



UNIVERSIDAD
NACIONAL
DE COLOMBIA

Linfoma de Burkitt: Características clínicas, patológicas y moleculares en población pediátrica.

Karen Tatiana Galvis Castro

Universidad Nacional de Colombia
Facultad de Medicina, Departamento de Patología
Especialidad en Patología Anatómica y Clínica
Bogotá D.C., Colombia

2016

**Linfoma de Burkitt:
Características clínicas, patológicas y
moleculares en población pediátrica
atendida en la fundación HOMI en el periodo
de 2003-2013**

Karen Tatiana Galvis Castro

Trabajo de investigación presentado como requisito parcial para optar al título de:
Especialista en Patología Anatómica y Clínica

Dirigido por:

Doctor, Rafael Enrique Andrade Pérez

Doctora, Lina Eugenia Jaramillo Barberi

Universidad Nacional de Colombia
Facultad de Medicina, Departamento de Patología
Especialidad en Patología Anatómica y Clínica
Bogotá D.C., Colombia

2016

Agradecimientos

Al Servicio de Oncohematología Pediátrica y al Servicio Patología de la Fundación HOMI Hospital de la Misericordia quienes diagnosticaron y trataron a los pacientes que fueron considerados para la ejecución de este estudio.

A la sección de Biología Molecular e Inmunohistoquímica del Departamento de Patología y Laboratorio Clínico de la Fundación Santa Fe de Bogotá, en especial a Adriana Plata, Microbióloga quienes hicieron el montaje de los casos analizados y prestaron toda su colaboración para la lectura e interpretación.

A mis directores Dra Lina Jaramillo y Dr Rafael Andrade, quienes con sus conocimientos, orientación y motivación permitieron llevar a término este trabajo. Para ellos mi lealtad y admiración.

A Anne Marie Senz y a Maria Mercedes Torres, PhD. ya que su participación fue fundamental para la culminación de este trabajo.

Karen Tatiana Galvis Castro MD

Resumen

Objetivo: Caracterizar la población pediátrica con Linfoma de Burkitt diagnosticado en un centro de referencia nacional. **Metodología:** Estudio retrospectivo que incluyó 58 casos de LB pediátrico diagnosticados en el periodo 2003-2013 en el Hospital Fundación La Misericordia. Se analizaron las características clínico-patológicas y mediante el uso de microarreglos tisulares se hicieron estudios de IHQ, determinación de EBV por hibridación in situ para EBER-1 y de translocación del oncogén MYC mediante FISH-sonda break apart. **Resultados:** Predominio del género masculino (2,6:1), con edad media de 6,3 años. La localización más frecuente fue extranodal (51/58), 94,4% de ellos en abdomen y 7 casos tenían compromiso de huesos faciales; el compromiso nodal fue observado en el 8,6% de los casos (5/58) y en 2 pacientes hubo compromiso nodal y extranodal. Se diagnosticó en su mayoría en estadios avanzados (III-IV, 72%), con una remisión del 74% y mortalidad del 16%. Las muertes y recaídas se presentaron en el primer año y se asociaron al género masculino, infiltración a SNC y/o MO y estadio avanzado. En dos casos los hallazgos morfológicos, de inmunofenotipo y ausencia de rearrreglos del gen MYC excluyeron el diagnóstico de LB. La presencia de RNA viral fue encontrada en 29/40 casos (72,5%) mostrando asociación con una menor edad ($p < 0.05$). Se identificó translocación del MYC en el 21/24 casos (87%). Entre los casos sin translocación del MYC uno presentó características morfológicas e inmunofenotípicas concordantes con LB pero sin translocación del gen MYC. **Conclusión:** Este estudio extiende el conocimiento actual de los linfomas B agresivos en población pediátrica Colombiana. Ofrece información detallada de las características del Linfoma de Burkitt pediátrico, no antes . descritas. Los resultados permiten sugerir que el LB en población pediátrica exhibe características intermedias entre la forma endémica y esporádica.

Palabras clave: Palabras clave: Linfoma de Burkitt, EBV, Virus de Epstein-Barr, Genes myc.

Abstract

Objective: To compare the pediatric population with Burkitt's lymphoma diagnosed in a reference national center. **Methodology:** Retrospective study of 58 cases of childhood Burkitt's lymphoma diagnosed during 2003-2013 at the Hospital Fundacion La Misericordia. Clinicopathological features were analyzed. Using tissue microarrays (TMA) IHQ studies were conducted and searching of EBV through in situ hybridization to EBER1 and MYC translocation evaluated by FISH, break apart probe. **Results:** Predominantly male (2,6:1), with a media age of 6,3 years to the diagnosis. The most frequently involved localization were the extranodal sites (51/58), 94,4% Infiltrates were confirmed in the abdomen and in 7 cases facial bones were affected. In 8,6% of the cases (5/58) nodal involvement was detected and in only 2 patients there were both nodal and extra-nodal. It was mainly diagnosed in advance stages (III-IV, 72%), with a remission that top 74% and 16% mortality. Deaths and relapses occurred during the first year and they were associated with the male gender, infiltration to CNS and/or BM and advance stage. In two cases the morphological findings, immunophenotype and absence of rearrangements of MYC gene ruled out the BL diagnosis. The viral RNA presence was found in 29/40 of the cases (72,5%) and was associated with a younger age ($p < 0.05$). In 21/24 cases (87%) there was MYC translocation. Among those cases without MYC translocation, one presented morphological and immunophenotype characteristics in accordance to BL but without the gene MYC translocation. **Conclusion:** This is an extensive study of the current knowledge about aggressive type B lymphomas in the Colombian pediatric population. It provides detailed information about never before described Burkitt's lymphoma's characteristics. The data suggest that the BL in a pediatric population showcases intermediate characteristics between an endemic and sporadic form.

Keywords: Burkitt lymphoma, EBV, Burkitt barr virus infections, Burkitt lymphoma, c-Myc.

Contenido

	Pág.
Resumen	VII
Abstract	VIII
Lista de figuras	XI
Lista de tablas	XII
Lista de gráficas	XIII
Lista de abreviaturas	XIV
Introducción	1
1. Justificación	3
2. Objetivos	7
2.1 Objetivo general	7
2.2 Objetivos específicos	7
3. Marco teórico	8
3.1 Perspectiva Histórica.....	8
3.2 Definición.....	9
3.3 Clasificación del Linfoma de Burkitt	10
3.4 Manifestaciones Clínicas.....	12
3.5 Epidemiología.....	13
3.6 Diagnóstico.....	14
3.6.1 Morfología	14
3.6.2 Inmunofenotipo	16
3.6.3 Genética.....	17
3.6.4 Microarreglos de expresión.....	20
3.7 Pronóstico	21
3.8 Etiopatogenia	23
4. Materiales y Métodos	44
4.1 Tipo de Estudio	44
4.2 Diseño	44
4.3 Población a estudio	44
4.4 Variables	44
4.5 Procedimiento	46
4.5.1 Fase I. Identificación de Casos.....	46

4.5.2 Fase II. Recolección de datos e Instrumento para la recolección	46
4.5.3 Fase III. Evaluación y Selección de material.	47
4.5.4 Fase IV. Construcción de Microarreglos de Tejido.....	47
4.5.5 Fase V. Inmunohistoquímica	48
4.5.6 Fase VI. Hibridación <i>in situ fluorescente</i> (FISH) para el gen MYC.....	49
4.5.7 Fase VII. Hibridación <i>in situ</i> (ISH) para identificación de EBER.....	51
4.6 Análisis Estadístico	53
4.7 Posibles dificultades y fuentes de error.	53
5. Cronograma de Actividades	55
6. Consideraciones éticas.....	56
7. Resultados.....	57
7.1 Características Clínicas	58
7.2 Características Morfológicas e Inmunofenotipo	68
7.3 Características Moleculares.....	73
7.3.1 MYC.....	74
7.3.2 Epstein Barr Virus.....	79
8. Discusión.....	86
9. Conclusiones y recomendaciones.....	103
Anexo A: Instrumento para la recolección de datos.....	107
Anexo B: Mapa de Microarreglos tisulares (TMA).....	115
Bibliografía	117

Lista de figuras

	Pág.
<i>Figura 1.</i> Rearreglo Cromosómico MYC – IGH en Linfoma de Burkitt.	20
<i>Figura 2.</i> Interacción del EBV y hospedero.	27
<i>Figura 3.</i> Curva Serológica en infección por EBV.....	39
<i>Figura 4.</i> Sonda Break apart. Representación esquemática de las características de la sonda Break apart.....	51
<i>Figura 5.</i> Flujoograma de trabajo.....	54
<i>Figura 6.</i> Caso 43, Hallazgos morfológicos y de inmunofenotipo A. H&E 40x B. H&E 400x. C. CD20; D. Ki67; E. Bcl2; F. CD10; G. Bcl6; H. Tdt.	71
<i>Figura 7.</i> Resultados de técnicas de hibridación in situ para MYC y EBER.	73
<i>Figura 8.</i> Caso 54. Análisis de FISH para detectar translocación de gen MYC. Resultado insatisfactorio, células tumorales sin hibridación (Vysis LSI MYC Dual Color Break Apart, 1000x).	75
<i>Figura 9.</i> Caso 33. Análisis de FISH para detectar translocación de gen MYC. Resultado positivo, células tumorales con rearrreglos de MYC mostrando una señal de fusión amarilla, una señal roja y una verde (Vysis LSI MYC Dual Color Break Apart, 1000x)....	76
<i>Figura 10.</i> Caso 40, A. Análisis de FISH para detectar translocación de gen MYC. Resultado negativo , células tumorales sin rearrreglos de MYC mostrando dos señales de fusión amarilla (Vysis LSI MYC Dual Color Break Apart, 1000x). B. Hallazgos morfológicos en H&E 400x; C. CD79 positivo; D. Ki67% del 95%; E. Bcl2 negativo; F. Bcl6 positivo.....	77
<i>Figura 11.</i> Resultados de Hibridación in situ para EBER-1. A. caso negativo; B. caso positivo difuso. C. Caso positivo focal. (EBER-1 DNP probe, 40x)	81

Lista de tablas

	Pág.
Tabla 1	
<i>Clasificación por estadios de Ann Arbor.....</i>	22
Tabla 2	
<i>Sistema de estatificación St Jude/Murphy.....</i>	22
Tabla 3	
<i>Programas de Latencia y Neoplasias asociadas.....</i>	31
Tabla 4	
<i>Definición de Variables.....</i>	45
Tabla 5	
<i>Cronograma de actividades.....</i>	55
Tabla 6	
<i>Diagnóstico Histopatológico de casos incluidos en el estudio.....</i>	57
Tabla 7	
<i>Características Clinicopatológicas de la Población estudiada.....</i>	66
Tabla 8	
<i>Características morfológicas e inmunofenotípicas de casos con estudios de hibridación.</i>	78
Tabla 9	
<i>Análisis Bivariado de EBER y características clínicas.....</i>	82

Lista de gráficas

	Pág.
<i>Gráfica 1.</i> Características demograficas. A, Distribción según grupos de edad. B, Genero y edad.	58
<i>Gráfica 2.</i> Distribución de nuevos casos diagnosticados entre 2003-2013 en el Hospital HOMI.....	59
<i>Gráfica 3.</i> Localización tumoral y Edad de presentación.....	60
<i>Gráfica 4.</i> Características clínicas. A. Distribución del sitio anatómico de presentación. B, Presentación extranodal y compromiso de huesos faciales.....	62
<i>Gráfica 5.</i> Características clínicas. Localización extranodal.....	62
<i>Gráfica 6.</i> Análisis de Estadio Tumoral.....	63
<i>Gráfica 7.</i> Análisis de Desenlace en casos estudiados.	65
<i>Gráfica 8.</i> Características inmunofenóticas de casos estudiados.....	70
<i>Gráfica 9.</i> Análisis de casos con resultados satisfactorios e insatisfactorios para MYC y su distribución en el tiempo.	74
<i>Gráfica 10.</i> Análisis de resultados de hibridación in situ para EBER1. A. Relación entre edad y positividad o negatividad para EBER. B. Relación entre resultados serológicos para anti VCA-EBV e hibridación in situ para EBER1.	81
<i>Gráfica 11.</i> Análisis de resultados para EBER1 entre casos con rearrreglos y sin rearrreglos del gen MYC.	83
<i>Gráfica 12.</i> Distribución y características clínicas de casos analizados en población entre las diferentes regiones del país.	85

Lista de abreviaturas

Abreviaturas

Abreviatura	Término
--------------------	----------------

<i>LB</i>	Linfoma de Burkitt
<i>Igs</i>	Inmunoglobulinas
<i>NOS</i>	No especificado
<i>SNC</i>	Sistema Nervioso Central
<i>IHQ</i>	Inmunohistoquímica
<i>TMA</i>	Microarreglos tisulares
<i>EBV</i>	Virus Epstein Barr
<i>H&E</i>	Hematoxilina y eosina
<i>BAP</i>	Break apart
<i>VCA</i>	Antígeno de cápside viral
<i>TI</i>	Tasa de incidencia
<i>LH</i>	Linfoma Hodgkin
<i>LNH</i>	Linfoma No Hodgkin
<i>CNS</i>	Central nervous system
<i>BM</i>	Bone marrow
<i>BL</i>	Burkitt lymphoma

Introducción

El Linfoma de Burkitt (LB) es una neoplasia derivada de células B centro germinales, caracterizada por su alta agresividad y rápido crecimiento. Descrita hace más de 50 años por el cirujano Irlandés Denis Burkitt, es una entidad potencialmente curable pero con frecuencia diagnosticada en estadios avanzados y cuya población afectada es principalmente pediátrica. Presenta características clínicas y epidemiológicas heterogéneas, mostrando variaciones a lo largo de diferentes regiones geográficas, lo cual ha permitido clasificarla por la OMS en LB Endémico, LB Esporádico y LB asociado a Inmunodeficiencia. Su diagnóstico requiere la combinación de parámetros morfológicos, inmunofenotípicos y genéticos.

La identificación del LB ha generado numerosas contribuciones en el campo de la hematología y oncología, dando lugar al reconocimiento de la relación causal con procesos infecciosos, en este caso del virus de Epstein-Barr (EBV), así como la participación de translocaciones cromosómica en la carcinogénesis. No obstante, el entendimiento de los mecanismos moleculares de la enfermedad son aún un paradigma y por lo tanto blanco de numerosas investigaciones.

