes se ha asociado a un número elevado de células positivas para CD 68 con mal pronóstico en pacientes adultos con Linfoma de Hodgkin (LH) y no Hodgkin. El Virus de Epstein Barr (VEB) puede producir varias proteínas en la fase de infección latente entre éstas se encuentra LMP1. El VEB codifica sus propios miRNAs, denominados miR-BARTs entre éstos -22, -16 y -5, evitando la expresión de LMP2 y LMP1. Hay pocos estudios en los que se haya investigado la expresión de miR-BARTs relacionados a VEB y estos son en carcinomas nasofaríngeos de pacientes adultos.

Objetivo General: Comparar la expresión de CD 68 y los miR-BART -22, -16 y -5 en Linfoma de Hodgkin Clásico (LHC) de niños, con los diferentes subtipos histológicos.

Materiales y método: Se extrajo el RNA total de cada tumor, y se amplificaron por RT-PCR los miR-BARTs -5, -16 y -22 de los LHC. Se realizaron las correlaciones entre su expresión y la variedad histológica, presencia de LMP-1, grupos de edad así como género. Se realizó inmunohistoquímica para CD 68, se cuantificaron las células positivas en 10 campos realizando comparaciones según la variedad histológica y con datos de mal pronóstico como presencia de recurrencia y muerte.

Resultados: Se tomó una muestra de 24 casos. El 100% de los casos fueron positivos para VEB. 22/24 casos fueron positivos para LMP-1 (91.6%); 19 de estos casos fueron negativos para miR-BART-16 (86.3%), 20/24 casos expresaron miR-BART-5 el cual está relacionado con la apoptosis. miR-BART-22 fue positivo en uno de los casos de LMP-1 negativo, lo cual puede relacionarse con su regulación indirecta. En cuanto a la expresión de CD 68 se observó un número elevado (>151 células por campo de seco fuerte), en dos casos con recaída de la enfermedad y uno de éstos falleció (186 células).

Conclusiones: Existe una franca asociación entre VEB y LHC. La ausencia de LMP-1 corrobora la existencia de otros mecanismos oncogénicos que dan origen al LHC. La expresión de miR-BARTs refleja indirectamente la actividad del EBV. Los casos con recaída y muerte tuvieron > 151 macrófagos CD 68+.

ANTECEDENTES

Linfoma de Hodgkin Clásico

Epidemiología

El linfoma de Hodgkin es definido por la Organización Mundial de la Salud como una neoplasia linfoide monoclonal compuesta por células mononucleares de Hodgkin y multinucleadas de Reed-Sternberg inmersas en un fondo mixto inflamatorio no neoplásico compuesto por linfocitos, eosinófilos, células plasmáticas, neutrófilos, histiocitos y fibroblastos.⁴

Los linfomas son en los niños, la tercera neoplasia maligna más común, después de la leucemia y de los tumores del sistema nervioso central.⁶

El linfoma de Hodgkin representa el 1% de todas las neoplasias malignas y 30% de los linfomas en los Estados Unidos. Cerca de 7500 casos nuevos son diagnosticados anualmente. En los países industrializados el Linfoma de Hodgkin clásico tiene un pico bimodal de distribución, el primer pico ocurre entre las edades de 15 y 35 años, y el segundo se observa aproximadamente en la sexta década. En países subdesarrollados, el linfoma de Hodgkin es menos común, pero es más frecuente en niños.⁴⁻⁵

Los datos obtenidos en el Hospital Infantil de México por el Departamento de Bioestadística y Archivo Clínico de Linfoma de Hodgkin muestran una tasa de morbilidad de 55.6 por cada 1000 consultas en el 2007 y de 35.7 por cada 1000 consultas en el 2009. En cuanto a las diez principales causas de mortalidad en el año 2008, el Linfoma de Hodgkin se encontró en el tercer lugar con una tasa de 118 por cada 1000 egresos.

Clasificación.

Se han propuesto numerosas clasificaciones a través de los años para el Linfoma de Hodgkin, en la actualidad se utiliza la clasificación de la OMS de y se cataloga dentro de dos entidades distintas:

- 1) Linfoma de Hodgkin predominio linfocítico nodular, (LHPLN) y
- 2) Linfoma de Hodgkin clásico; éste último a su vez se subdivide en:
 - Disminución linfocítica, (LHCDL)
 - Esclerosis nodular, (LHCEN)
 - Celularidad mixta, (LHCCM) y
 - Rico en linfocitos (LHCRL) ⁴⁻⁷

Para el diagnóstico de Linfoma de Hodgkin es necesario identificar el tipo de célula neoplásica que usualmente representa menos del 1% del tumor. En el caso del Linfoma de Hodgkin Clásico, la célula neoplásica es la de Reed-Sternberg (RS) y sus variantes; que incluyen las células mononucleares (células de Hodgkin), multinucleadas, momificadas, lacunares y células pleomórficas; todas tienen el mismo inmunofenotipo que la célula clásica⁸. El entorno celular es una mezcla reactiva variable de linfocitos T y B, eosinófilos, histiocitos, fibroblastos y células plasmáticas, dado por la elaboración de citocinas por las células de RS que actúan como factores autócrinos y paracrinos produciendo el fondo inflamatorio característico. Por otro lado, el Linfoma de Hodgkin predominio linfocítico nodular carece de las células de Reed-Sternberg, la célula neoplásica característica fue llamada originalmente linfocito-histocítica o L&H, después de la descripción de esta forma de linfoma de Hodgkin por Lukes y Butler también fueron referidas como “rosetas de maíz”; en la clasificación de la OMS del 2008 se recomendó el uso del término “célula LP”. Los cuatro subtipos de Linfoma de Hodgkin clásico difieren en sus características epidemiológicas, clínicas, composición del entorno celular, número, variante de las células de RS y la frecuencia de infección por Virus de Epstein-Barr (VEB) ⁴⁻¹⁰, (Cuadro 1).

Cuadro 1. Características clínicas e histopatológicas del Linfoma de Hodgkin en adultos y niños.

Subtipo	Incidencia/ Epidemiología	Localización	Pronóstico	Histología	Frecuencia de infección de VEB
LHPLN	M:F(3:1), pico unimodal en la cuarta década, puede presentarse en niños	Ganglios linfáticos periféricos	Buena respuesta a tratamiento, recaídas tardías, puede progresar hacia LCBGD	Células LP, con un fondo de linfocitos en patrón nodular o difuso	-----
LHCRL	M:F (2:1), >40 años	Ganglios periféricos	Buen pronóstico, recaídas infrecuentes	Célula R-S, en la zona marginal o del manto.	LMP-1 50%
LHCCM	M:F (2:1), países subdesarrollados, niños y adultos mayores, VIH	Ganglios periféricos Bazo	Agresivo	Célula R-S, fondo inflamatorio mixto con linfocitos, eosinófilos, células plasmáticas e histiocitos.	LMP-1 frecuente 75%
LHCDL	M:F (4:1), raro, VIH, Países subdesarrollados	Retroperitoneo con estadio abdominal avanzado	Agresivo	R-S pleomórficas, con fondo hipocelular	LMP-1 90%
LHCEN	M:F (1:1), Más común, adolescentes y adultos jóvenes	Ganglios cervicales, axilares y mediastinales	Intermedio entre LHCRL y LHCDL	Células lacunares y momificadas, fibrosis capsular	LMP-1 10-40%

Tabla elaborada con base a datos contenidos en Clinical Lymphoma and myeloma 2009;9:206-16.

Causas del Linfoma de Hodgkin.

Aunque la causa del Linfoma de Hodgkin permanece sin resolver, la histogénesis de las células de RS por estudios de inmunohistoquímica, muestran un origen de células B del centro germinal y estadio post-centro germinal. Los estudios de inmunoglobulinas y rearrreglos genéticos han establecido la naturaleza clonal de estas células. Una alta carga de mutaciones somáticas en el rearrreglo de los genes de la inmunoglobulina han apoyado la derivación de centro germinal, específicamente de células B preapoptósicas. El hecho de que adquieran la capacidad para escapar de apoptosis, sobrevivir y continuar proliferando representa el mayor evento oncogénico en la génesis del Linfoma de Hodgkin clásico. La apoptosis parece ser inhibida por diversos mecanismos por la célula RS, uno de los factores principales parece ser la infección por el virus del Epstein-Barr (VEB). Los Linfomas de Hodgkin clásicos asociados a infección por VEB se presentan en pacientes sin manifestaciones clínicas de deficiencia en la inmunidad antiviral, y la mayoría de los adultos portadores de VEB no desarrollan Linfoma de Hodgkin Clásico, se han propuesto mecanismos diferentes para explicar su origen.¹¹

Pronóstico

El Linfoma de Hodgkin fue la primera neoplasia en la cual se demostró potencial curativo cuando se administraban diferentes esquemas de quimioterapia. En la actualidad, aproximadamente el 80% de los pacientes pueden ser curados. Los factores pronósticos señalados por la Organización Mundial de la Salud además de los subtipos histológicos son la supervivencia y el número de recaídas, que se han relacionado con la extensión de la enfermedad y la presencia o no de síntomas B (fiebre, sudoración y pérdida de peso). En 1971 el sistema de estadificación Ann Arbor fue adoptado y subsecuentemente modificado por un comité en Costwold, Inglaterra basado en datos clínicos.⁴⁻⁷ (Cuadro 2).

Cuadro 2. Escala de clasificación de Ann Harbor revisada por Costwold⁴⁻⁷

Estadio	Definición
I	Afección de un solo ganglio linfático o estructura linfoide (bazo, timo)
II	Afección de dos o más regiones o ganglios linfáticos del mismo lado del diafragma.
III	Afectación de ganglios linfáticos o estructuras a ambos lados del diafragma.
III1	Con o sin ganglios portales, celiacos o esplénicos
III2	Con ganglios mesentéricos, iliacos o paraaorticos
IV	Afectación de un sitio o más extranodales.

MARCO TEORICO

Los linfomas son un grupo heterogéneo de neoplasias que se originan de una proliferación monoclonal de células precursoras en órganos linfoides. El estudio de la biología molecular de los linfomas permite desarrollar y proponer la generación de marcadores genéticos/biológicos que pueden ayudar a clasificar a estos tumores, ser de utilidad para factores pronósticos y desarrollar tratamiento blanco molecular.

El virus de Epstein-Barr.

El VEB mide de 100 a 200nm de diámetro, poseen una nucleocápside con simetría icosaédrica, rodeada por una cubierta externa que contiene lípidos. Su genoma está constituido por una molécula de ADN bicatenario de 170 a 175 kpb, generalmente la vía de transmisión es oral por un individuo portador, cuando la infección se presenta durante la infancia generalmente pasa inadvertida, mientras que si se presenta en la adolescencia o después, puede mostrarse como un cuadro de mononucleosis infecciosa ¹².

Durante la infección, el VEB infecta principalmente dos tipos de células, las células epiteliales y los linfocitos B, aunque bajo ciertas circunstancias puede infectar también linfocitos T ¹².

Las células B infectadas por el VEB pueden expresar cuatro diferentes “programas” de genes y el uso del “programa” va a depender del estado de diferenciación y localización de las células B infectadas. Uno de estos programas es usado para producir virus infecciosos; los otros tres están asociados con la infección latente y estos no producen virus infecciosos. Durante la fase latente el VEB infecta a los linfocitos B y permanece presente en una pequeña población en sangre periférica y ganglios linfáticos, en una situación de relativa inactividad conocida como infección latente. En el ciclo lítico se produce replicación, síntesis proteica y génesis de nuevos viriones, la replicación viral se acompaña de la expresión de cerca de 90 proteínas virales, incluida BZLF 1 (también conocida como ZEBRA) y complejos de proteínas virales colectivamente referidos como antígenos de cápsides virales y antígenos tempranos ¹³.

Los mecanismos patogénicos por los que el VEB es capaz de inducir la aparición de tumores, se relaciona con las proteínas codificadas por algunos de los genes expresados en la infección latente, induciendo diferentes efectos sobre la célula, caracterizada por una gran producción de RNA codificada de VEB (EBER). Las células B infectadas por el VEB pueden expresar un grupo bien definido de genes de latencia que incluye seis antígenos nucleares (EBNAs) y tres proteínas latentes de membrana (LMP1, LMP2A, LMP2B). De estas proteínas de latencia, LMP1 es la que juega un papel importante, ya que es capaz de alterar funciones críticas de la célula B, como la transcripción génica, el control del ciclo celular y la regulación de la apoptosis considerada la oncoproteína más fuerte y esencial para la inmortalización de las células B ¹³.

Micro-RNAs específicos del VEB: miR-BARTs.

En la actualidad se han realizado varias técnicas y estudios para la detección de VEB por Biología Molecular, y se han hecho progresos enfocados en la presencia del RNA y DNA viral. La hibridación *in situ* de EBER se considera el estándar de oro para detectar y localizar VEB latente en muestras de tejido procesado¹². Sin embargo, existen algunos problemas como la detección del VEB mediante DNA genómico-viral; o la falta de detección por problemas de preservación del tejido, y en consecuencia del DNA. Además, estas detecciones sólo permiten confirmar la presencia de genes tempranos o tardíos, sin otra relación¹⁴⁻¹⁶.

Los microRNAs, son un grupo de pequeños RNA no codificantes con un tamaño de aproximadamente 18 a 24 nucleótidos, estos se producen por digestión enzimática endógena de RNA de transcripción con una estructura en forma de gancho. La función del miRNA es la de ser regulador negativo de la expresión genética, a través de la secuencia complementaria del gen blanco para inducir degradación o represión del RNA mensajero. Estas moléculas fueron descritas por primera vez en 1993 por Ambros y colegas en *Caneorhabditis elegans* y hasta la fecha miles de miRNAs han sido identificados en otras especies, incluidos virus como el VEB.¹⁵

Los microRNAs juegan un papel importante en la proliferación celular, la diferenciación y desarrollo embrionario, estos también actúan como oncogenes o genes de supresión tumoral. La mayoría de los miRNAs se encuentran en sitios cromosómicos frágiles o regiones genómicas asociadas al cáncer, sugiriendo un importante rol de los miRNAs en la tumorigénesis humana. También hay evidencia de que la influencia de miRNAs en la oncogénesis puede estar dada indirectamente. Por ejemplo, la presencia de algunos virus en una célula puede cambiar el patrón del miRNA del huésped.¹⁵

El VEB tiene 2 grupos grandes y 2 pequeños donde se encuentran codificados sus propios miRNAs, denominados miR-BARTs y son más de 40. Participan en regular la expresión de las proteínas LMP1 y LMP2, importantes en la fisiopatología de la enfermedad. Por ejemplo, se propone para el modelo de carcinoma nasofaríngeo en adultos que el miR-BART-22 regula negativamente la expresión de la proteína LMP2; por su parte los miR-BART-16 y 17 regulan también negativamente la expresión de la proteína LMP1. Finalmente, el miR-BART-5 regula negativamente la expresión del modulador de apoptosis controlado por p53 (PUMA). De estos, miR-BART-22 y -21 también se han descrito en linfomas Hodgkin de adultos.