Esta neoplasia que compromete el linaje de células B, se asocia de forma característica pero no específica a la translocación del oncogén *MYC*. De hecho, aunque está presente en todas las variantes de LB, no es suficiente para explicar el comportamiento del tumor. Por otro lado, la contribución del virus EBV en la patogénesis del LB es de igual modo enigmática. Aunque es reconocido como carcinógeno clase I, la relación causal con el LB es mucho más compleja, no solo por su ubicuidad en la población humana, sino que probablemente la infección crónica latente no sea necesaria para el desarrollo de LB,

apoyado en la identificación de material genético viral en una menor proporción de casos esporádicos y asociados a VIH, así como su variación geográfica.

Se examinará las características clínicas, epidemiológicas y patológicas del Linfoma de Burkitt en población pediátrica, especialmente el comportamiento de la infección latente por EBV, mediante el uso de hibridación in situ para la identificación de RNA no codificantes, EBER 1. Dicha metodología ha sido considerada de elección para el estudio de infección latente. También se confirmará la presencia de la translocación del oncogén *c-myc*, como evento temprano y primario en la oncogénesis del LB, mediante el uso de sondas break apart que permiten identificar rearrreglos cromosómicos que involucren el gen *MYC* en el cromosoma 8q24, con detección de t(2;8), t(8;22) o t(8;14).

Estas observaciones ofrecerán un mejor entendimiento de la enfermedad y en especial la caracterización de esta entidad en población pediátrica colombiana como primer y único estudio en este campo. Además, con nuestros resultados, se construirá una base de datos que permita la realización de futuros trabajos de investigación en Linfoma de Burkitt, entidad de creciente interés y de la cual aún queda mucho por entender.

1. Justificación

En América Latina, el cáncer infantil representa un problema de salud pública, con más de 17.0000 nuevos casos diagnosticados cada año y más de 8000 muertes registradas debido a esta enfermedad. Estadísticas nacionales muestran que el cáncer infantil ocupa el segundo lugar como causa de muerte en niños y adolescentes entre 2 a 19 años, siendo los Linfomas la tercera neoplasia en frecuencia (Bravo LE et al, 2013). Este último patrón de ocurrencia es similar a lo reportado en Norte América y Europa, no obstante en países de Sur América, especialmente Brasil, una alta incidencia de Linfomas sobre los tumores del SNC, llevan a este grupo de neoplasias al segundo lugar en frecuencia.

Aunque algunas características relacionadas con la incidencia puedan ser comparables con las descritas en otros países, la supervivencia es menor en países en vía de desarrollo como el nuestro. Siendo en parte la carencia de información, diagnóstico tardío, acceso limitado a tratamientos y sistemas de salud no favorables, los principales factores que impactan en el desenlace de este grupo de enfermedades.

La epidemiología del Linfoma de Burkitt resalta por las grandes diferencias encontradas de acuerdo a la región geográfica. En África ecuatorial, corresponde a la neoplasia endémica con una TI de 34,4 por millón por año (Uganda, 1991-1997. Orem et al, 2007). Esto comparado con un TI de 0,6 reportado en Americanos Afrodescendientes (SEER 1983-1992). En Europa de 2,0, correspondiendo a cerca del 6-15% de todos los Linfomas (Cardy et al, 2001). En Colombia con la excepción de Cali, en donde existe un registro poblacional de cáncer, el conocimiento del cáncer infantil es limitado. Basados en este registro el Linfoma de Burkitt fue reportado en la "*International Incidence of Childhood Cancer*", Vol II (Parkin et al, 1998) con una incidencia de 6.2, la más alta entre los países de América Central y América del Sur en menores de 15 años. Sin embargo en el reporte más reciente (Colombia, Cali. 1977-2011; Bravo LE et al, 2013) se observó un incremento de la TI a 7,2, siendo esta la más alta entre el grupo de linfomas durante los

últimos 40 años en Colombia.

Esta neoplasia caracterizada por su alta agresividad y rápido crecimiento es potencialmente curable, aunque con frecuencia diagnosticada en estadios avanzados. Además, por varias razones ha sido considerada un enigma en la investigación del cáncer, en parte por su particular distribución geográfica que se acompaña no solo por diferencias en su incidencia, sino por sus características clínicas y de forma relevante por su asociación con la infección por EBV. Esta compleja relación causal entre EBV y LB no ha sido aclarada luego de 40 años desde su descripción como carcinógeno y es desconocida en población colombiana.

Los primeros hallazgos en el entendimiento de la patogénesis del LB involucran la activación del oncogén MYC, un hallazgo molecular característico del LB e incluido en los parámetros diagnósticos según la OMS, 2008. En el LB, la t(8;14) (q24;q32) y sus variantes en donde se transloca el oncogén MYC a uno de los tres locus de la Inmunoglobulinas es considerado un marcador de la enfermedad y puede ser identificado por varias herramientas diagnósticas, entre estas el uso de métodos moleculares como hibridación in situ fluorescente (FISH).

La carencia de estudios propios que permitan definir cada una de estas características en población colombiana son evidentes, con búsquedas en bases de datos MEDLINE, LILACS y Embase que solo registran 5 artículos publicados, dos correspondiendo a pequeñas series de casos de LB con 6 y 18 casos publicados en 1966 y 1972 respectivamente. En ninguno con información sobre frecuencias de asociación con EBV, ni estudios que confirmen la presencia de la translocación del oncogén c-MYC como marcador de la enfermedad.

Abordar la situación actual del cáncer infantil en nuestro país implica conocer, entender y difundir los diferentes aspectos, en este caso relacionados con el Linfoma de Burkitt en población pediátrica. Por este motivo, se pretende realizar un estudio de serie de casos que permita identificar y analizar las características y probables diferencias del Linfoma de Burkitt en población colombiana, ofreciendo información que hasta el momento es insuficiente en nuestro medio. Este estudio contribuirá al conocimiento de las características epidemiológicas, clínicas, patológicas y moleculares del Linfoma de Burkitt en población pediátrica atendida en la fundación HOMI, centro de referencia nacional para el diagnóstico y tratamiento de cáncer en niños. El desarrollo de este trabajo, se

llevara a cabo en conjunto con el Laboratorio de Patología de la Fundación Santa fe de Bogotá, institución de alta complejidad que cuenta con tecnologías especializadas, equipos de última generación y estándares de alta calidad que permiten garantizar el adecuado desarrollo y desempeño de cada estudio. Además, a partir de los resultados arrojados por la investigación, se construirá una base de datos que permita la realización de futuros trabajos de investigación en Linfoma de Burkitt, entidad de creciente interés y de la cual aún queda mucho por entender.

2. Objetivos

2.1 Objetivo general

Determinar las características clínicas, patológicas y moleculares del Linfoma de Burkitt en población pediátrica diagnosticada en el Hospital Fundación de la Misericordia durante el periodo 2003- 2013.

2.2 Objetivos específicos

- Describir las características clínicas de pacientes pediátricos diagnosticados con Linfoma de Burkitt en la Fundación HOMI para el periodo 2003 – 2013, definiendo su frecuencia, compromiso anatómico, estadio tumoral, infiltración de SNC y médula ósea, así como desenlace.
- Construir microarreglos tisulares (TMA) a partir de la selección de tejidos tumorales embebidos en parafina de pacientes con diagnóstico Linfoma de Burkitt.
- Describir las características morfológicas e inmunofenotípicas de casos con diagnóstico de Linfoma de Burkitt.
- Establecer la frecuencia de infección latente por EBV en casos de Linfoma de Burkitt mediante el uso de técnicas de Hibridación *in situ* (ISH) en TMA y determinar sus posibles asociaciones clínico-patológicas.
- Identificar la presencia de translocación del oncogén *c-MYC* en tejidos tumorales de pacientes diagnosticados con Linfoma de Burkitt a través de técnicas de Hibridación *in situ fluorescente* (FISH) en TMA.
- Construir una base de datos de casos de Linfoma de Burkitt pediátrico como herramienta para estudios futuros

3. Marco teórico

3.1 Perspectiva Histórica

El Linfoma de Burkitt ha tenido un importante papel en el entendimiento de los procesos carcinogénicos. Numerosas contribuciones en el campo de la hematología y oncología se han hecho gracias a las investigaciones desarrolladas en búsqueda de la comprensión de esta patología. Sus observaciones clínicas promovieron el desarrollo de la inmunoterapia del cáncer y sus exploraciones geográficas mostraron una importante relación causal con procesos infecciosos. El Linfoma de Burkitt fue el primer tumor asociado con virus (Epstein 1964), uno de los primeros en los cuales se encontró translocación cromosómica que activaba un oncogén (Zech 1976) y uno de los primeros linfomas reportado en asociación con la infección del VIH (Ziegler et al. 1982). Sin embargo, aunque nuevos mecanismos moleculares se han conocido, luego de 54 años desde su descripción, aun esta neoplasia sigue siendo un enigma.

La primera descripción de Linfoma de Burkitt fue probablemente hecha a principios del siglo 20 por Albert Cook, medico misionario en Uganda. Cook realizó una descripción detallada de uno de sus pacientes, un niño con una gran masa tumoral en mandíbula, cuya ilustración dejó pocas dudas de tratarse de un caso de Linfoma de Burkitt (Magrath 2012). Luego, numerosos patólogos europeos documentaron la alta frecuencia de los tumores de mandíbula en niños de África ecuatorial, pero fue Denis Burkitt, cirujano Irlandés, quien proporcionó la primera descripción clínica detallada del tumor. Burkitt, reporta una serie de 32 casos de niños de Uganda, que presentaban tumores de mandíbula o abdomen con rápido crecimiento, sugiriendo que las diferentes presentaciones clínicas podrían corresponder a una sola enfermedad, para el momento considerado como Sarcoma de células redondas (Burkitt 1958). En 1960 se confirma por

Davies y O'Connor que dicho tumor correspondía a una forma de linfoma y en 1963, Wright describe criterios citológicos que permitían diferenciarlo de otras formas de linfoma.

A inicios de la década de los 60, Denis Burkitt, Ted Williams y Cliff Nelson realizan un viaje de investigación de 16.000 kilómetros, visitando unos 60 hospitales en el Este y el Sur de África, allí evaluaron la distribución geográfica y la incidencia de Linfoma de Burkitt. Durante su viaje trazaron los límites de las zonas de alta incidencia y observaron que la presencia de esta neoplasia se correlacionaba con la misma temperatura y zonas de precipitaciones que las descritas para la malaria, sugiriendo que la aparición, de este tumor, estaba vinculada con la distribución de determinados insectos vectores (Chene, 2009).

Dalldorf y cols proponen que la malaria transmitida por Anopheles, podía ser el mejor candidato relacionado con la patogénesis de la enfermedad, ya que la distribución del Linfoma de Burkitt no solo correspondía a la distribución de la malaria, sino también a su intensidad (Magrath 2012). A su vez, Michael Antony Epstein, considera la posibilidad de un cáncer humano causado por virus, el cual era diseminado por un vector dependiente del clima. Usando Microscopia electrónica, a partir de una muestra proveniente de un paciente con Linfoma de Burkitt se identifica por primera vez, la presencia de un tipo inusual de herpes virus, el cual estaba presente solo en un pequeño porcentaje de células tumorales. En 1964, en colaboración con los virólogos Yvonne Barr, y Bert Achong, se logra el aislamiento e identificación del virus Epstein Barr cultivando células humanas de la línea linfocítica. (Epstein et al. 1964, Epstein 2012).

3.2 Definición

El Linfoma de Burkitt es una neoplasia que compromete el linaje de células B, caracterizado por su alta agresividad y rápido crecimiento. Se presenta de forma frecuente en sitios extraganglionares o como un cuadro de leucemia aguda. Está compuesto por células monomórficas transformadas de tamaño medio y se asocia de forma característica pero no específica a la translocación del oncogén *MYC*. Por lo tanto, un único parámetro no puede ser usado como estándar para el diagnóstico de Linfoma

de Burkitt, haciendo necesaria la combinación de varias herramientas diagnósticas (Swerdlow 2008).

3.3 Clasificación del Linfoma de Burkitt

La OMS Clasifica el Linfoma de Burkitt en tres variantes Clínicas:

Linfoma de Burkitt Endémico

Linfoma de Burkitt Esporádico

Linfoma de Burkitt relacionado a Inmunodeficiencia.

Siendo similares en morfología, inmunofenotipo y características genéticas, pero heterogéneos en presentación clínica, distribución geográfica y asociación con la infección por EBV. Para Bornkamm, no obstante estos términos son basados en aspectos epidemiológicos y no permite hacer predicciones para un caso individual.

- **LINFOMA DE BURKITT ENDÉMICO:** Esta variante ocurre en África ecuatorial y Papúa Nueva Guinea, su distribución corresponde a las áreas de malaria holoendémica y de la adquisición temprana del EBV. Todos los casos, con algunas excepciones, son positivos para EBV.

El pico de incidencia es de 4 a 7 años y el compromiso en hombres es más frecuente, en una relación 2:1. Se presentan en un alto porcentaje (50%) como masas en la mandíbula, orbita u otros huesos de la cara (Magrath 1991). El compromiso de órganos abdominales como íleon, ciego y/o el omento, así como gónadas, riñones, huesos largos, tiroides, glándulas salivares y glándulas mamarias puede presentarse con o sin compromiso de huesos faciales (Swerdlow 2008).

- **LINFOMA DE BURKITT ESPORÁDICO:** Esta variante es vista en todo el mundo, sin relaciones geográficas o climáticas específicas, afecta principalmente a niños y adultos jóvenes. La edad media de los pacientes adultos es de 30 años y en niños ocurre entre los 3 y 12 años (media 6-8años). Es 3.5 veces más común en niños que en niñas (Molyneux et al 2012). La incidencia en Europa y Norte América es baja,

representan el 1-2% de todos los linfomas en adultos y el 30-40% de Linfomas No Hodgkin en la infancia. Estudios muestran que aproximadamente 10 al 20% de los casos esporádicos son positivos para EBV (Magrath, 1991), con algunas variaciones dependiendo de la población en estudio. Por ejemplo en Sur América y Norte de África, ambas variantes esporádica y endémica son vistas (Swerdlow 2008) (Molyneux 2012) (Ferry 2006). Y algunos países en vía de desarrollo como Brasil y Egipto, han mostrado tasas intermedias de asociación con la infección por EBV, con hasta un 60-80% de positividad en casos de Linfoma de Burkitt “esporádico” (Klumb CE. et al. 2004) (Anwar N. et al. 1995).

En el LB esporádico, los tumores de mandíbula son raros y la presentación más común, son las masas abdominales (60-80%), especialmente de la región ileocecal. El siguiente sitio más común es en la cabeza y el cuello, comprometiendo área nasal, orofaringe, amígdalas o senos paranasales (Molyneux 2012). Similar al LB endémico, ovarios, riñones, y mamas están con frecuencia comprometidos. El compromiso de mamas, es usualmente bilateral y masivo, asociado con el inicio de la pubertad, el embarazo o la lactancia. El compromiso del anillo de Waldeyer y el mediastino es raro. La presentación con nódulos linfáticos es vista con más frecuencia en adultos que en niños. (Swerdlow 2008) (Ferry 2006). Aproximadamente el 20% de los pacientes, presentan infiltración de la medula ósea (Molyneux 2012).

- **LINFOMA DE BURKITT RELACIONADO CON INMUNODEFICIENCIA:** Esta variante es observada principalmente en asociación con la infección por el virus de la inmunodeficiencia humana y menos del 40% de los casos son asociados con EBV. Asociado a infección por VIH, se presenta cuando el conteo de CD4 es mayor a 200 células por microlitro (estadio temprano en la progresión de la infección por HIV) (Molyneux 2012). El diagnóstico de Linfoma de Burkitt en un individuo HIV positivo representa con frecuencia, el primer criterio de Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida (Ferry 2006).

En relación a otros estados de inmunodeficiencia, el Linfoma de Burkitt puede ocurrir en pacientes trasplantados y en individuos con inmunodeficiencias congénitas (Ferry 2006). En el primer grupo, se considera que el riesgo ocurre luego de un periodo relativamente

largo de post-trasplante (media de 4,5 años) y se asocian principalmente a trasplantes de órganos sólidos

3.4 Manifestaciones Clínicas

El compromiso extraganglionar, representa el principal sitio de localización del Linfoma de Burkitt, con variaciones de acuerdo al subtipo epidemiológico. Los pacientes con frecuencia, se presentan con una enfermedad voluminosa y una alta carga tumoral debido al corto tiempo de duplicación celular, siendo un gran número de casos diagnosticados en estadios avanzados, que con frecuencia comprometen la medula ósea (30-40%) y el SNC (15-20%) (Jones, 2010).

Los pacientes con Linfoma de Burkitt endémico, en su mayoría, presentan clínicamente edema periorbitario o mandibular con o sin compromiso abdominal. El 15 % puede cursar con paroplejia súbita e incontinencia, secundario al efecto compresivo de las masas retroperitoneales. Con frecuencia, estos pacientes se encuentran desnutridos en el momento del diagnóstico. Las masas abdominales, presentación más frecuente de los Linfomas Burkitt Esporádico, se manifiestan con síntomas que incluyen dolor abdominal, distensión, intususcepción, náuseas, vómito y sangrado gastrointestinal. Pueden cursar también con derrame pleural maligno o con ascitis (Molyneux 2012). Por otro lado, relacionado con la terapia, el síndrome de lisis tumoral puede ocurrir debido a la rápida muerte celular.

El Linfoma de Burkitt asociado a Inmunodeficiencia es el subtipo que de forma más común involucra los ganglios linfáticos (C. Mosse & K. Weck, 2010).

Una fase leucémica puede ser observada en pacientes con enfermedad voluminosa, pero solo en casos raros (principalmente mujeres), se presenta de forma aislada como leucemia aguda con compromiso de sangre periférica, extensa infiltración de medula ósea. El compromiso del SNC es común al momento del diagnóstico o de forma temprana durante el curso de la enfermedad. (Ferry 2006) (Molyneux 2012).

3.5 Epidemiología

El Linfoma de Burkitt muestra marcadas variaciones a lo largo de las diferentes regiones geográficas con respecto a la incidencia, edad de presentación, sitio anatómico primario del tumor y asociación con la infección por EBV. La forma Endémica predomina en África ecuatorial y Papúa Nueva Guinea y la forma Esporádica, en áreas como Norte América, Norte y Oriente de Europa, así como Japón. Sin embargo, descripciones de Linfoma de Burkitt fuera de las regiones Endémicas y Esporádicas, han permitido una progresiva identificación de áreas en el mundo donde el Linfoma de Burkitt exhibe características específicas y una incidencia intermedia, esta puede ser considerada una forma “intermedia”, la cual ocurre en áreas como Sur América, Sur de Europa, Norte de África y Medio Oriente (Cardy et al. 2001).

En África ecuatorial y Papúa Nueva Guinea es el cáncer más común de la niñez (Parkin 2003). Con una incidencia similar a la de la Leucemia Linfoblástica Aguda en países desarrollados, en el orden de 3-6 casos por 100.000 niños por año entre los 0-14 años, correspondiendo al 80%-90% de los linfomas en este grupo de edad (Magrath 2012), (Orem 2007), (Molyneux 2012).

El LB es encontrado en áreas de bajo riesgo, tales como Norte América, norte y oriente de Europa y el oriente de Asia, con una incidencia anual ajustada para la edad de 2 por millón, correspondiendo a cerca del 6-15% de todos los Linfomas. En áreas de Sur América, Sur de Europa, Norte de África y Medio Oriente consideradas áreas de riesgo intermedio, con tasas ajustadas para la edad que van entre 3,9 y 8,6 casos por millón, correspondiendo a un 15-46% de los casos de Linfomas (Cardy y cols. 2001). En Colombia para 1982-1991, el Linfoma de Burkitt fue reportado en “*International Incidence of Childhood Cancer, Vol II*”, con una incidencia de 6.2 casos por millón, la más alta entre los países de América Central y América del Sur en menores de 15 años. (Cardy, 2001) (Parkin 1998).

Entre los tumores malignos relacionados con el VIH se encuentra el Linfoma de Burkitt. En Uganda, las tasas de incidencia de Linfoma de Burkitt aumentaron de 9,5 casos por millón en 1960-71, a 34,3 casos por millón para el período 1991-1997 (Orem 2007). En Estados Unidos el impacto de la pandemia del VIH es claro, Guech-Ongey reporta para

el periodo de 1980-2005, una incidencia de Linfoma de Burkitt entre pacientes con SIDA fue de 39.5 casos por 100.000 por año en menores de 19 años (Guech-Ongey 2010).

No hay duda que el Linfoma de Burkitt es mucho más común en el África ecuatorial que en otras regiones del mundo, probablemente debido a diferencias en el ambiente y en particular al riesgo de exposición a agentes infecciosos, así como a algunos factores genéticos. Por esta razón, fue llamado el “Linfoma Africano”, extendiéndose entre 10 a 15° al norte y sur del ecuador, con una prolongación hacia el sur en la costa este, donde anualmente las temperaturas son mayores a 15°C y las precipitaciones son de más de 24 pulgadas (Magrath 2012).

3.6 Diagnóstico

El diagnóstico de Linfoma de Burkitt, requiere la combinación de parámetros morfológicos, inmunofenotípicos y genéticos.

3.6.1 Morfología

En la tinción de Hematoxilina-eosina y bajo aumento, se puede observar la clásica apariencia en “cielo estrellado”. Este patrón es debido a la presencia de múltiples macrófagos dispersos, de citoplasma abundante y claro, con cuerpos fagocitados que contienen células tumorales apoptóticas (cuerpos tingibles) “las estrellas” (Fujita 2004), en un fondo de células tumorales basófilas “el cielo”. Los tejidos de masas tumorales muestran distorsión de la arquitectura por sabanas de células linfoides atípicas, algunos intercalados con áreas de necrosis o hemorragia.

Las células tumorales que componen el Linfoma de Burkitt clásico son de tamaño medio, definido como un tamaño nuclear similar o más pequeño que el de los histiocitos y muestran un patrón de crecimiento monótono y difuso. Las células aparecen cohesivas y algunas veces se observan células moldeadas con contornos cuadrados por citoplasma retraído (Swerdlow 2008). Los núcleos son redondos a ovals con bordes bien definidos, cromatina dispersa, finamente agrupada y 2-5 nucléolos de tamaño medio en disposición paracentral. Su citoplasma es escaso y ligeramente basófilo y con frecuencia presentan

vacuolas de contenido lipídico las cuales son mejor apreciadas con la tinción de Romanowsky. Otras de las características del Linfoma de Burkitt es la marcada tasa de proliferación, observándose como numerosas figuras mitóticas y cuerpos apoptóticos (Michelow 2012,) (Ng 2009).

Aunque morfológicamente las tres variantes de Linfoma de Burkitt pueden mostrar características idénticas, este prototipo histológico es observado con alta frecuencia en las formas Esporádicas, particularmente en población pediátrica, seguidas por las formas Endémicas (Swerdlow 2008). Por el contrario, el Linfoma de Burkitt asociado a Inmunodeficiencia puede mostrar un espectro más amplio de morfologías, que incluyen formas pleomórficas y de diferenciación plasmocitoide (Michelow 2012). Estas dos morfologías, reconocidas previamente por la OMS en el 2001, fueron denominadas Linfoma de Burkitt con diferenciación plasmocitoide y Linfoma de Burkitt atípico/Linfoma de Burkitt-like. El primero, caracterizado por células con núcleo excéntrico y un único nucléolo central y el último, donde se observa gran pleomorfismo, con nucléolos más prominentes pero menos numerosos.

Cada característica patológica usada para definir el Linfoma de Burkitt es encontrada en otros tipos de neoplasias de células B y en especial la distinción entre linfoma de Burkitt y Linfoma B Difuso de Célula Grande es algunas veces problemática. Esto es reconocido por la OMS en el 2008 con la introducción de la categoría: *Linfomas de células B inclasificables, con características entre Linfoma B Difuso de Célula Grande y Linfoma de Burkitt* (Perry Am. 2013). Esta es una categoría heterogénea y provisional, que no se considera una clara entidad patológica, pero que ha sido útil para permitir la clasificación de los casos que no cumplan con criterios de Linfoma de Burkitt o Linfoma B Difuso de Célula Grande. Este es un grupo de Linfomas, se caracteriza por células B morfológicamente heterogéneas, en algunos casos, las células recuerdan a las del Linfoma de Burkitt pero con mayor variación en tamaño nuclear así como en su contorno. Algunos casos son consistentes morfológicamente con Linfoma de Burkitt pero con un inmunofenotipo y/o características genéticas atípicas. Otros casos, muestran un inmunofenotipo consistente con Linfoma de Burkitt pero con un tamaño nuclear que es intermedio entre LB y LBDCG, con contorno nuclear irregular y nucléolo grande. De forma características, expresan marcadores pan B, portan la translocación MYC en cerca

del 35-50% de los casos y la translocación BCL2 hasta en un 15% de los casos. En algunas situaciones estas se presentan juntas y son denominados Linfomas doble "hit" (Aukema SM. 2011), o asociadas con otras anormalidades citogenéticas. De forma interesante esta nueva categoría muestra un predominio por translocaciones del MYC con locus de Ig de cadena liviana, así como a genes diferentes como BCL6, BCL11A, PAX5 y IKAROS (Frick M. et al, 2012).

Alguno de estos casos previamente clasificados como Linfoma like-Burkitt/Linfoma de Burkitt atípico, son designados ahora en esta clasificación, así como algunos casos de Linfoma Folicular transformados. Este grupo de linfomas de células B aunque muestra las características morfológicas y genéticas de estas dos neoplasias, son biológicamente diferentes y no deben ser incluidos en esta categoría casos de Linfoma B Difuso de Célula Grande morfológicamente típico con rearrreglos de MYC, ni casos de Linfoma de Burkitt morfológicamente típico en el cual no se pueda demostrar el rearrreglo del gen MYC (Swerdlow 2008).

3.6.2 Inmunofenotipo

Las células tumorales expresan moderados a altos niveles de IgM de superficie con restricción de cadena liviana y antígenos asociados al linaje de células B como CD19, CD20, CD22 y CD79a. Marcadores como CD10, Bcl6, CD38, CD77 y CD43 son comúnmente co-expresados. La expresión de CD10 y bcl-6 favorecen su origen centro germinal, el cual ha sido confirmado en análisis de expresión genética. Las células neoplásicas son usualmente negativas o solo ligeramente positivas para Bcl2 (en aproximadamente 20% de los casos) y son de forma uniforme negativas para la deoxinucleotidiltransferasa terminal (TdT). Muestran además, un alto índice de proliferación con un Ki67 mayor al 95% (Michelow 2012) (Fujita 2004).

Casos con un inmunofenotipo más atípico, tales como los casos con BCL2 positivo, son vistos en pacientes adultos y requiere el cumplimiento de otros parámetros para el diagnóstico de linfoma de Burkitt, incluyendo translocación MYC;IG sin translocación BCL2 o BCL6 (Swerdlow 2008).

CD28 y CD44 han sido documentados como inmunotinciones útiles para distinguir entre linfomas positivos o negativos para translocación MYC (Rodig et al, 2008), aunque la experiencia con estos anticuerpos es aún limitada.

3.6.3 Genética

Desde 1982, luego de ser reportada por dos grupos independientes la translocación t(8;14) del oncogén MYC (c-myc) al locus de la cadena pesada de la IG, esta ha sido establecida como un evento molecular clave asociado con el Linfoma de Burkitt en todas sus formas clínicas. Las siguientes son translocaciones descritas para el Linfoma de Burkitt que involucran el oncogén MYC.

- t(8;14)(q24;q32): MYC/IGH (locus de la Cadena Pesada de Inmunoglobulinas)

- t(8;22)(q24;q11):MYC/ IGL (locus para la Cadena Ligera de Inmunoglobulina Lambda)

- t(2; 8)(q12;q24): MYC/ IGK (locus para la Cadena Ligera de Inmunoglobulina Kappa)

La t(8;14) (q24;q32) se considera el marcador del linfoma de Burkitt, la cual ocurre en un 70-80% de los pacientes. Las variantes: t(2;8) (p12;q24) y t(8;22) (q24;q11), ocurren en el 10% y 5% respectivamente (Harris 2001). No obstante, dicha translocación no es específica del Linfoma de Burkitt, está descrita en casos de Linfoma B Difuso de célula grande, Linfoma Folicular transformado, Mieloma Múltiple y en otros Linfomas no Hodgkin, confiriendo a estos un pobre pronóstico (Kanungo A, 2006). Esta translocación probablemente ocurre como un error en la Hipermutación Somática o el Cambio de Clase durante la reacción centro germinal, un rearrreglo aberrante a través de la activación de la enzima AICDA (activación inducida deaminasa) (Grömminger S. y cols. 2012).