Estos miR-BARTs descritos tienen funciones importantes y cruciales ya que evitan la expresión de LMP2 y LMP1 que son altamente inmunogénicas; esta última además participa en la inducción también de muerte celular en linfoma; y de esta manera evadir la respuesta inmune y realizarse la transformación neoplásica y la aparición del cáncer¹⁵⁻¹⁷.

Como se mencionó anteriormente, el VEB se relaciona con el Linfoma de Hodgkin y el rol preciso en la patogénesis aún se desconoce.

Biología del Linfoma Hodgkin y el marcador CD 68.

La interacción entre las células de Reed-Sternberg que representan menos del 1% de la masa tumoral, y el fondo inflamatorio mixto característico, se le ha designado como “células espectadoras inocentes” juega un papel importante en la patogénesis y progresión del Linfoma de Hodgkin. Esta “comunicación” intercelular está dada por una variedad de citocinas, quimiocinas, factores de crecimiento y sus receptores, incluidas las interleucinas (IL-1 a IL-10), interferon y factor de necrosis tumoral alfa, favoreciendo la supervivencia de las células neoplásicas; además estas sustancias se encuentran estrechamente relacionadas a las manifestaciones clínicas como los síntomas B. Se han realizado diversos trabajos de investigación utilizando tinciones de inmunohistoquímica asociando la expresión de distintos tipos celulares con el pronóstico.

Una de las células hallada comúnmente en el entorno celular mixto del linfoma de Hodgkin es el macrófago; célula derivada de los monocitos y encargada de la fagocitosis, digestión y destrucción de patógenos; también interactúa con otros tipos celulares específicos para la inmunidad adquirida, tanto celular como humoral.

El marcador de inmunoperoxidasa CD 68 es el más sensible aunque no específico, y es utilizado para su identificación.

Este anticuerpo es una glucoproteína transmembranal tipo I, de 110 KDa y miembro de la familia de moléculas hematopoyéticas tipo mucina, que incluye leucosialina/CD 43 y antígeno de célula madre CD 34. Su expresión es intracelular en gránulos citoplasmáticos, pero puede ser detectado en pequeñas cantidades en la superficie de las células ²¹

Se ha asociado el aumento de macrófagos CD68 positivos con fracaso en el tratamiento y mal pronóstico en pacientes con LHC y en Linfomas no Hodgkin como el folicular y de células grandes B difuso.¹⁸

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El VEB es un patógeno ubicuo que ha infectado a más del 90% de la población mundial en la edad adulta. La infección por el VEB usualmente ocurre de forma subclínica en la infancia temprana y permanece en los linfocitos B en una situación de relativa inactividad conocida como fase de latencia; durante la cual produce proteínas que son altamente oncogénicas.

Aunque es conocida la relación del VEB y su porcentaje aproximado en cada una de las variedades del LHC, el hecho de que no todos los casos de linfomas tengan títulos de expresión para VEB ocasiona una duda de su rol en la patogénesis. Los miR-BARTs son micro RNAs específicos del VEB cuya actividad como originadores de neoplasia, al regular la expresión de las proteínas de latencia del virus y favoreciendo la supervivencia de las células infectadas inhibiendo su muerte, se han estudiado tanto en tumores sólidos; como el carcinoma nasofaríngeo y linfomas no Hodgkin, pero no en LHC, ni en la edad pediátrica. Estos microRNAs son factibles de estudiar ya que son partículas estables y obtenibles de tejido incluido en parafina.

Otra de las características que hacen peculiar al linfoma de Hodgkin es que la célula neoplásica representa menos del 1% y el resto está conformado por células acompañantes dando un fondo inflamatorio mixto no neoplásico, el macrófago es una de las células que se encuentra comúnmente en este fondo inflamatorio y se han realizado estudios actuales sobre un mal pronóstico en cuanto a recaídas y mala respuesta al tratamiento de los pacientes con LHC, si el número de éstas células se encuentra elevado, pero éstos estudios han sido realizados en pacientes adultos, por lo que es importante conocer si hay una correlación en el paciente pediátrico.

JUSTIFICACION

Los mecanismos patogénicos por los que el VEB es capaz de inducir la aparición de tumores se relacionan con los productos derivados de algunos de sus genes que ejercen varias acciones sobre la célula huésped infectada, especialmente en la infección latente, produciendo la proteína LMP-1 y LMP-2A entre otras y dando la capacidad de inmortalizar las células B infectadas.

Hay poca consistencia y confiabilidad en la presencia del VEB en las distintas variedades histológicas de LHC, ya que ésta se realiza comúnmente por métodos de inmunohistoquímica ante la presencia de la LMP-1.

La determinación de los miR-BARTs involucrados en la regulación de la apoptosis y en la oncogénesis del Linfoma de Hodgkin, permite iniciar la comprensión del desarrollo del tumor, y explicar por qué en algunas ocasiones, no es detectable por inmunohistoquímica la proteína viral, y planteará blancos potenciales para el control y reducción del crecimiento del tumor.

En la actualidad, existen nuevas técnicas moleculares combinadas con exámenes inmunohistoquímicos que se complementan y apoyan el diagnóstico y seguimiento de la enfermedad. En este proyecto se estudian a nivel molecular, reguladores como los miRNAs del VEB, miR-BARTs y el inmunomarcador CD68 en linfomas de Hodgkin en la edad pediátrica.

El estudiar el perfil de expresión de los miR-BARTs específicos para VEB y CD68 en Linfoma de Hodgkin Clásico de pacientes pediátricos, permitirá evaluar su importancia como marcador molecular en la génesis, apoptosis, así como en la respuesta al tratamiento y supervivencia a la enfermedad.

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL:

Comparar la expresión de CD68 y los miR-BART-22, -16 y -5 entre los diferentes subtipos histológicos de Linfoma de Hodgkin clásico de niños.

OBJETIVOS ESPECIFICOS:

1. Categorizar los casos estudiados según el subtipo histológico de Linfoma de Hodgkin clásico.
2. Cuantificar el número de células CD68+ en el entorno celular mixto según la variedad histológica.
3. Comparar la expresión de los miR-BART-22, -16 y -5 de acuerdo a cada subtipo histológico, al estadio clínico y a la presencia de síntomas B.

HIPOTESIS:

Existen diferencias en la expresión del marcador CD68 y de los miR-BARTs propuestos, en las diferentes variedades histológicas de casos de Linfoma de Hodgkin pediátricos.

MATERIAL Y MÉTODO:**Tipo de Estudio:**

Observacional, descriptivo

Población de estudio:

Los casos de linfoma de Hodgkin clásico diagnosticados en el Departamento de Patología Clínica y Experimental del Hospital Infantil de México en un período de 8 años.

Tamaño de la muestra:

En base a los criterios de inclusión se eligieron 24 casos incluidos en parafina.