La consecuencia molecular de las tres translocaciones es la alteración de la expresión del oncogén MYC (*myelocytomatosis viral oncogen homolog*) el cual es un regulador global de la transcripción que afecta cientos de genes involucrados en el control del ciclo celular, metabolismo, regulación del procesamiento del RNA, expresión de micro-RNAs, transducción de señales, interacción célula-célula, función inmunológica y apoptosis (Grömminger S. et al. 2012) y se encuentra regulado a la baja cuando las células logran su diferenciación terminal. Esto se debe a la yuxtaposición con secuencias reguladoras

de la inmunoglobulina y simultáneamente pérdida o mutación de parte de sus regiones reguladoras (Shiramizu 1991). Se produce una sobreexpresión del oncogén MYC que implica aumento de la apoptosis, estímulo continuo de proliferación celular y retardo de la diferenciación. De esta forma, la célula es conducida a adquirir mutaciones genéticas adicionales o modificaciones epigenéticas que promuevan la supervivencia celular, o inhiban la apoptosis inducida por Myc para finalmente equilibrar el balance hacia la proliferación de células tumorales.

En aproximadamente un 10 % de los casos no se logra demostrar la translocación MYC por medio de Hibridación in situ con fluorescencia y cuya explicación aún es incierta (Swerdlow 2008). Se ha propuesto que el gen MYC podría ser alterado en estos casos por otros mecanismos como los epigenéticos (Lindstrom 2002). Dado que estos mecanismos no son conocidos, todas las restantes características deben ser completamente típicas para que se pueda hacer el diagnóstico de Linfoma de Burkitt.

En todos los tres tipos de translocación, el punto de ruptura en el cromosoma 8 está dentro o adyacente al oncogén C-myc, mientras que en los otros cromosomas el punto de ruptura están dentro de uno de los locus de las cadenas de inmunoglobulina, ya sea de la cadena pesada (cromosoma 14), de las cadenas liviana Kappa (cromosoma 2) o lambda (cromosoma 22). En el cromosoma 14, el punto de ruptura usualmente está localizado dentro o adyacente a las regiones variables (V), unión funcional (J), diversa (D) o la región Switch (S), pero otras regiones del locus de la cadena pesada han sido ocasionalmente involucradas (Shiramizu 1991).

De forma interesante, aunque la translocación del gen MYC se asocia con todas las formas clínicas de Linfoma de Burkitt, los puntos de ruptura para las translocaciones difieren en la forma Endémica por un lado y en la Esporádica y la asociado a Inmunodeficiencia por otro (Michelow 2012) (Ng 2009). Generalmente en la forma Endémica, el cromosoma 8 tiene puntos de ruptura unas 100kb corriente arriba de la región promotor del gen MYC, mientras que en el cromosoma 14 se involucran los segmentos VDJ de gen IGH, resultando en la fusión de los elementos de control de IGH corriente arriba de la región promotor del MYC. Por el contrario, el punto de ruptura en la forma Esporádica, ocurre en el cromosoma 8 dentro del exón 1 o intrón 1 del gen MYC y en el cromosoma 14 dentro de la Región Switch del gen IGH (Ng 2009), translocando la región codificante del MYC dentro del locus del IGH (Shiramizu 1991).

En las formas variantes t(2;8) y t(8;22), el punto de ruptura del cromosoma 8 ocurre corriente abajo del gen MYC, resultando en la translocación de elementos de control de IGK o IGL corriente abajo del MYC. Estas variaciones sugieren que la patogénesis del Linfoma de Burkitt Esporádico y el Linfoma de Burkitt Endémico, difieren en cuanto al mecanismo molecular que da lugar a la translocación y alteración del oncogén MYC. Aunque todavía no se conocen con exactitud, se han relacionado con el estado de diferenciación de la célula diana en el momento de la transformación maligna así como de la positividad o negatividad del EBV entre las formas endémicas y esporádicas (Shiramizu 1991) (Bellan 2005).

Otras alteraciones genéticas y epigenéticas que ocurren en un subgrupo de Linfomas de Burkitt, involucran p16, TP53, p73, BAX, p130/RB2 y BCL6, pueden promover el crecimiento celular y/o inhibir la apoptosis (Swerdlow 2008). Usando hibridación genómica comparativa (CGH), un reciente estudio confirmó que los Linfomas de Burkitt son asociados con relativamente pocas anormalidades en número de copias, e identificó anormalidades en TP53 y ganancias en los microRNA cluster 17-92 (Scholtysik 2010).

La Identificación de la translocación MYC, se logra por metodologías como FISH, PCR y Southern blot. Sin embargo el amplio rango de puntos de ruptura, limita la eficiente detección de IGH-MYC por PCR convencional y en relación al Southern blot, se requiere DNA de alta calidad y múltiples sondas para detectar varios puntos de ruptura genómica.

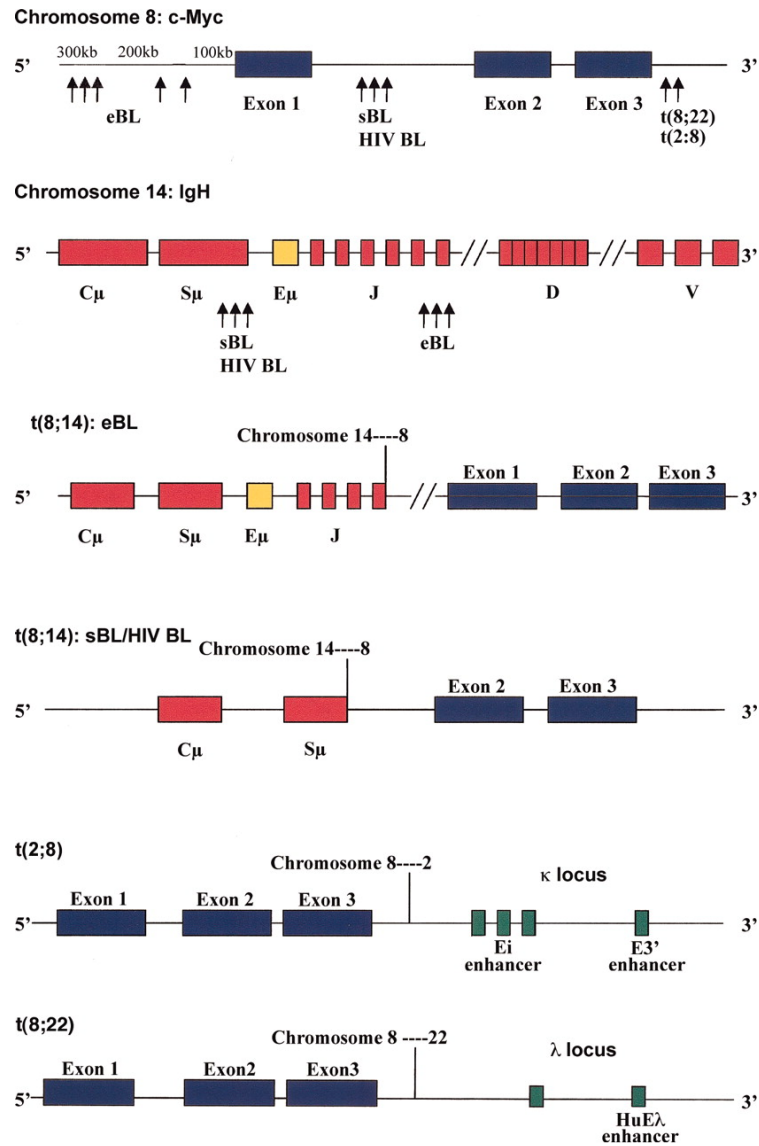


Figura 1. Rearreglo Cromosómico MYC – IGH en Linfoma de Burkitt.

Fuente: Tomado de Kristie A. Blum et al. (2004).

3.6.4 Microarreglos de expresión

Como previamente se describe, la distinción entre el LB y el LBDCG no siempre es precisa con técnicas diagnósticas de uso rutinario, dado que hallazgos morfológicos, inmunofenotípicos y la característica t(8;14) se pueden superponer. Sin embargo es crítica la determinación, ya que el manejo de estas dos entidades es diferente. De forma reciente, Microarreglos de Expresión han sido diseñados para identificar perfiles de

expresión genética que permitan distinguir entre Linfoma de Burkitt y Linfoma B difuso de célula grande u otros Linfomas B agresivos, así como para ampliar el entendimiento de las vías moleculares involucradas en la patogénesis de LB e identificar nuevos marcadores moleculares y blancos terapéuticos. Dave y cols, identificaron cuatro principales clúster de genes expresados de forma diferencial “firmas de expresión génica”. La proteína c-myc y sus genes blancos constituían una de las firmas, esta fue expresada en un nivel más alto en el Linfoma de Burkitt que en LBDCG. Una segunda firma incluía un subgrupo de genes asociado con células B centro germinal, los cuales fueron sobreexpresados en el Linfoma de Burkitt más que en el LBDCG CG-like. La tercera y cuarta firma, mostraban bajos niveles expresión e incluían genes HLA clase I y genes blanco de la vía NF-kappa B (Dave SS, 2006).

Aunque el número total de casos incluidos en este estudio fue relativamente pequeño, la evidencia sugiere que los perfiles de expresión genética tienen un potencial para ser pruebas altamente específicas que puedan ser empleadas de forma rutinaria en muestras de tejido fijado y parafinizado y en un futuro que permitan definir nuevos blancos terapéuticos

3.7 Pronóstico

Clínicamente el pronóstico es determinado por el estadio de la enfermedad, usando ya sea el Sistema Ann Arbor o con más frecuencia el Sistema St Jude/Murphy. Este último sistema, permite identificar pacientes con enfermedades en estadios limitados (I o II) y pacientes con enfermedades extensas intrabdominales o intra-torácicas (III o IV).

Tabla 1
Clasificación por estadios de Ann Arbor.

Estadio I	Compromiso de una única región ganglionar (I) o de una región extraganglionar (IE)
Estadio II	Compromiso de 2 o más regiones ganglionares en el mismo lado del diafragma (II), una localización extralinfática y de una o más regiones ganglionares en el mismo lado del diafragma (IIE)
Estadio III	Compromiso de regiones ganglionares en ambos lados del diafragma (III) que pueden estar acompañadas por afectación extralinfática localizada (IIIE), esplénica (IIIS), o ambas
Estadio IV	Afectación diseminada de uno o más órganos extralinfáticos asociada o no a ganglios linfáticos
Síntomas: A: asintomático y B: fiebre, sudoración, pérdida de peso >10% del peso corporal.	

Fuente: Elaboración propia. Información tomada de Molyneux E.M, et al. (2012).

Tabla 2
Sistema de estadificación St Jude/Murphy

Estadio I	- Un único tumor (extranodal) o área anatómica única (nodal), excluyendo el mediastino y abdomen.
Estadio II	- Un único tumor (extranodal) con compromiso ganglionar regional. - En el mismo lado del diafragma: dos o más áreas ganglionares; dos tumores extraganglionares, con o sin compromiso regional. - Un tumor primario gastrointestinal (usualmente ileocecal) con o sin compromiso ganglionar mesentérico asociado, resecado macroscópicamente.
Estadio III	- En ambos sitios del diafragma: dos o más áreas nodales; dos tumores extraganglionares. - Todos los tumores primarios torácicos (mediastino, pleura, timo) - Enfermedad intrabdominal primaria extensa e irreseccable. - Todos los tumores primarios paraespinales o epidurales, independiente de otros sitios.
Estadio IV	Cualquiera de los sitios anteriores con compromiso del SNC o medula ósea

Fuente: Elaboración propia. Información tomada de Molyneux E.M, et al. (2012).

Aunque el Linfoma de Burkitt es un tumor agresivo es potencialmente curable. Requiere el inicio temprano de esquemas de poliquimioterapia a altas dosis, algunas veces con profilaxis del SNC, así como profilaxis y tratamiento del síndrome de lisis tumoral el cual debe ser iniciado inmediatamente se confirma el diagnóstico. En países desarrollados, lográndose tasas de curación global de Linfoma de Burkitt esporádico, de

aproximadamente el 90% (Molyneux E.M. 2012), con variaciones según el estadio y factores adversos, entre estos los altos niveles de LDH, el compromiso SNC y medula ósea, tumores irresecables >10 cm y mayor edad son factores de pobre pronóstico tanto en población adulta como pediátrica (Swerdlow 2008). Una respuesta granulomatosa al linfoma ha sido asociada con resultado favorable en casos de Linfoma de Burkitt esporádico (Schrager JA et al, 2004).

Para países en vías de desarrollo, las tasas de curación son variables. En Brasil, para el 2009, Klumb y cols informaron una sobrevida libre de evento del 80%, con una mortalidad asociada a tratamiento del 1% (Klumb et al. 2009). En formas Endémicas para el 2008 fue reportada una sobrevida libre de evento del 61%, con una mortalidad asociada a tratamiento del 23% (Harif et al 2008). Siendo en estos países más frecuente la recaída y/o falla del tratamiento asociada con terapias incompletas, menos agresivas, diagnóstico tardío, progresión de la enfermedad o mortalidad asociada al tratamiento (Molyneux E.M. et al 2012).

La ocurrencia de recaída, usualmente se presenta durante los primeros 6 meses luego de finalizar el tratamiento, asociados a pobre pronóstico dadas las pocas opciones terapéuticas disponibles. Así, evaluación de sobrevida libre de evento en el primer año, es probablemente un buen indicador de sobrevida a largo plazo, especialmente en pacientes con Linfoma de Burkitt endémico, debido a que menos del 5% de recaídas ocurren después de un año. (Molyneux E.M. et al 2012).

Nuevos blancos terapéuticos, están siendo evaluados incluyendo aquellos contra el gen c-myc, inhibidores de la ADN metiltransferasa, inhibidores de proteosomas, inhibidores de ciclina dependiente de kinasa entre otros (C. Mosse y K. Weck, 2010)

3.8 Etiopatogenia

El Linfoma de Burkitt es derivado de células B centro germinal o post centro germinal. El desarrollo de este es dependiente de la expresión constitutiva del oncogén c-MYC. Este factor de transcripción modula la expresión de genes blanco los cuales regulan numerosos procesos celulares que incluyen proliferación, diferenciación y muerte celular.

Así mismo, la infección crónica por EBV parece jugar un rol en los casos endémicos y en una minoría de casos esporádicos y asociados a inmunodeficiencias. Al respecto, esta asociación continua siendo un paradigma y por lo tanto blanco de intensas investigaciones. En este texto se intenta profundizar sobre la evidencia actual de dicha asociación.

Es posible que diferentes mecanismos patogénicos existan entre los tres subtipos clínicos, esto es evidente por las variaciones en tasas de infección por EBV, VIH, malaria, en la anatomía molecular de los rearrreglos cromosómicos, entre otros. Sin embargo, muchos interrogantes sobre el mecanismo preciso de transformación maligna son aún desconocidos.

Virus Epstein-Barr.

-Estructura y Biología:

El virus Epstein-Barr, también denominado Herpesvirus 4 (HHV-4), es un virus ADN de doble cadena, perteneciente a la familia *Herpesviridae* y a la subfamilia *Gammaherpesvirinae*, específicamente al género gama-1, siendo el único en su género que afecta humanos.

Es un virus envuelto, con un diámetro aproximado de 120nm a 180nm. Su genoma viral está rodeado por una nucleocápside, formada por 162 capsómeros y una proteína de tegumento ubicada entre la nucleocápside y la envoltura. Su ADN de doble cadena lineal, tiene aproximadamente 172kb y codifica para más de 85 genes (Bouvard V. 2009). El genoma se organiza en regiones, referidas como dominio de secuencia Única Corta (US), dominio de secuencia Única Larga (UL) las cuales son divididas por secuencias repetidas llamadas Repeticiones Internas (IR) y Repeticiones terminales (TR) (IARC, 2011).

Estas repeticiones terminales (TR) que flanquean en ambos extremos la molécula de ADN, tiene una longitud aproximada de 500 pb y tras la infección de una célula huésped, el genoma lineal del EBV es transformado a una estructura de ADN episomal circular, gracias a la recombinación entre estas repeticiones terminales. El número de

repeticiones que queda en cada episoma tras la unión de los extremos se utiliza como marcador de clonalidad (si las células infectadas son del mismo progenitor (IARC, 2011)).

La nomenclatura de los marcos abiertos de lectura (ORFs) se basa en el fragmento de la enzima de restricción *Bam*HI en el cual fue encontrado. Estos ORFs son divididos en genes latentes y genes líticos, estos últimos además clasificados en genes tempranos inmediatos, genes tempranos y genes tardíos. La mayoría, codifican para proteínas con diversas funciones, algunas proteínas estructurales, factores de transcripción, proteínas homologas humanas y una minoría de genes no son codificantes, como los micro-RNAs transcritos por dos unidades denominadas BHRF1 y BART0. (Grömminger S et al, 2012)(Bouvard V. et al. 2009) (Allday M. 2009). La expresión de estas proteínas codificadas por el genoma del EBV varía dependiendo del tipo de programa de expresión génica ejecutado, siendo el Programa de replicación lítica, donde el mayor número de proteínas virales son expresadas (Ng S. 2009).

Dos principales tipos de EBV han sido identificados, denominados EBV-1 y EBV-2 los cuales difieren en su distribución geográfica (Bouvard. 2009) y en la secuencia de los genes que codifican para los antígenos nucleares (EBNA-2, EBNA-3A, EBNA-3B y EBNA-3C) (Sample. 1990), en especial la secuencia del gen EBNA-2, el cual parece estar relacionado con la diferente capacidad de infectar e immortalizar líneas celulares linfoblásticas (LCLs) *in vitro*.

El virus Epstein Barr, exhibe un tropismo por las células B, siendo el principal blanco de infección tanto *in vivo* como *in vitro*. Esta unión, preferencial es mediada por la interacción de la glicoproteína de envoltura gp350 con el receptor CDR2 (CD21) para el C3d del complemento (Cohen JI 2000*). Posteriormente, una segunda glicoproteína de envoltura, la gp42 se unen a las moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad clase II, actuando esta unión como cofactor de infección de linfocitos B (Li Q. y cols., 1997). La partícula viral ingresa por endocitosis a la célula hospedera, fusionando la envoltura viral con la membrana celular.

Sin embargo el EBV no es exclusivamente linfotrópico. Este puede infectar otras células, aunque con baja eficiencia y con mecanismos diferentes a la vía CD21, como células epiteliales y linfocitos T. La primera evidencia que el EBV podía entrar a las células epiteliales fue proporcionada por Wolf en 1973, quien uso Hibridación *in situ* en biopsias

de Carcinoma Nasofaríngeo. Aunque, la asociación del EBV con este y otros tumores epiteliales reflejan la interacción con las células epiteliales, la presencia de genoma viral en forma episomal encontrado en estas neoplasias epiteliales, no ha sido encontrado en células epiteliales normales *in vivo* (Grömminger S. y cols. 2012). Sugiriendo, que la infección por EBV en portadores crónicos sanos está restringido a las células B y que el principal papel de las células epiteliales es ser un sitio de replicación y amplificación del EBV más que un sitio de infección latente persistente (Bouvard. 2009). De hecho, La infección del epitelio escamoso orofaríngeo hace parte integral de la interacción natural del EBV-hospedero, donde ocurre la replicación viral, explicando las elevadas concentraciones de virus vistas pacientes con mononucleosis, quienes se encuentran eliminando partículas virales infectantes (Ng. et al 2009).

-Epidemiología de la infección:

Un importante descubrimiento, permitió a los hermanos Henle en 1966 (Henle & Henle 1966), desarrolla un inmunoensayo para la determinación de anticuerpos contra el virus Epstein-Barr, al encontrar que en líneas celulares de linfoma de Burkitt, una pequeña y variable proporción de células producían partículas virales, las cuales fueron usadas como fuente de antígenos virales. Gracias a esto, estudios Seroepidemiológicos a gran escala revelaron que este virus era ubicuo en la población humana y no se restringía a África central. En 1970, la Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer demostró que más del 90% de los adultos en todo el mundo estaban infectados con EBV, basados en la detección de anticuerpo de EBV (especialmente anticuerpos contra la cápside viral VCA) (Bouvard. 2009).

La edad de primoinfección varía sustancialmente alrededor del mundo, y la exposición al virus esta probablemente relacionada con factores socioeconómicos. En países en vía de desarrollo, la primoinfección por EBV ocurre durante los primeros años de vida y es frecuentemente asintomática. El hacinamiento y/o la práctica de la masticación de alimentos para los bebés contribuyeron para la incidencia temprana en estos países. Mientras que en los países desarrollados, esta primoinfección tiende a ser más tardía, apareciendo hacia la adolescencia y la adultez temprana y manifestándose en algunos, como una infección autolimitada conocida como mononucleosis infecciosa o enfermedad del beso por su vía de transmisión relacionada (Grömminger 2012) (Cardy A. H, 2001).

-Ciclo biológico:

El EBV se trasmite por la saliva y entra al epitelio del anillo de Waldeyer, donde probablemente inicia el foco primario de replicación lítica que permite la amplificación del virus. Posteriormente, el virus se propaga por el tejido linfoide subyacente activando el programa de transcripción denominado latencia III o programa de crecimiento, infectando células B vírgenes. Este programa es autorregulado negativamente por las proteínas de la familia EBNA 3, permitiendo que las células migren dentro del folículo e inicien la reacción de centro germinal y se establezca el programa de transcripción Latencia II. Este programa proporciona señales de supervivencia que conducen a la célula fuera del centro germinal como células B memoria, donde luego es iniciado el programa de transcripción Latencia 0, en el cual la expresión de las proteínas virales se apaga y permite escapar de la respuesta celular T CD8 específica, permitiendo su persistencia a lo largo de la vida.

Cuando los linfocitos ocasionalmente se dividen, activan el programa de Latencia I en el cual solo la proteína EBNA1 es expresada junto con algunos nc-RNAs y micro-RNAs. Gracias a este programa el genoma viral se conserva en forma episomal, replicado por la DNA polimerasa del hospedero y repartido en partes iguales a las células progenitoras durante el proceso de división celular. (Young L., 2004) (Thorley-Lawson & Gross, 2004) (Bouvard V., et al 2009).

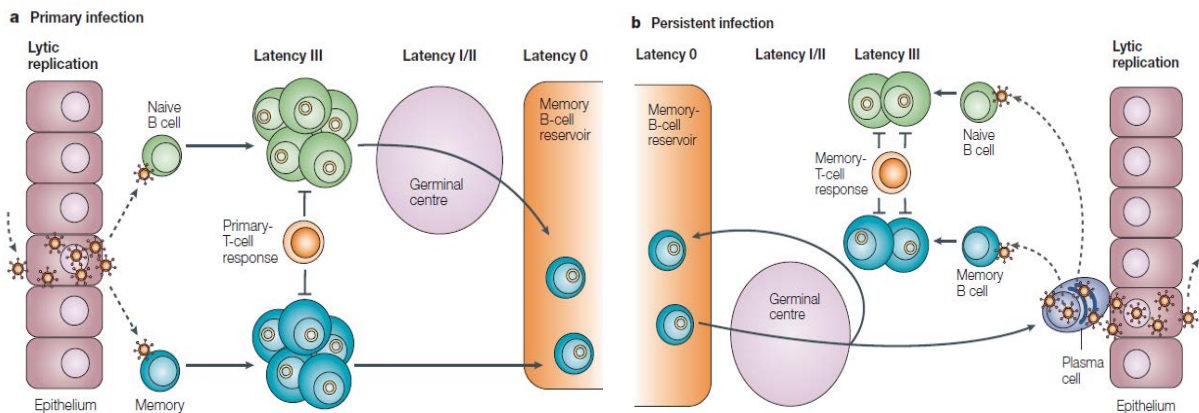


Figura 2. Interacción del EBV y hospedero.

Fuente: Tomado de Young LS, Rickinson AB (2004).

El EBV permanece en forma latente en el huésped infectado, en un estado de portador. Este estado puede fluctuar por periodos de reactivación desde latencia a fase lítica permitiendo la eliminación de viriones desde las superficies mucosas con la posible transmisión a otros hospederos o a otras células B. (Ng.-B. & Khoury J. 2009).

No está totalmente claro cómo el virus consigue el acceso al compartimiento de células B de memoria. Thorley-Lawson ha propuesto que el virus aprovecha la ruta normal de la diferenciación de las células B a través del centro germinal, en este escenario, indica que la transformación viral conduce a las células vírgenes en células memoria, imitando el proceso fisiológico que involucra los genes LMP1 y LMP2, como mimetizadores del CD40 y el BCR respectivamente e implicando la presencia de hipermutaciones somática de los genes de inmunoglobulina durante el tránsito por el centro germinal. Una visión alternativa, es que la infección de las células memoria, existe como una ruta directa, pasando a través del centro germinal infectando directamente las células B memoria. Sin embargo, ninguno de estos puntos es completamente soportado con evidencia experimental (Young L., 2004) (Thorley-Lawson & Gross, 2004) (Bornkamm G.W., 2009).

El control de la infección está dada principalmente por una población de células T citotóxicas CD8 positivas que reconocen los epitopes derivados de proteínas EBNA2A, 3A, 3B y 3C, permitiendo mantener un estado portador asintomático. Sin embargo, la proliferación del EBV en linfocitos B portadores del genoma en latencia, puede ocurrir en individuos inmunodeficientes, el cual se manifiesta como Enfermedades Linfoproliferativas (Klein G. 2011), donde la ausencia de una efectiva vigilancia de células T, permite la expresión no restringida de genes EBV y el crecimiento autónomo de células infectadas (latencia tipo III).

La infección por EBV provoca tanto una respuesta inmune celular como humoral. Esta última, incluye la producción de anticuerpos contra las proteínas estructurales como el antígeno de cápside EBV (VCA-IgG) y el antígeno temprano (EA-IgG), los cuales no parecen jugar un rol importante en el control de una infección por EBV establecida (Ng S.-B. & Khoury J. 2009).

-Expresión génica viral:

La expresión de genes codificados por el EBV es regulada por el fenotipo celular y en células B por el estadio de diferenciación o de activación. Una compleja interacción entre las proteínas codificadas por el virus y las proteínas celulares determinan el fenotipo de latencia. Se describirá brevemente algunas de estas proteínas, para luego describir los diferentes programas de Latencia.

EBNA1, es una fosfoproteína expresada en todos los programas de latencia con excepción de la Latencia 0 o verdadera latencia. Se expresa en la mayoría de células que portan el EBV, independiente del tipo de célula, del estado de diferenciación o de activación. Cuando esta es la única proteína expresada (Latencia I), permite a la célula ser pobremente reconocida por los linfocitos T citotóxicos, ya que inhiben el procesamiento y presentación de antígenos por el CMH clase I. Es una proteína de unión a diferentes sitios del ADN viral, siendo responsable de promover la replicación y la segregación de los episomas virales en las células hijas, actúa como un regulador transcripcional de los programas virales por unión a diferentes promotores y participa en el proceso de immortalización de las células B (Klein G 2010.) (Grömminger S. et al. 2012) (Ng S., 2009). Se reconoce su efecto antiapoptótico, regulando p53 a través de la unión a una proteasa específica de ubiquitina denominada HAUSP (Klein G. 2010.), así como su contribución en la inestabilidad genómica del huésped e incluso con ocurrencia de translocaciones (Yung L. 2004) (Bouvard V. Et al 2009).

EBNA-2, se expresa en el programa latencia III y es la que más difiere entre los dos tipos de EBV. Aunque no se une directamente al ADN, tiene como función ser un potente activador transcripcional de numerosos promotores celulares y virales. Entre estos, se encuentra el promotor c (Cp), el promotor LMP-2A y LMP-1 y promotores para genes celulares como el CD23, CD21 y c-myc. Esto es logrado por medio de interacciones con factores de transcripción celular, tales como SPI1 y el complejo proteico de reclutamiento RBP-JK, interacciones que promueven la proliferación (Grömminger S. et al. 2012) (Ng S., 2009) (Young L. 2004) (Bouvard V. et al 2009). La unión a RBP-JK, ha sido ampliamente estudiada y es esencial para la immortalización del EBV. Esta unión involucra la vía de señalización del Notch, ya que el RBP-jk es el blanco corriente abajo del fragmento intracelular clivado de las proteínas Notch, luego de la unión del ligando a el fragmento extracelular. El EBNA-2 puede reemplazar funcionalmente este fragmento

intracelular de las proteínas Notch, activando la vía de señalización (Young L. 2004) (Klein G 2010). La inducción del c-myc, se considera un importante enlace entre la infección por EBV y control del ciclo celular (Kaiser *et al.*, 1999).