Criterios de inclusión:

Tejido fijado en formol e incluido en parafina de linfoma de Hodgkin clásico en ganglio linfático de los cuatro subtipos histológicos, con pruebas de inmunohistoquímica específicas positivas.

Material suficiente para estudio molecular y de inmunoperoxidasa CD 68

Criterios de exclusión:

Los casos diagnosticados por fuera de este Hospital que no cuenten con tejido para practicar el estudio.

Casos en los cuales el diagnóstico de Linfoma de Hodgkin no fue ratificado después del análisis histológico

Criterios de eliminación:

Los casos en los que no se encontró bloque de parafina o material insuficiente.

DESCRIPCIÓN DE VARIABLES:**Variables independientes:**

Edad

Sexo

Estadio clínico

Expresión de miR-BARTS,-5, -16 y -22

Expresión de CD 68

Variable dependiente:

Variedad histológica de Linfoma de Hodgkin Clásico

DEFINICIÓN OPERACIONAL DE VARIABLES:

Edad: Manifestada en años. Cuantitativa, continua.

Sexo: Masculino o femenino. Determinado según fenotipo, discontinua.

Estadio Clínico: Continua, I a IV Determinado por la extensión de la enfermedad y órgano (s) afectados.

Síntomas B. Discontinua. Estipulada por la presencia o ausencia de fiebre, pérdida de peso y/o diaforesis nocturna.

Expresión de miRBARTS: Discontinua. Determinada por la presencia de amplificación con banda positiva a 70 pb

Expresión de CD68: Cuantitativa, continua. Número de células marcadas como positivas en el citoplasma para el anticuerpo CD68 por campo de gran aumento (40X).

METODOLOGIA

Muestras de ganglio linfático con linfoma de Hodgkin Clásico y sus variedades histológicas.

RECOLECCIÓN DE DATOS GENERALES, CLÍNICOS Y SELECCIÓN DE LA MUESTRA

Se identificaron los linfomas de Hodgkin Clásicos diagnosticados en un período de ocho años (2000-2008).

Se revisaron las libretas foliadas por año, organizándose por fecha y número de folio el total de linfomas encontrados

Se separaron el total de linfomas según la variedad histológica y se eligieron los casos incluidos para el estudio en las variedades esclerosis nodular y celularidad mixta 10 de cada grupo, 1 rico en linfocitos y 3 disminución linfocítica según una muestra de 24 casos en total.

Se buscaron en las hojas de envío (base de datos), los datos generales como el folio del estudio, con diagnóstico final y registro.

Se investigaron los datos clínicos de los pacientes en el expediente clínico, caracterizándose la población de acuerdo a:

Edad

Sexo

Estadio

Síntomas B

Tamaño tumoral

Recaídas

Muerte

-Tejido incluido en parafina, muestras para biología molecular y estudio de inmunohistoquímica.

Se revisaron todas las laminillas de los casos seleccionados por microscopía de luz en tinción de hematoxilina y eosina eligiéndose uno de los cortes representativos histológicamente según la variedad histológica del linfoma con células viables.

Se buscaron en archivo los bloques de parafina de los guiones elegidos para estudio de inmunohistoquímica y biología molecular.

Se tomó una muestra representativa de 4cm de diámetro y se re-incluyeron en parafina, identificándose con el folio del estudio y guión del mismo. Se realizaron cortes de 4 μm para estudio de inmunohistoquímica y 4 de 10 μm para estudio de biología molecular.

BIOLOGÍA MOLECULAR:

En 2 cortes en blanco de cada caso se procedió a aislar el RNA total mediante el siguiente protocolo: ***Aislamiento y extracción de RNA de las muestras incluidas en parafina:***

1.-*Desparafinización:* Para eliminar la parafina del tejido se agregó 1 ml de xileno durante más de una vez cuando fue el caso y se incubó 5' a 50° C. Este paso se repitió pero con etanol absoluto. En cada paso se centrifugó el tejido a 5000 rpm durante 3' hasta formar un "botón", posteriormente se secó en baño seco por 40 minutos a 40° C y a temperatura ambiente por 30 minutos.

2.-*Digestión con nucleasa:* Se añadieron a cada muestra 100 μl de buffer de digestión y 4 μl de proteasa a cada muestra, mezclándose gentilmente. Se incubó por 15 minutos a 50° C y posteriormente 15 minutos a 80° C, posteriormente se congeló la muestra a -20° C hasta su uso.

3.-*Aislamiento del ácido nucleico*: Se extrajo el RNA total de cada muestra usando el equipo de “Recoverall total Nucleic Acid Isolation” de AMBION y se siguieron los pasos especificados por el fabricante. Los RNAs se resuspendieron en agua libre de nucleasas y se congelaron a -20° C hasta las reacciones de RT.

4.- *Síntesis del DNA Complementario, cDNA mediante la reacción de RT*: Se realizó la síntesis de cDNA, utilizando 4.47 µl del RNA total, y 0.75 µl del oligo RT miR-BART -5, -16 o -22, con el equipo cDNA FERMENTAS, bajo las condiciones del fabricante.

Las secuencias de cada **oligo RT- miR-BART**, fueron diseñadas en el laboratorio utilizando la secuencia artificial de un U6 y se agregaron los últimos 6 nucleótidos específicos del miR-BART basándose en la base de datos de micro RNAs. Las secuencias fueron las siguientes:

ebv-miR-BART 5-RT: 5´-GTC GTA TCC AGT GCA GGG TCC GAG GTA TTC GCA CTG GAT ACG ACC GAT GG-3´,

ebv-miR-BART 16-RT: 5´-GTC GTA TCC AGT GCA GGG TCC GAG GTA TTC GCA CTG GAT ACG ACA GAG CA-3´,

ebv-miR-BART 22-RT: 5´-GTC GTA TCC AGT GCA GGG TCC GAG GTA TTC GCA CTG GAT ACG ACA CTA CT-3´.

5.-*Reacción de amplificación de cada miR-BART*: Se realizó el PCR de los miR-BARTS específicos -5, -16 y -22, utilizando los siguientes iniciadores que se diseñaron en el Laboratorio de Biología Molecular utilizando la fórmula $T_m = 2(A+T) + 4(G+C)$:

ebv-miR-BART 5-F: 5´-GCC AAG GTG AAT ATA GCT GC- 3´,

ebv-miR-BART 16-F: 5´-GCT TAG ATA GAG TGG GTG TG-3´,

ebv-miR-BART 22-F: 5´-GGC CTT ACA AAG TCA TGG TC-3´; y

en todos los casos se utilizó la secuencia:

U6-R: 5'-CAG TGC AGG GTC CGA GGT- 3'.

Esto se practicó con el sistema FERMENTAS de *Taq* polimerasa

6.-*Revelado de los resultados:* Se utilizó para revelar los productos de amplificación geles de agarosa al 4%. Se cargaron 10 µl del producto de cada amplificación y se aplicaron 90 volts durante 90 minutos. Las bandas de amplificación se revelaron mediante la tinción con bromuro de etidio y se observaron en un transiluminador, guardándose las imágenes digitales en formato JPG y se consideraron positivos los casos con bandas de 70 pb.

Estudio de inmunohistoquímica:

Se realizaron 8 cortes delgados a 4 µm, sobre laminillas tratadas con poli-L-lisina (catálogo Sigma Aldrich, P8920). Se realizó inmunotinción para el marcador CD68 (clona KP1) Biocare medical, Concord, CA, dilución 1:250, con recuperador de antígeno, mediante la técnica de inmunoperoxidasa de acuerdo a las especificaciones del fabricante. Se cuantificó el número de células positivas en 10 campos de gran aumento (40x) y se obtuvo un promedio.