Los tres miembros de la familia **EBNA3** (EBNA-3A, EBNA-3B, EBNA-3C) son reguladores transcripcionales, reprimiendo la transactivación a través de la unión a RBP-JK. Una de estas funciones, es la contribución a la terminación de la expresión de EBNA2 y por ende el cambio de latencia (Bouvard V. *et al* 2009) (Grömminger S. *et al.* 2012) (Young L. 2004). Se describe su unión a proteínas de remodelamiento de la cromatina (White, 2011) (Klein G., 2010.) y su posible acción de silenciamiento epigenético de genes celulares (Bornkamm G.W., 2009).

Las tres proteínas latentes de membrana, **LMP1, LMP2A y LMP2B**, se expresan tanto en la superficie de las membranas celulares como en de las membranas intracelulares. Cumplen diversas funciones al interactúan con varias vías de señalización celular. **LMP-1**, imita casi completamente la señalización mediada por CD40 y es por lo tanto funcionalmente homóloga a la familia del receptor de TNF en los linfocitos B y las células epiteliales, activando constitutivamente los principales sistema de señalización, como la vía NF-kB, JNKquinasa y HJAK/STAT. Entre los genes involucrados por la interacción con vías de señalización celular, se documenta la regulación a la alta de genes antiapoptóticos incluyendo el Bcl-2, moléculas de adhesión celular, citoquinas y de señales de supervivencia por medio de activación de AKT (Cohen JI, 2000) (Bouvard V. y cols 2009) (Ng D., 2009) (Young L., 2004). (Klein G. 2010). **LMP2A**, es una proteína de membrana, con similitudes estructurales y funcionales con el receptor de linfocitos B, actuando como un receptor equivalente que activa vías de señalización propias de este. Tiene un importante papel en mantener la latencia viral, previniendo la reactivación del EBV en células B con infección latente por bloqueo de la activación del ciclo lítico (Klein G. 2010) (Cohen JI 2000) (Bouvard V., *et al* 2009).

EBNA-LP, es una proteína expresada de forma temprana en células B, luego de la infección por EBV. Se une al MDM2, formando un complejo trimolecular junto con el p53, la unión del EBNA-5 al MDM2 evita la poliubiquitinación del p53 y la formación del complejo MDM2/EBNA-5/p53, bloquea la función transactivadora del p53 (Klein G.2010).

El virus Epstein Barr, también codifica al menos 22 micro-RNAs los cuales son expresados en diferentes grados en los programas de Latencia I, II, III. Son transcritos por dos unidades independientes de la **BHRF1 y BARTO** los cuales modulan la expresión de varios mRNA celulares, entre estos sobresale las proteínas BIM y PUMA reguladoras de la apoptosis. Se describe la fuerte homología de BHRF1 con gen BCL-2 (Bouvard V. et al 2009) (Grömminger S. et al. 2012).

Otros RNAs no codificantes, son los derivados de los genes **EBER1 y EBER2**, los cuales se expresan en las células en latencia y se sugiere su función como reguladores de la señalización y como factores de transcripción de citoquinas (Bouvard V. et al 2009) (Grömminger S. et al. 2012).

Antes de describir los programas de latencia, es importante aclarar el termino **Latencia** en la infección por EBV. Este ha sido usado para describir dos fenómenos diferentes, el primero para describir la persistencia del virus in vivo y el segundo para denominar los programas de transcripción del genoma viral in vitro o in vivo y que no están asociados con la producción de proteínas virales de la fase lítica (Grömminger S. et al. 2012).

Estos complicados programas de latencia, le permiten al virus manipular la diferenciación de células B. Los diferentes programas de Latencia han sido descritos tanto en células B normales como en células tumorales de diferentes neoplasias como se muestra en la tabla 1 y usan diferentes promotores según la Latencia expresada (promotor Cp, Wp y Qp).

Tabla 3
Programas de Latencia y Neoplasias asociadas.

Tipo de Latencia	Productos virales expresados	Neoplasia asociada
Latencia I	EBNA-1 EBERs BARF0	Linfoma de Burkitt Carcinoma Gástrico
Latencia II	EBNA-1 EBERs	Enfermedad de Hodgkin Carcinoma Nasofaríngeo

	LMP-1 LMP-2A BARF0	Linfoma periférico NK/T
Latencia III	Todos los EBNAs EBERs LMP-1 LMP-2A BARF0	Linfomas asociados a SIDA Desordenes Linfoproliferativos postrasplante

Fuente: Elaboración propia. Información tomada de Bouvard V. & cols (2009).

Los programas de latencia descritos en la actualidad son:

- Programa de Latencia 0 o verdadera latencia
- Programa de Latencia I
- Programa de Latencia II
- Programa de Latencia III o de crecimiento
- Programa de Latencia Restringido –Wp

Latencia 0. Las células B infectadas por EBV que proliferan y logran evadir las células T CD8, pueden entrar en verdadera latencia en células B memoria, denominada Latencia 0. Este proceso aun es pobremente entendido, pero se sabe que permite la persistencia a lo largo de la vida del hospedero. Las únicas células que expresan esta latencia in vivo son los linfocitos B de memoria y es desde este compartimiento que el virus puede ser reactivado para entrar en un ciclo lítico.

Latencia I. Este programa es caracterizado por la expresión de solo una proteína nuclear, la proteína EBNA-1 junto con algunos micro-RNAs y nc-RNAs (EBERs). Este limitado repertorio de expresión, ocurre en las células memoria que entran en división, permitiendo al virus persistir en latencia en las células en división. EBNA1 no es un blanco para la respuesta de células T citotóxicas, permitiendo que las células infectadas evadan la vigilancia inmune. (Ng 2009). Este programa de Latencia usa el promotor Qp y es expresado en las células del Linfoma de Burkitt que portan el genoma viral, en donde las células B se dividen rápidamente y requieren la expresión de EBNA1 para mantener el genoma viral en estas células.

Linfomas de Burkitt con expresión de LMP2A o con EBNA1, 3A,3B y 3C han sido reportados, pero probablemente representan una minoría de casos (C. Mosse y K. Weck, 2010).

Latencia II. En este programa se expresan las proteínas EBNA-1, LMP-1 y LMP-2A y EBERS. El tipo de células B que muestra esta latencia son las células B del centro germinal y su función parece estar relacionado con la activación de la diferenciación de las células B en células de memoria. Esta latencia se observa en tumores epiteliales (NPC y cáncer gástrico) y en células Reed Sternberg en Enfermedad de Hodgkin (Bornkamm G.W., 2009).

Todos los genes son expresados en el programa de “trasformación del crecimiento o programa de crecimiento”, también llamado **Latencia III**, estos fueron caracterizados en Líneas celulares linfoblastoides (LCLs), encontrando 6 antígenos nucleares (EBNA1, EBNA2, EBNA3A, EBNA3B, EBNA3C, EBNA3L), tres proteínas latentes de membrana (LMP1, LMP2A, LMP2B), 2 RNAs no codificantes EBER1 y EBER2 y dos set de micro RNAs (Grömminger S. et al. 2012) (Bouvard V., et al 2009). De este grupo de proteínas, se ha determinado que EBNA2, EBNA3A, EBNA3C y LMP1 son esenciales para la immortalización de células B *in vitro* (Klein G. et al 2010) y por otro lado, que LMP1 tiene un fuerte impacto en el fenotipo de las células B, induciendo activación de marcadores y moléculas coestimuladores que aumentan su inmunogenicidad a las célula T citotóxicas. Por esta razón, las células que expresan este programa de crecimiento pueden existir solo durante la fase aguda de la infección primaria antes de que la respuesta celular específica para EBV se desarrolle o en algunos pacientes inmunocomprometidos (Ng 2009). Esta latencia usa el promotor de forma temprana el promotor Wp, para luego usar el promotor Cp.

Linfoma de Burkitt y EBV

Por varias décadas, se han hecho observaciones sobre el papel del EBV como virus tumoral. Estas incluyen los estudios *in vitro*, que documentan la capacidad del EBV de conducir a las células B dentro de una proliferación ilimitada, fenómeno denominado Inmortalización o transformación del crecimiento y más recientemente, estudios de silenciamiento que mostraron la relación de efectos en la proliferación celular, apoptosis,

y migración celular. Como equivalente a la inmortalización *in vitro*, hay evidencia experimental de inducción de enfermedades linfoproliferativas en modelos animales, o luego del trasplante de linfocitos B humanos infectados a ratones inmunosprimidos. (Grömminger S. et al. 2012) (Bouvard V., et al 2009).

La evidencia *in vivo* en humanos, aunque de forma más circunstancial también es fuerte. La detección de títulos elevados de anticuerpos contra el EBV, la detección del genoma del EBV, así como la expresión de proteínas virales detectadas en un amplio espectro de neoplasias derivadas y no derivadas de Linfocitos B, que incluyen Carcinoma Nasofaríngeo anaplásico, Linfomas Hodgking, Enfermedades linfoproliferativas en pacientes inmunocomprometidos, algunos Linfomas células NK/células T, aproximadamente el 10% de los Carcinomas Gástricos y casi el 100% de los Linfoma de Burkitt endémicos, soporta un el papel del EBV en la carcinogénesis (Grömminger S. et al. 2012) (Bouvard V., et al 2009) (Klein G. 2010). Esta evidencia acumulada, llevo a clasificar en 1997 al EBV como Carcinógeno Clase I por la Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer.

No obstante, aún el preciso mecanismo de acción oncogénica no es completamente entendido y la relación del Linfoma de Burkitt y el EBV es mucho más compleja. Al respecto los siguientes aspectos evidencian dicha complejidad:

- Ubicuidad del virus, con hasta un 90% de seropositividad en la población mundial adulta.
- Programa de Latencia expresado en células tumorales del Linfoma de Burkitt, el cual es restringido a un grupo de proteínas que no conducen a la proliferación celular o inmortalización de células. Al contrario, presentan un programa de latencia I donde hay cambio en la actividad del promotor Wp o Cp a un promotor Qp que conduce a la expresión de solo EBNA-1 como antígeno nuclear viral. Adicionalmente, estas células de Linfoma de Burkitt, crecen únicas en suspensión, con ausencia de marcadores de activación celular y moléculas de adhesión sobre la superficie y un con una alta susceptibilidad a la inducción de apoptosis por condiciones desfavorables de crecimiento o agentes tóxicos; a diferencia de las celas B inmortalizadas, las cuales crecían en grandes grupos, con expresión de productos génicos virales, altamente resistentes y que imponente el fenotipo y las propiedades de crecimiento, descritas como Latencia III (Bornkamm. 2009). Sin embargo, cuando estas células de Linfoma

de Burkitt crecen como líneas celulares obtenidas de biopsias, solo una minoría de células mantienen su fenotipo in vivo. La mayoría, provenientes de pacientes con Linfoma de Burkitt, inician la expresión del programa de Latencia III adoptando un fenotipo de células inmortalizadas por EBV (Grömminger S. et al, 2012).

- Probablemente el EBV no se requiera para el desarrollo de LB, soportado por la presencia de genoma viral en solo el 10-20% de Linfoma de Burkitt esporádico y el 40-50% del Linfoma de Burkitt asociado a VIH.
- Finalmente, dado que la translocación del gen c-myc está presente tanto en pacientes con Linfoma de Burkitt positivos como negativos para EBV, pudiera ser esta suficiente y el papel del virus en la etiología del tumor menos importante.

Sin embargo, el cambio en el fenotipo celular, modificaciones en la interacción con estroma y células, modificaciones en la sensibilidad al estímulo de crecimiento y otros nuevos aspectos, siguen emergiendo, indicando el papel crítico del EBV en el desarrollo del Linfoma de Burkitt esporádico.

Un estudio prospectivo llevado a cabo en 1971, en Uganda por la Agencia Internacional para el estudio del Cancer IARC conducido por Guy de Thé, reunió 42.000 muestras de sangre de niños menores de 8 años seguidos periódicamente hasta por 8 años. Cuarenta nuevos casos de Linfoma de Burkitt fueron reconocidos y el estudio serológico mostro la siguiente evidencia: la infección por EBV precede el inicio del Linfoma de Burkitt por varios años y por ende no se asocia a infección primaria; los pacientes con los títulos más altos de anticuerpos contra EBV fueron asociados a riesgo incrementado de desarrollo de Linfoma de Burkitt (de Thé, 1978). Así mismo, dos estudios de casos y controles, conducidos por Carpenter y cols, (2008) y Mutalima y *et al*, 2008, demostraron la relación entre el incremento en los títulos de anticuerpos contra EBV-VCA y el incremento en el riesgo de Linfoma de Burkitt endémico (Bouvard V., et al 2009).

Entre las hipótesis que sugieren la participación del EBV en la carcinogénesis del Linfoma de Burkitt, indican que la presencia de EBV durante la reacción de centro germinal incrementa la tasa de Hipermutación Somática por modulación de la actividad de la AICDA. Aunque no hay una evidencia directa de interferencia entre EBV y AICDA, un aumento en la frecuencia de la Hipermutación ha sido observada no solo en individuos normales con presencia de genoma viral en comparación con los controles

negativos, sino también en células de Linfoma de Burkitt endémico en comparación de células de Linfoma Burkitt esporádicos.

Numerosos trabajos han sido desarrollados con el objetivo de identificar productos virales del programa de expresión Latencia I que ofrezcan una ventaja de supervivencia a las células del Linfoma de Burkitt, de los cuales hay evidencia experimental de potencial antiapoptótico los EBERs, EBNA 1 y recientemente varios micro-RNAs derivados de BART. Al respecto, la proteína EBNA 1 único antígeno nuclear expresado en células de Linfoma de Burkitt, fue propuesta con un potencial oncogén viral por su documentado efecto antiapoptótico a través de la proteína p53 y su unión a una proteasa específica de ubiquitina denominada HAUSP (Klein G. 2010.), así como al nuevo papel descrito, en la generación de especies reactivas de oxígeno promoviendo a la inestabilidad genómica, por medio de la inducción transcripcional de la subunidad catalítica de la NADPH oxidasa NOX2 . Sin embargo, previamente el grupo de Komano y cols, en 1998 en líneas celulares Akata de Linfoma de Burkitt, analizaron el potencial oncogénico del EBV, usando transfección de genes virales individuales a esta línea celular, concluyendo en este modelo, que la expresión del gen EBNA1 solo, no es suficiente para dar la resistencia de las células al estímulo apoptótico, la clonalidad en agar y tumorigenicidad en ratones nude y plantearon que en esta función podría estar relacionados otros productos virales como los EBERs, aunque para este momento se desconocía alguna función relacionada con la carcinogénesis (Komano J. *et al*, 1998). Como se menciona previamente, los EBERs, son dos RNAs pequeños no poliadenilados, EBER1 de 167 nucleótidos y EBER2 de 172 los cuales son altamente expresados en todos los tumores asociados a EBV y han sido considerados como candidatos de oncogenes virales (Grömminger S. *et al* 2012).