ANALISIS ESTADISTICO

Se realizó la estimación porcentual del número de casos positivos/negativos en cada miR-BART específico -5, -16 y -22. Así como en la cuantificación de CD 68 según la variedad histológica.

RESULTADOS:

Durante el tiempo comprendido del 2 de Enero del 2000 a 31 de Diciembre del 2008, se registraron 89 Linfomas de Hodgkin Clásico diagnosticados en ganglio linfático, de los cuales la variedad histológica de mayor frecuencia fue LHCEN 54 casos registrados (60%), seguido de LHCCM con 31 casos (35%), LHCDL 3 casos (3.4%) y uno sólo (1.1%), LHCRL. (Figura 1)

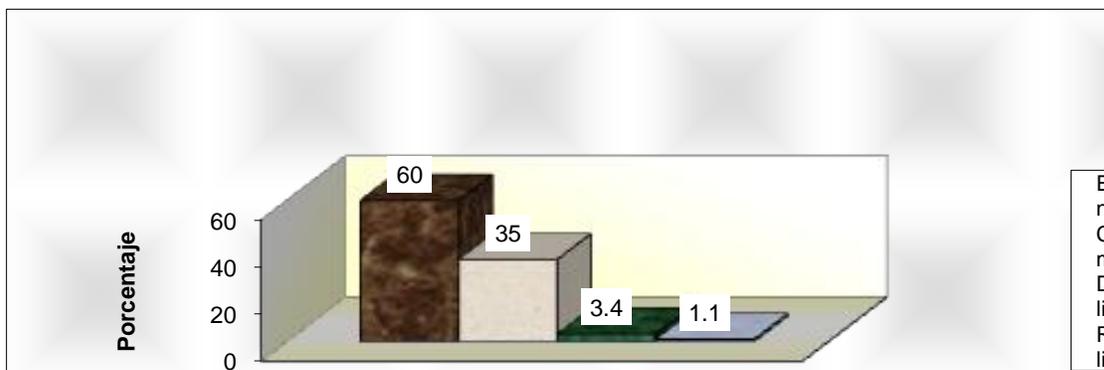


Figura 1. Variedades histológicas de LHC diagnosticado durante el periodo del 2 de Enero del 2000 al 31 de Diciembre del 2008. n= 89 casos.

De estos 89 casos, 65 casos (73%) pertenecían al sexo masculino y 24 casos (27%) al sexo femenino, se eligieron para su estudio 24 casos en total los cuales se revisaron por dos diferentes patólogos para corroborar la variedad histológica; los criterios histopatológicos fueron para el LHCEN, la formación de al menos un nódulo rodeado por un tabique de fibrosis y la presencia de la célula neoplásica característica lacunar, LHCCM se caracteriza por la presencia de células de R-S y el fondo inflamatorio mixto, LHCDL compuesto por células neoplásicas pleomórficas y disminución en el número de células inflamatorias no neoplásicas acompañantes y por último el LHCRL formado por células mononucleares en un fondo rico en linfocitos, sin otro tipo de célula inflamatoria acompañante (Figura 2)

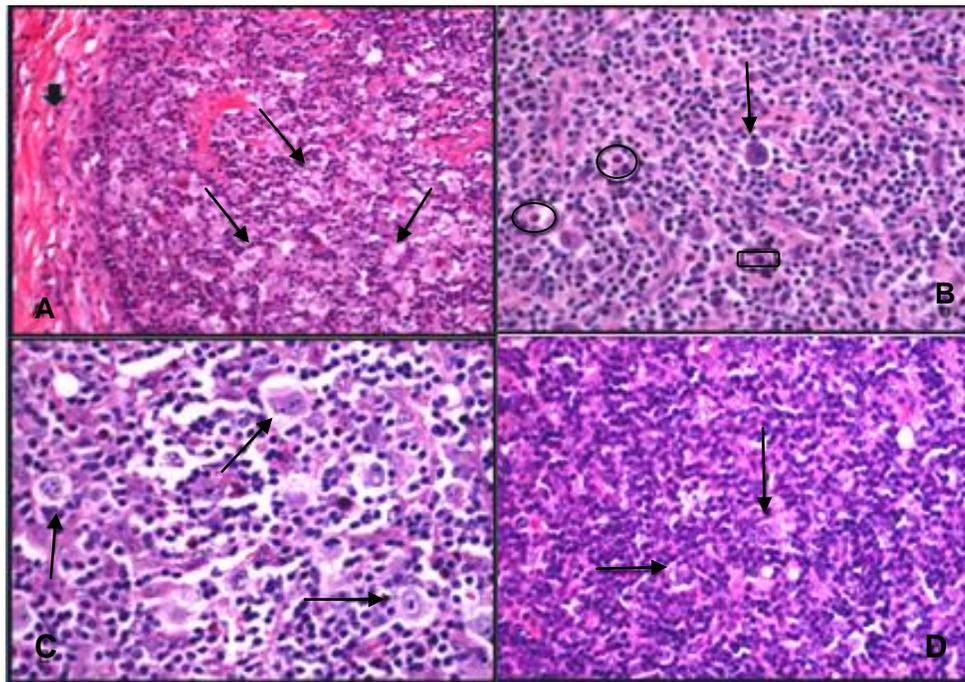


Figura 2. Variedades histológicas del LHC. A. LHEN, señalado con **▣** se observan las bandas de fibrosis y con **↓** las células lacunares. B. **↓** Célula clásica de R-S **○** eosinófilos y **□** célula plasmática C. LHCDL caracterizado por la presencia de células pleomorficas **↓** y D. LHCRL , con abundantes linfocitos acompañando a células mononucleares **↓** Aumento 20X (A), 40X (B,C y D).

De esta manera, el grupo quedó conformado por 18 casos (75%) del sexo masculino y 6 (25%) del sexo femenino, y el intervalo de edad fue de 4 - 15 años, con una media de 9 años. Su distribución de acuerdo a cada variedad histológica se muestra en Tabla 1.

Género	LHEN	LHCCM	LHCDL	LHCRL
Masculino	8	7	2	1
Femenino	2	3	1	----
Edad (años)	4 - 14	5 - 15	6 - 12	5

Tabla 1. Distribución por género de cada variedad histológica de LHC.

1. Presencia de Virus de Epstein Barr. La técnica de inmunohistoquímica utilizada para corroborar la presencia de este virus de forma rutinaria en los casos de Linfoma de Hodgkin Clásicos es LMP-1; esta proteína de membrana es la principal implicada en la oncogénesis del tumor. Histológicamente se observa la célula de Hodgkin o Reed-Sternberg con marcaje en la membrana y el aparato de Golgi como se puede observar en figura 3.