Del mismo modo, hay un gran interés por los transcritos BARTs (BamHI-A rightward transcripts) luego de ser reconocida la presencia de dos clúster de micro-RNAs, uno codifica para 8 micro-RNAs y un segundo que codifica para 13 micro-RNAs virales y un micro-RNA adicional codificado corriente abajo por el cuarto intrón del transcrito BART. Otra unidad independiente de transcripción es el BHFR1 que da lugar a 3 micro-RNAs. Son expresados en células de linfoma de Burkitt con latencia restringida a Wp y en bajos niveles son detectados en células de Linfoma de Burkitt con Latencia I. Hay numerosas publicaciones sobre la función asignada a estos micro-RNAs en relación a la regulación de genes virales y celulares, así como la modulación de la expresión de micro-RNAs

celulares. Entre estos se resalta los blancos descritos de dos micro-RNAs derivados de BART, el miR-BART2 cuyo blanco conocido es el gen BALF5 que codifica para la polimerasa DNA viral y el miR-BART5 cuyo blanco conocido es PUMA (Bornkamm G.W., 2009).

Por otro lado, emerge un segundo patrón de expresión viral llamado "**Latencia Restringida-Wp**", en modelos celulares mostro ofrecer una resistencia a la muerte mucho mayor que cualquier línea celular de Linfoma de Burkitt con Latencia I (Kelly G. et al, 2009). Este programa de expresión, fue descrito en el 2002 por Kelly G.L, y cols, en cerca del 15% de biopsias de pacientes con Linfoma de Burkitt Endémico, sugiriendo que incrementaba de forma marcada el potencial del EBV como cofactor para el desarrollo del Linfoma de Burkitt.

Dichos casos, portaban de forma invariable el genoma viral con una delección en la región codificante de EBNA-2. Su programa de expresión se caracterizaba por usar el promotor Wp, en lugar del promotor Qp para la expresión de EBNA-1, EBNA 3A, 3B, 3C, en algunos casos EBNA-LP truncada, los EBERs, así como los transcritos de BARTs, estos dos últimos expresados en diferentes grados en todas las formas de latencia. Adicionalmente, se identificó la expresión de un gen tardío del ciclo lítico, el gen BHRF1 transcrito por splicing corriente abajo de EBNA2, cuya importancia radica en su homología con una de las proteínas claves de supervivencia celular, la proteína bcl-2. Esta proteína, clásicamente conocida como un gen de ciclo lítico, también parece ser expresada en bajas cantidades, en estadios iniciales del programa de expresión de transformación de crecimiento o Latencia III, donde es usado el promotor Wp como lo describe Kelly y cols en 2009 en todas las LCLs. Sugieren adicionalmente, que en el subgrupo de Linfoma de Burkitt endémico con Latencia restringida-Wp, la presencia de un genoma viral con delección de EBNA-2 resulta en una alta actividad del promotor Wp y la expresión constitutiva de BHRF1. Así mismo, proponen que este gen puede ser el factor complementario, que impulsa hacia la malignidad cuando la célula diana solo expresa una desregulación del oncogén c-myc, actuando en contra de la apoptosis (Kelly G. et al., 2009)

Otro mecanismo que parece converger para la inhibición de la apoptosis por este programa de Latencia Restringido-Wp, es el propuesto por la participación las proteínas EBNA 3A y 3C involucradas en el silenciamiento epigenético de BIM, proteína

proapoptótica. Indicando, que las proteínas EBNA-3 podrían ser consideradas también como oncogenes virales, con función anti-apoptótica adicional. Por ahora, bajo un modelo denominado “**Hit and run**”, el cual plantea que así como el EBNA3 logra el silenciamiento epigenético del promotor c (Cp) que conlleva el cambio de latencia in vivo, esta puede silenciar genes celulares que harían más susceptible a la célula a la carcinogénesis y en especial a la supervivencia, esto debido al hallazgo de metilación CpG del promotor del gen supresor tumoral Bim por EBNA-3A y EBNA 3B (Paschos K., y cols, 2009). Sugiriendo que luego del “hit” considerado como la translocación cromosómica que lleva a la activación del c-myc, no logra conducir vías de apoptosis por la insensibilidad del promotor del Bim, posterior a su silenciamiento epigenético, explicando la fuerte ventaja de supervivencia en células con esta nueva Latencia (Grömminger S. et al, 2012).

Para finalizar, un modelo de Patogénesis del Linfoma de Burkitt descrito por Grömminger y colaboradores, indica que luego de adquirir la translocación del c-MYC se activa vías tanto de proliferación como apoptosis, pero que luego de una serie de eventos secundarios este balance es conducido hacia la proliferación no controlada. La activación de la enzima AICDA, es planteada por este grupo, participar tanto en eventos primarios (translocación cromosómica) así como de eventos secundarios (deleciones y mutaciones), teniendo lugar durante la reacción del centro germinal. Por otro lado, varias observaciones convergen en que la proteína BIM es un potencial e importante participante en la Linfomagenesis de células B. Varios mecanismos pueden ser previstos por EBV como un cofactor que no es mutuamente excluyente: contribución de EBNA1, EBERS y micro RNAs virales en la regulación de apoptosis, silenciamiento epigenético de promotores celulares y modulación de la actividad de AICDA.

- Marcadores biológicos de infección por EBV.

Las diferentes metodologías descritas para la determinación de infección por EBV deben ser interpretadas conociendo tanto la biología del agente como la respuesta inmune del hospedero. En la figura 3 se muestra la curva serológica tras la infección por EBV en un hospedero inmunocompetente.

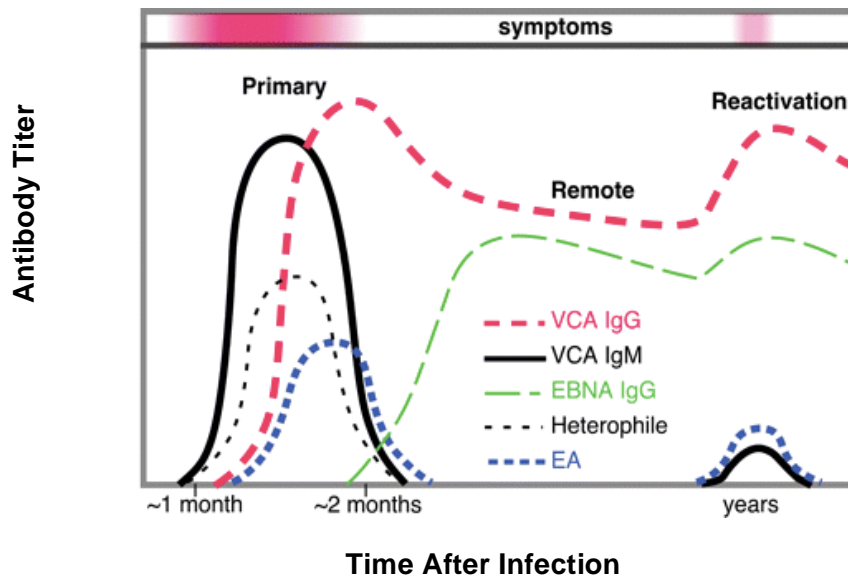


Figura 3. Curva Serológica en infección por EBV.

Fuente: Tomado de Gulley ML, Tang W (2008).

Más del 90% de la población mundial será portadora del genoma del EBV, restringida a una pequeña fracción de linfocitos B. En estos portadores sanos, la carga viral ha sido establecida en un promedio de 7 copias (rango 1 a 30 copias) de ADN viral por millón de leucocitos detectando de esta forma material genético en cualquier tejido con presencia de linfocitos B. Sin embargo, en líquidos corporales libres de células, cantidades de ADN viral son insignificantes, sugiriendo que el EBV es detectable solo en asociación con infección activa, reactivación o patologías asociadas a EBV (Maurmann S. et al, 2003).

Teniendo en cuenta lo anterior, para lograr una interpretación adecuada del EBV como marcador de enfermedad, en este caso de Linfoma de Burkitt, se deberían hacer aproximaciones cuantitativas del genoma viral y de forma importante, localizar material genético o sus productos solo en células tumorales.

La detección de anticuerpos contra EBV en fluidos biológicos fue una de las primeras metodologías empleadas para el diagnóstico de infección por EBV. El primer ensayo descrito fue el test de Paul-Bunnell con la detección de anticuerpos heterófilos (IgM que aglutinan cuando se mezclan con hematíes de carnero o de caballo), desarrollada para el diagnóstico de la mononucleosis infecciosa. Metodologías más recientes como

inmunofluorescencia indirecta (IFI) o enzimoimmunoensayo (ELISA) para la determinación de anticuerpos dirigidos contra proteínas recombinantes del EBV han sido introducidos y se encuentran disponibles de forma comercial. Los parámetros serológicos incluyen la detección de IgG, IgM y ocasionalmente IgA, dirigidos contra EBNA (antígenos nucleares de *Epstein-Barr*), EA antígenos precoces, bien bajo el patrón de expresión EA-R restringido o EA-D células difusa y contra VCAs (antígeno de cápside). Distintos patrones de respuesta humoral han sido relacionados a infección primaria, portadores asintomáticos, reactivación viral y algunas enfermedades asociadas con EBV, como para el manejo de pacientes con Enfermedades Linfoproliferativas pos-trasplante y Carcinoma Nasofaríngeo, ya que sus niveles determinan la respuesta a la terapia. En relación al Linfoma de Burkitt y otras neoplasias, aunque han sido reportadas diferentes características de respuesta humoral, este no tiene un patrón específico que pueda ser usada como un marcador pronóstico o diagnóstico de la enfermedad (IARC, 2011).

En tejido tumoral, la presencia de EBV puede ser demostrada por pruebas comercialmente disponibles, que constan de anticuerpos contra EBNA (detectado por Inmunofluorescencia) y LMP-1 (por detección Inmunohistoquímica citoplasmática o de membrana), la determinación de EBERs por Hibridación *in situ* y/o estudios moleculares como Southern blot y PCR.

Las técnicas de Inmunohistoquímica, permite la localización de proteínas en el contexto histopatológico, facilitando la evaluación de su significancia en la enfermedad. La localización se realiza en tejidos fijados en formol y embebidos en parafina para proteínas líticas y latentes que incluyen EBNA1, EBNA2, LMP1, LMP2, BHRF1, BZLF1 y BMRF1. Su interpretación, incluye la definición del programa de latencia expresado y la localización en células de apariencia benigna o células malignas, complementando técnicas más complejas la hibridación *in situ*.

El estudio inmunohistoquímica para LMP1 es tan informativa como la Hibridación *in situ* contra EBER en Linfomas de Hodgkin, definiendo la presencia de EBV en células neoplásicas Reed-Sternberg. Sin embargo, en el Linfoma de Burkitt por su programa de latencia, proteínas codificadas son difusas, focales, o completamente indetectables por inmunohistoquímica (Gulley ML. et al, 2008). Por otro lado, EBNA-1, proteína expresada virtualmente en todos los programas de latencia, la detección por inmunohistoquímica no es lo suficientemente sensible para sustituir de forma fiable la metodología de Hibridación

in situ para EBERs, además otros problemas técnicos han sido descritos como la reacción cruzada del clon 2B4 con la proteína MAGEA4 (Melanoma-associated antigen 4) causando interpretaciones falsas positivas (Hennard C. et al 2006). Estas inmunotinciones no son recomendadas para la detección de infección por EBV porque factores técnicos y biológicos limitan su sensibilidad y en algunos casos su especificidad (Gulley ML. et al, 2008), excepto las dos excepciones de inmunohistoquímica para LMP1 en Linfoma de Hodgkin clásico y BZLF1 o BMRF1, para la detección de EBV en la leucoplasia vellosa oral, la cual representa una infección con actividad lítica en las células epiteliales.

La determinación de EBER por hibridación *in situ* es el actualmente la mejor técnica para la detección y localización de infección latente por EBV en tejidos y muestras citológicas. EBER1 y EBER2, son dos RNA no codificantes, altamente expresados en todas las formas de latencia (alrededor de 1 millón de copias por célula con infección latente), considerándose así los mejores marcadores naturales de infección latente. (Gulley ML. et al, 2008). Actualmente sistemas comerciales con diferentes sondas específicas para EBER están disponibles (ej. Ventana [Tucson, AZ], Leica [Bannockburn, IL], Dako [Glostrup, Denmark], Invitrogen [Carlsbad, CA], entre otras). La alta sensibilidad de este método hace de esta una herramienta necesaria para la confirmación de Linfoma de Burkitt asociado a EBV.

En esta técnica, falsas interpretaciones pueden ocurrir como resultado de confusión con infección latente en linfocitos de fondo y no células del linfoma, o por reactividad cruzada con mucinas, levaduras o materiales vegetales. En ganglios linfáticos de pacientes con mononucleosis infecciosa, un número variable de linfocitos puede expresar EBER, en contraste a Linfomas Hodgkin y Linfomas No Hodgkin linfocitos pequeños generalmente no expresan EBER, mientras que las grandes células tumorales expresan de forma uniforme EBER, no obstante los hallazgos clínicos y serológicos son diagnósticos y permiten la clara diferenciación.

Por otro lado resultados falsos negativos pueden ocurrir por degradación de RNA, por lo tanto un control de preservación adecuada de RNA y para del proceso de hibridación, un ensayo paralelo debería ser realizado con sonda dirigidas a RNA celular ubicuo (Benders A., et al 2010).

Ensayos de PCR son usados para la identificación del subtipo de EBV como para la determinación de la carga viral. Es una metodología con alta sensibilidad y especificidad la cual amplifica secuencias altamente conservadas y permite ser aplicada en tejidos ya fijados en formol y embebidos en parafina, gracias a la disponibilidad de reactivos e instrumentos que facilitan la extracción de ADN y cuantificación. Actualmente numerosas publicaciones con diferentes blancos a amplificar han sido descritas, e igualmente se encuentran comercialmente disponibles sondas y primer para estos ensayos.

La determinación cuantitativa del ADN de EBV en plasmas por PCR en tiempo real, permite diferenciar portadores sanos con baja carga viral, de pacientes con enfermedades relacionadas quienes muestran niveles altos de ADN. Estos pacientes con infección activa o neoplasias relacionadas a EBV muestran altos niveles de AND viral en la fracción libre de células (plasma o suero), mientras que los portadores sanos, el material genético viral se restringe al compartimiento intracelular de la sangre. La determinación de carga viral es particularmente relevante en pacientes inmunocomprometidos con enfermedades linfoproliferativas para el seguimiento y ha sido implementado también en pacientes con carcinoma nasofaríngeo y pacientes con SIDA y linfoma cerebral (Gulley ML., et al, 2008).