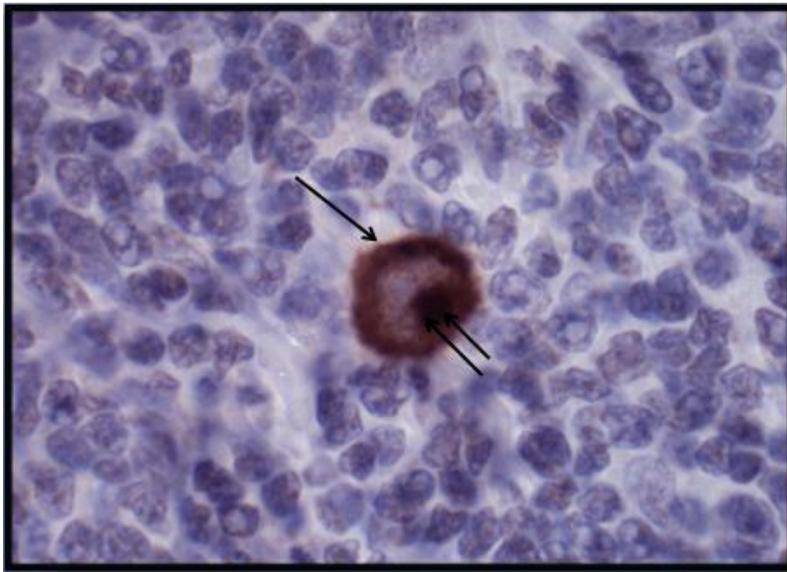


Figura 3. Tinción de inmunohistoquímica de LMP-1 (proteína latente de membrana-1), la cual tiñe la membrana citoplasmática de ahí su nombre (flecha) y el aparato de Golgi (doble flecha) confirmando la presencia de virus de Epstein Barr. Aumento 100X.

2. Expresión de LMP-1 y de los miR-BARTS -16, -5 y -22 en los casos con LHC.

Se hizo la reacción de RT-PCR para corroborar la presencia o ausencia de alguno de los miR-BARTs estudiados. La amplificación clara de un amplificado de 70 pb demostró la presencia del correspondiente miR-BART (Figura gel). Como se muestra, existen cantidades variables en los diferentes miR-BARTs y se pueden observar los casos positivos (flechas).

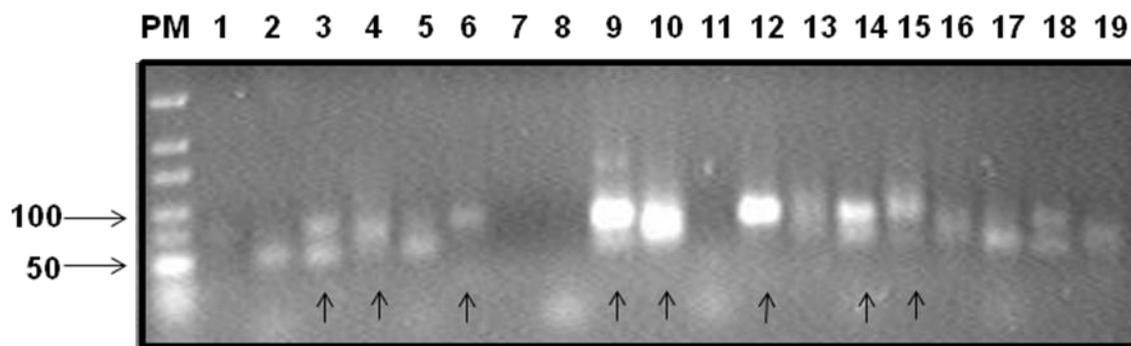


Figura 4. RT-PCR del miR-BART- de casos con LHC y cada número muestra un caso diferente que corresponden del 1 y 2 a miR-BARTs -16 y -22 de LHCEN, del 3 a 5 LHCEN, 6 a 8 LHCEN, 9 a 11 LHCEN, 12 a 14 LHCCM, 15 a 17 LHCCM, 18 y 19 LHCCM. Productos teñidos con bromuro de etidio. Electroforesis en agarosa al 2%.

2a. Variedad con esclerosis nodular.

En esta variedad todos los casos fueron positivos para la determinación de LMP-1, lo que se corrobora la presencia del VEB y hubo ausencia de expresión de miR-BART-16 en 8/10 casos, para miR-BART-22 en 7/10 casos y en miR-BART-5 sólo en 1/10 casos. Tabla 2

MARCADOR	PRESENTES		AUSENTES	
	LMP-1	10	100%	-
miR-BART-16	2	20%	8	80%
miR-BART-5	9	90%	1	10%
miR-BART-22	3	30%	7	70%

Tabla 2. Expresión de LMP-1 y de los miR-BARTs -16, -5 y -22 en los casos de LHCEN.

2b. Variedad celular mixta.

Sólo un caso de los 10 fue negativo para la determinación de LMP-1, el miR-BART-16 estuvo ausente en 9/10 casos, el miR-BART-5 estuvo negativo en 1/10 casos y el miR-BART-22 en 6/10 casos, como se puede ver en (Tabla 3).

MARCADOR	PRESENTES		AUSENTES	
	LMP-1	9	90%	1
miR-BART-16	1	10%	9	90%
miR-BART-5	9	90%	1	10%
miR-BART-22	4	40%	6	60%

Tabla 3. Expresión de LMP-1 y los miR-BARTs específicos para VEB -16,-5 y -22 en los casos de LHCCM.

2c. Variedad rica en linfocitos.

Esta variedad histológica es poco frecuente en la edad pediátrica, sólo se contó con un caso el cual sólo fue positivo para determinación de LMP-1, los tres miR-BARTs específicos para VEB fueron negativos (Tabla 4)

MARCADOR	PRESENTES		AUSENTES	
	LMP-1	1	100%	-
miR-BART-16	-	-	1	100%
miR-BART-5	-	-	1	100%
miR-BART-22	-	-	1	100%

Tabla 4. Expresión de LMP-1 y los miR-BARTs -16, -5 y -22 en LHRL

2d. Variedad depleción linfocitaria.

En este grupo 1/3 casos no expresó LMP-1, el miR-BART-16 estuvo ausente en los tres casos, 1/3 casos no expresó miR-BART-5 y 2 /3 de miR-BART-22 (Tabla 5).

TIPO	PRESENTES		AUSENTES	
	Casos	Porcentaje	Casos	Porcentaje
LMP-1	2	67%	1	33%
MiR-BART-16	-	-	3	100%
miR-BART-5	2	67%	1	33%
miR-BART-22	1	33%	2	67%

Tabla 5. Expresión de LMP-1 y los miR-BARTs -16, -5 y -22 de LHCDL

3. Expresión de CD68.

Debido a que la expresión de CD68 fue muy variante aún entre un mismo grupo y entre los diferentes tipos histológicos (Figura 4), el análisis de la expresión de CD68 se realizó clasificando los casos en cuanto al número de células positivas a este marcador. Este fue el criterio de clasificación:

- 1.- 50 a 100 células positivas (Figura 4A),
- 2.-101 a 150 células (Figura 4B),
- 3.-151 células o más (Figura 4C)

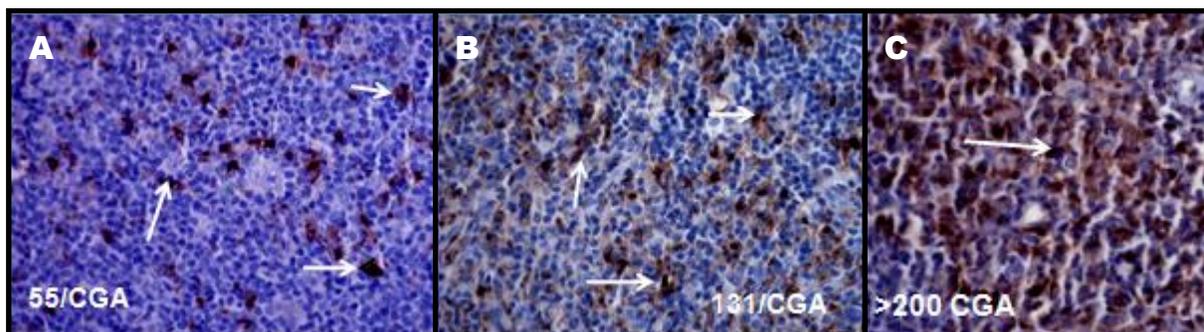


Figura 4. Inmunohistoquímica del marcador CD68, el cual es positivo en el citoplasma de los macrófagos y su variación en la expresión entre diferentes variedades histológicas del LHC. Aumento 40 X.

Los resultados obtenidos mostraron un promedio entre 151 a 200 macrófagos en el fondo celular acompañante de la célula de Reed-Sternberg en LHCEN, LHCCM y LHCDL. En la variedad LHCDL se observaron de 50 a 100 macrófagos

en promedio. Se realizó una comparación entre la expresión de CD68 y los casos con recaída y muerte, los cuales pertenecían al grupo de LHCCM, 2 de los 10 casos tuvieron recaída de la enfermedad y 1 de estos falleció. En estos casos se observó que el número de macrófagos por campo de gran aumento era en promedio de 150 a 200. En las demás variedades histológicas no se observaron datos importantes.

EL análisis de expresión de CD68 en cada variedad histológica se ilustra en la Tabla 6.

Variedad histológica	50-100	101-150	>151
LHCEN	2 (20%)	2 (20%)	6 (60%)
LHCCM	2 (20%)	3 (30%)	5 (50%)
LHCRL	-	-	1 (100%)
LHCDL	2 (67%)	-	1 (33%)

Tabla 6. Distribución de la expresión de CD68 en los casos con LHC según la variedad histológica.

DISCUSION:

La evaluación de la expresión tanto de los miR-BARTs como del marcador CD 68 son importantes porque permiten evaluar de manera indirecta tanto la regulación de la traducción de un gran número de diferentes genes en la célula B normal del centro germinal, que favorecen el desarrollo del linfoma de Hodgkin, como la adquisición de propiedades antiapoptosicas de la célula de RS, y con ello el favorecimiento de su supervivencia en el entorno celular mixto en el que se incluye al macrófago.

Primeramente hay correspondencia en el predominio de las variedades histológicas observadas en la edad pediátrica por el presente estudio y según lo referido por la Organización Mundial de la Salud, ocupando el primer lugar la variedad Esclerosis nodular (60%) seguido de Celularidad mixta (35%).

La proteína producida por el VEB en la infección latente, LMP-1 está implicada como factor oncogénico principal en neoplasias sólidas y linfoides; y como ya se mencionó, se expresó en la mayoría de los casos (22/24 casos), lo cual verifica la hipótesis de su implicación en la génesis del linfoma de Hodgkin en casos pediátricos en México.

El método utilizado comúnmente en el HIM para corroborar la presencia del VEB en los casos de Linfoma de Hodgkin Clásico es la expresión de la proteína LMP-1 mediante inmunohistoquímica: hubo expresión positiva en 22 de los 24 casos y en los dos casos negativos, se observó positividad para algún miR-BART. Estos resultados sencillamente verifican que la presencia del virus fue en el 100% de los casos. Con este resultado se confirma que la determinación de miR-BARTs es una prueba más sensible y específica para corroborar la presencia de infección por el VEB. Por ejemplo, se podría establecer la determinación del miR-BART-5 como una prueba específica, y sensible a la presencia del VEB, ya que el 83% de los casos lo expresaron.

Se han realizado análisis del perfil de expresión de los miRNAs en las células neoplásicas y han revelado que la desregulación de estas moléculas es frecuente en una amplia variedad de tumores, codificando y afectando estos miRNAs varias rutas clave involucradas en el crecimiento celular y en la apoptosis. Los miRNAs tienen varias características que los hacen una opción atractiva para los virus en la regulación de la expresión genética. La primera es su tamaño que les permite estar fácilmente codificados en el genoma viral, otra característica importante es que los miRNAs no son inmunogénicos, otra característica es que pueden almacenarse y permanecer latentes también ¹⁵⁻¹⁶.

En cuanto a las expresiones de los miR-BARTs y su correlación con los mecanismos oncogénicos, se observó que el miR-BART-16 conocido por su papel en la regulación negativa de la expresión de la proteína LMP-1, y el miR-BART-22 con la proteína de latencia LMP2-A y de forma indirecta con LMP-1; están implicadas en el inicio de la transformación tumoral e inhibición de la muerte celular. Aunque se refiere el papel regulador directo entre LMP-1 y miR-BART 16, se encontró un patrón de expresión casi constante de la LMP-1, (22/24), con ausencia de expresión del miR-BART-16, lo que apoya la hipótesis descrita en el carcinoma nasofaríngeo sobre su regulación negativa ¹⁶; Sin embargo, no se observó la expresión del miR-BART-16 en los casos negativos a LMP-1. Esto abre la posibilidad de que seguramente otros mecanismos moleculares pueden estar operando en la regulación negativa de la LMP-1, en la que otros miR-BARTs u otros genes celulares estén participando de manera individual y/o asociada. Esto al menos se ha planteado en carcinomas nasofaríngeos: entre éstos se encuentra al miR-BART-17, el cual no se incluyó en este estudio y también se han descrito estas interacciones por vía indirecta del miR-BART-22. Esto parece suceder en uno de los casos estudiados.

La mayoría de los casos fueron positivos al miR-BART 5, (20/24) lo que confirma la actividad antiapoptótica del virus, vía este miR-BART en el Linfoma de Hodgkin Clásico en todas sus variedades histológicas, favoreciendo la supervivencia de la célula neoplásica. Este representa un punto de terapia genética, utilizando

antagonistas de miR-BART-5 en los casos con LHC pediátricos. Este efecto permitiría la degradación del miR-BART-5 y la activación de las vías y muerte apoptósica.

Se observó una diferencia muy clara en el subtipo rico en linfocitos, en el cual no se expresó ninguno de los micro RNAs específicos del VEB, aunque cabe resaltar que sólo se incluyó un solo caso, por lo poco frecuente de este tipo de linfoma en la edad pediátrica.

Con estos resultados se puede observar la complejidad de interacciones moleculares que conllevan a la expresión o su ausencia de moléculas, consideradas como oncogénicas y producidas por el virus, lo cual ayuda a comprender el por qué no todos los pacientes infectados por el VEB o bien no son detectados, o no desarrollan una neoplasia. Quedan aún sin conocerse otros factores moleculares del huésped, como el gen PUMA, Bcl-2, otros miR-BARTs implicados en regular LMP-1 como el miR-BART 17.

En cuanto a la cuantificación del número de macrófagos y su asociación con mal pronóstico, hubo una correlación con lo observado por C. Steidl, y col. (2010): de los casos estudiados dos tuvieron recaída y uno falleció; esto es importante ya que la decisión inicial y la clasificación en términos de riesgo para los pacientes con Linfoma de Hodgkin clásico están basados en variables clínicas como el estadio y la presencia o ausencia de síntomas B. Aún en la actualidad, con el uso de quimioterapia y radioterapia se ha observado fracaso en el tratamiento en un 20% de los pacientes, es por esto que se requiere identificar algún marcador biológico relacionado a la falla o recaídas para predecir con la mejor precisión el pronóstico del paciente al momento del diagnóstico.

CONCLUSIONES:

De los resultados obtenidos se puede concluir que:

1. Se corroboró la presencia de VEB en el 100% de los casos mediante el uso del marcador de LMP-1 y la expresión de los miR-BARTs específicos del VEB.
2. Hay una franca asociación entre el LHC y el VEB, lo que sugiere que tiene un papel importante en el proceso de la patogénesis de este linfoma en niños.
3. La mayoría de los casos expresaron la proteína LMP-1, implicada en la linfomagénesis, 22/24 casos.
4. La ausencia de expresión de la proteína LMP-1 (2/24 casos), corrobora la presencia de otros mecanismos oncogénicos en el desarrollo del Linfoma de Hodgkin en estos casos
5. En (20/24 casos) expresaron el miR-BART 5 implicado en favorecer la supervivencia de la célula tumoral.
- 6.- Si bien la expresión de PCR de EBER considerado el estándar de oro corrobora la presencia de VEB, no refleja el estado del virus; funcionalmente activo, o en la fase considerada como latente o "inactiva".

EXPECTATIVAS.

Los resultados obtenidos corroboran la “funcionalidad” del virus en los principales mecanismos implicados en el desarrollo de neoplasias como lo es la regulación de la oncoproteína LMP-1 y la inhibición de la apoptosis; sin embargo es necesario corroborar los genes blanco y otras proteínas que interactúen con estos mismos miR-BARTs ya conocidos estudiando los miR-BARTs-17, -16 y -22, así como las proteínas LMP2-A, bcl-2, PUMA y bax.

CONSIDERACIONES ETICAS

El presente estudio se realizará apegado a lo descrito en el Reglamento de la Ley General de Salud en Material de Investigación para la Salud.

En base a lo establecido en el Titulo segundo, Capitulo I, Artículo 17, Sección I, la presente investigación no tiene riesgo, por lo que no requiere consentimiento informado.

Se omitirá el nombre de los pacientes incluidos en el estudio así como los médicos involucrados en los procedimientos diagnósticos y quirúrgicos.

CRONOGRAMA DE ACTIVIDADES.

FECHA	ACTIVIDAD
NOVIEMBRE-2010	Recolección de los casos y datos clínico-patológicos durante 8 años: 2000-2008.
DICIEMBRE-2010	Recolección de las laminillas y bloques de parafina de los casos con linfoma de Hodgkin (LH)
ENERO-2011	Obtención de cortes en parafina de cada caso con LH
FEBRERO-2011	Solicitud de estudio de inmunohistoquímica CD 68
MARZO-2011	Extracción de miR-BARTs en cada muestra de LH
ABRIL-2011	Amplificación de los miR-BARTs -22, -16, -17 y -5 de los casos.
MAYO-2011	Revelado de resultados experimentalmente
JUNIO-2011	Cuantificación de niveles de expresión tanto de BiR-BARTs como de CD68
JUNIO-2011	Comparación con los datos clínico-patológicos
JUNIO-2011	Análisis estadístico
JULIO-2011	Entrega de informe final

BIBLIOGRAFIA

1. Lara-Torres C, Ortiz-Hidalgo C. Diagnóstico histopatológico e inmunohistoquímico del linfoma de Hodgkin y su diagnóstico diferencial. *Patología* 2009; 47:35-45.
2. Wilks S. Unpublished papers of Thomas Hodgkin. *Bull N Y Acad Med* 1970;46:67-9.
3. Kass EH, Bartlett AH. Thomas Hodgkin, M. D. (1798-1866): an annotated bibliography. *Bull Hist Med* 1969; 43:138-75.
4. Stein H, Delsol G, Weiss LM, Popema S, Jaffe ES. Classical Hodgkin lymphoma. Introduction in: Swerldow SH, Campo E, Harris NL, Jaffe ES, et al. *World Health Organization Classification of Tumors: Pathology and Genetics of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissue* IARC, Lyon, 2008; pp 326-9.
5. Diehl V. Hodgkin's disease: from pathology specimen to cure. *N Engl J Med* 2007;357:1968-1970.
6. Nathan D, Orkin S, Nathan and Oskis. *Haematology of Infancy and Childhood*. 2003; 1:1123:1344.
7. Butler JJ. The histological diagnosis of Hodgkin's disease. *Sem Diag Pathol* 1992; 9:252-256.
8. Reed DM. On the pathological changes in Hodgkin disease, with especial reference to its relation to tuberculosis. *Johns Hopkins Hosp Rep* 1902; 133-196.
9. Schmitz KR, Distler V, Renné C, Hansmann ML. Pathogenesis of Hodgkin's Lymphoma. *Eur J Haematol* 2005;75;26-33
10. Pilieri SA, Ascani S, Leoncini L, et al. Hodgkin's Lymphoma the pathologist's viewpoint. *J Clin Path* 2002;55:162-176

11. Mani H, Jaffe ES. Hodgkin Lymphoma: An Update on its biology with new insights into classification. *Clinical Lymphoma and myeloma*. 2009; 9: 206-216.
12. Rickinson AB, Kieff E. Epstein-Barr virus and its replication. En: Knipe DM, Howley PM, Griffin DE, Lamb RA, Martin MA, Roizman B, Straus SE, eds. *Fields Virology*. Philadelphia, PA: Lipincott Williams & Wilkins; 2001. P. 2576
13. Gulley ML. Molecular diagnosis of Epstein-Barr virus related diseases, *J Mol Diag* 2001; 3:1-9.
14. Seto E, Moosman A, Walz N. Micro RNAs of Epstein-Barr virus promote cell cycle progression and prevent apoptosis of primary human B cells. *Plos Pathogens* 2010;6:1-16.
15. Wai-Ming R, Hung-Man J, Sung YM, Sing P, Chi- Heng D. Modulation of LMP 2 expression by a newly identified Epstein-Barr virus encoded MicroRNA miR-BART 22. *Neoplasia*, 2009; 11:1174-1184.
16. Yun Zhu J, Pfuhl T, Motsch N, Barth S, Nicholls J. Identification of Novel Epstein-Barr virus MicroRNA genes from Nasopharyngeal carcinomas. *J Virol* 2009; 83:3333-3341.
17. Navarro A, Gaya A, Martínez A, Pons A. MicroRNA expression profiling in classic Hodgkin lymphoma. *Blood* 2008; 111:2825-2832.
18. Steidl C, Tang L, Sohrab P, Guangming H. Tumor-Associated Macrophages and Survival in Classic Hodgkin's Lymphoma. *New Engl J Med* 2010; 362:875-885.
19. Farinha P, Masoudi H, Skinnider BF. Analysis of multiple biomarkers shows that lymphoma-associated macrophage (LAM) content is an independent predictor of survival in follicular lymphoma. *Blood* 2005; 106:2169-2174.

20. Mantovani A, Sozzani S, Locati M, Allavena P. Macrophage polarization:tumor-associated macrophages as a paradigm for polarized M2 mononuclear phagocytes. *Trends Immunolo* 2002; 23:549-555.
21. Holness CL, Simmons DL. Molecular cloning of CD68, a human macrophage marker related to lysosomal glycoproteins. *Blood*, 1993; 81:1607-1613.