Nuevas perspectivas en la patogénesis.

Aunque la infección por EBV y la translocación del MYC han sido consideradas eventos característicos en la patogénesis del LB, ninguno ha sido suficiente para explicar el comportamiento del tumor. Por lo tanto la búsqueda de otros cambios genéticos cooperantes con la alteración del MYC en LB, en especial la forma de presentación “Esporádica”, fue objeto de estudios los cuales mediante el uso de herramientas de biología molecular como secuenciación de nueva generación, genómica funcional y estructural, así como estudios de microarreglos de expresión concluyeron con la identificación de un catálogo de mutaciones somáticas y nuevas vías oncogénicas involucradas en la patogénesis del LB. Entre estas, las mutaciones en los genes TCF3 (Transcription factor 3) y el gen ID3 (DNA-binding protein inhibitor) son algunos de los hallazgos más importantes y críticos para la proliferación y sobrevivencia de las células tumorales del LB. Estas mutaciones fueron identificadas en el 40% de LB Endémicos, 70% de LB Esporádicos y 67% de LB asociados a VIH, correspondiendo en el LB tipo

esporádico el 58% a mutaciones del gen ID3, 11% a mutaciones del TCF3 y en el 13% a mutaciones de ambos genes (Richter, et al 2012) (Schmitz , et al 2012) (Campo E. 2012).

Estas mutaciones están ausentes en Linfoma B difuso de célula grande (LBDCG), sugiriendo que TCF-3/ID3 juega un rol definitivo en la patogénesis del LB y que en ciertos casos, estas podrían ser usadas como herramienta para mejorar la precisión diagnóstica (Schmitz R, 2014).

Es posible que diferentes mecanismos patogénicos existan entre los tres subtipos clínicos. Estos nuevos hallazgos, dan lugar a una mejor definición de las características genéticas de este tumor y ofrecerán un mejor entendimiento de la carcinogénesis, aspectos esenciales para la búsqueda de nuevas estrategias diagnósticas y terapéutica, necesarias en regiones donde esta entidad es endémica y en países como el nuestro donde su diagnóstico es aun tardío.

4. Materiales y Métodos

4.1 Tipo de Estudio

Observacional Descriptivo, cuya población de estudio se recolecto de forma retrospectiva.

4.2 Diseño

Serie de Casos.

4.3 Población a estudio

Pacientes menores de 16 años con diagnóstico de “Linfoma de Burkitt” o “Linfoma de alto grado más probable de tipo Burkitt” o “Leucemia Burkitt” que fueron estudiados en la Fundación Hospital de la Misericordia, en el período de 2003-2013 en el Departamento de Patología.

Criterios de exclusión: Se excluirán del estudio casos diagnosticados como Linfoma de alto grado más probable de tipo Burkitt sin material histopatológico disponible. Se excluirán para la realización de microarreglos tisulares (TMA) y técnicas de Inmunohistoquímica e Hibridación *in situ* los casos que no dispongan de bloques de parafina o el material sea insuficiente o de mala calidad.

4.4 Variables

Las variables a estudiar se describen en la tabla 4.

Tabla 4
Definición de Variables.

Nombre de la variable	Definición operativa	Tipo de Variable	Escala	Codificación
Edad	Del paciente al momento del diagnóstico en años cumplidos.	Cuantitativa	Continua	Años.
Genero	Genero del paciente.	Cualitativa	Nominal dicotómica	1. Masculino 2. Femenino
Sitio Anatómico	Lugar anatómico de presentación por compromiso de Linfoma de Burkitt.	Cualitativa	Nominal politómica.	1. Extranodal. 2. Nodal. 3. Ambos Extranodal: 1. Cavidad oral; 2. Orbita; 3. Nasofaringe; 4. Hueso y tejidos blandos; 7. Cavidad Abdominal; 8.otros. Nodal: 1.ganglios cervicales, 2.ganglios torácicos, 4. otros.
Diagnóstico Histopatológico	El generado en el reporte histopatológico.	Cualitativa	Nominal politómica.	Linfoma de Burkitt; Linfoma de alto grado mas probable de tipo Burkitt. Leucemia Burkitt
Estadio Tumoral	Información reportada en la historia clínica.	Cualitativa	Ordinal.	1. Estadio I 2. Estadio II 3. Estadio III. 4. Estadio IV.
Infiltración a SNC y/o Medula Ósea	Información reportada en la historia clínica.	Cualitativa.	Nominal politómica.	1. No 2. SNC. 3. MO 3. Sin información.
Desenlace.	Resultado o evento ocurrido durante el seguimiento, reportado en la historia clínica.	Cualitativa.	Nominal politómica.	1. Remisión. 2. Recaída. 3. En tratamiento. 4. Muerte. 5. Sin información.
Inmunofenotipo	Marcadores determinados durante el diagnóstico, reportada en informe de patología.	Cualitativa	Nominal politómica.	CD20, CD10, Bcl2, Bcl6, TdT, Ki67, CD3: 1. Positivo. 2. Negativo. 3. No se realiza. 4. No interpretable/equivoco.
IgM e IgG para EBV VCA.	Reporte registrado en la Historia Clínica.	Cualitativa	Nominal politómica.	IgG neg IgM neg IgG pos IgM neg IgG pos IgM pos

Fuente: Elaboración propia.

4.5 Procedimiento

4.5.1 Fase I. Identificación de Casos

Se realizó una revisión exhaustiva de los archivos físicos y electrónicos del Laboratorio de Patología de la Fundación HOMI de la Misericordia en el periodo comprendido entre enero del 2012 y noviembre del 2013. La búsqueda de casos fue realizada de la siguiente forma:

- Para los casos diagnosticados durante los años 2003 al 2005 se realizó una búsqueda manual en los archivos físicos de reporte de quirúrgicos, seleccionando aquellos casos en cuyo diagnóstico se incluía la palabra “Burkitt”:
- Entre los años 2006 al 2013, se contaba con una base de datos en Excel, donde se utilizó la palabra “Burkitt” como filtro.

Durante la primera búsqueda se identificaron un total de 106 casos con la palabra “Burkitt”. De estos, se filtraron los correspondientes a **nuevos casos**, encontrando un total de 68 reportes cuyo diagnóstico incluyó la palabra “BURKITT” así: Linfoma de Burkitt” ó “Linfoma de alto grado más probable de tipo Burkitt” ó “Leucemia Burkitt” ó “Linfoma de célula B inclasificable, con características intermedias entre el Linfoma B Difuso de Célula Grande y Linfoma de Burkitt”.

Con un total de 68 posibles casos a estudio, se procedió a realizar la búsqueda de información clínica a través de la revisión de historias clínicas electrónicas o de archivo físico, así como la búsqueda y recolección de material histopatológico: láminas de H&E, láminas de IHQ y bloques de parafina.

4.5.2 Fase II. Recolección de datos e Instrumento para la recolección

La información de cada variable a analizar (Tabla 4) se recolectó utilizando como instrumento un formulario diseñado en la “google forms”, Ver Anexo 1.

<https://docs.google.com/forms/d/1w8P1Jcpf5XTYrnQjuJjVKOpVQMzfeLmUm0k5cS6SP6o/viewform>.

4.5.3 Fase III. Evaluación y Selección de material.

Se revisaron las láminas de H&E y de IHQ disponibles, confirmando o reevaluando la información correspondiente a morfología y expresión de marcadores de IHQ.

- Morfología: patrón de crecimiento, aspecto en cielo estrellado, tamaño nuclear, pleomorfismo, cantidad de citoplasma, forma del núcleo y presencia de nucléolos
- Inmunofenotipo

Un total de 158 bloques y más de 100 láminas histológicas fueron recuperadas y analizadas, de los cuales se seleccionaron 83 bloques para la construcción de microarreglos y estudios de Inmunohistoquímica e Hibridación in situ.

4.5.4 Fase IV. Construcción de Microarreglos de Tejido

El microarreglo tisular es una colección ordenada de pequeños cilindros de tejido dispuestos en un solo bloque de parafina, del cual se pueden obtener múltiples cortes para el montaje y evaluación no sólo histológica sino de otras técnicas como inmunohistoquímica e hibridación “*in situ*”, entre otras. Es una metodología sencilla que puede ser ejecutada fácilmente en un laboratorio de patología, con ventajas costo-efectivas.

- El primer paso para la construcción de un TMA fue la revisión de las láminas de H&E con el fin de detectar la presencia de regiones representativas de Linfoma de Burkitt. El área seleccionada fue demarcada en la lámina correspondiente, evitando tejidos hemorrágicos y necróticos. Se buscaron entonces los bloques de parafina correspondientes para sacar los cilindros, cuyo número se definió según la calidad y cantidad de material disponible.
- Una vez seleccionadas las áreas de interés, se procedió a extraer cilindros de tejido de los bloques de parafina de forma manual, usando para ello sacabocados o “punch” con diámetros entre 4-5mm.
- Se diseñaron mapas en Excel con la disposición del microarreglo, incluyendo casos a estudio y cilindros de tejidos normales que fueron usados como controles negativos (riñón); esto también para lograr una orientación de la sección al momento de examinar en el microscopio.

- Se llevó a cabo la inclusión de casos a estudio y controles negativos, siguiendo mapas generados previamente y evitando la pérdida de cilindros, intentando mantener una profundidad relativamente uniforme durante la inclusión. Esto se realizó en la central de inclusión de la Fundación Santa fe de Bogotá.

TMA para Hibridación: Un total de 9 TMA fueron construidos a partir de tejido fijado y parafinizado de 45 pacientes. El número de casos en cada bloque de TMA varió entre 7 y 17 (sin incluir cilindros de controles), con más de 50% de los casos en duplicado, según el tejido disponible. Los TMA 1-6, contaron con tres controles negativos, el TMA 1 fue organizado en 5 columnas y 4 filas con cilindros de 4 mm. Los TMA 1-8 se diseñaron con 4 columnas y 3 filas a partir de cilindros de 5 mm y el TMA 9 con 3 columnas y 3 filas, con 2 controles negativos. Los últimos tres TMA (TMA 7, 8, 9) fueron construidos como repetición de algunas muestras de las que no se obtuvo resultado o fue dudoso. El corte de los TMA fue realizado a 3 micras en láminas cargadas. Un total de 4 láminas por TMA, una de ellas para tinción de H&E, una para ensayo de ISH (EBER) y otra para FISH (c-Myc), dejando una reserva en caso de necesitar repeticiones.

TMA para Inmunohistoquímica: Se usaron los TMA construidos para complementar IHQ y se construyeron 3 TMA (TMA IHQ-A, TMA IHQ-B y TMA CD10) con material de casos cuyo inmunofenotipo por IHQ no se había realizado o no estaba disponible. El TMA IHQ-A conformado por 4 columnas y 3 filas, contaba con 3 controles negativos y el TMA IHQ-B, conformado por 4 columnas y 3 filas, incluía un control negativo. Se analizaron 13 casos con material disponible para realizar estudios de IHQ. El corte de estos TMA fue realizado a 3 micras en láminas cargadas. Un total de 5 láminas por TMA, todos para realizar marcadores de IHQ. **Ver Anexo B. Mapa de Microarreglos Tisulares.**

4.5.5 Fase V. Inmunohistoquímica

Se revisaron las láminas de IHQ disponibles, confirmando o reevaluando la información correspondiente a expresión de marcadores de IHQ y su resultado fue registrado en el formulario diseñado.

Una fase de validación de perfil de inmunohistoquímica fue realizada en casos con el material disponible. Un total de 14 casos no contaban con marcadores de IHQ, de estos 1 caso fue analizado por citometría de flujo por el grupo de Hematopatología de la Fundación Santa fe de Bogotá, siendo concordante con el diagnóstico de Leucemia Burkitt. De los 13 casos restantes, solo 7 casos contaban con material (bloques de parafina) para realizar estudios de IHQ, los cuales fueron usados para el diseño de los bloques de TMA IHQ-A y TMA IHQ-B y TMA CD10. Adicionalmente se incluyeron en estos dos TMA, seis casos cuyas laminas de IHQ no se encontraron en el archivo y su evaluación era indispensable.

4.5.6 Fase VI. Hibridación *in situ* fluorescente (FISH) para el gen MYC

Los bloques de TMA fueron evaluados para la translocación del gen MYC usando la sonda comercial **Vysis dual-color FISH break-apart probe** (Abbott Molecular). Una mezcla de dos sondas que hibridan en sitios opuestos del gen MYC (theSpectrumOrange™ labeled 5' que se extiende a través del centrómero y theSpectrumGreen™ labeled 3' la cual se extiende a través del telómero). Dicha sonda se une a corriente arriba y corriente abajo a partir de los 3 exones que origina el gene, quedando unida la sonda verde a un segmento de 407 kb hacia la región telomérica, y la roja sobre un segmento de 277kb hacia la región centromérica. Este set de sondas puede detectar reordenamientos que involucran el gen c-MYC en el cromosoma 8q24, detectando las translocaciones t(8;14)(q24;q32), t(8;22)(q24;q11) y t(2;8)(p11;q24).

El procedimiento se llevó a cabo usando el protocolo descrito en el *Kit Pathvision* que incluye Desparafinización, Pre-tratamiento, Digestión, Fijación, Desnaturalización, Hibridación, Post-hibridación y Contraste, así: Las láminas de tejido fijado en formol y embebido en parafina son **Desparafinizadas** mediante el uso de xilol y alcohol para luego ser llevadas a un proceso de **Pre-tratamiento**, donde pasan por HCL 0,2N por 20 minutos, Wash buffer (2XSSC) por 3 minutos 1-2 veces y solución de pretratamiento a 80°C durante 30 minutos, con pasos intermedios en agua destilada y solución de lavado. Luego, se lleva a cabo una **Digestión** con Pepsina a 37°C durante 10 a 30 minutos, con posteriores lavados en solución de lavado y agua. Este proceso de digestión se extendió

a 50 minutos para lograr la penetración óptima de la sonda, luego de no lograr señal en algunos casos. Las láminas son secadas en plancha a 45-50°C para seguir con el paso de **Fijación**. En este paso de fijación las láminas se sumergen en formalina/PBS al 10% durante 10 minutos con posteriores lavados y secado al calor. A continuación, las láminas son sumergidas en solución de **Desnaturalización** precalentada a 72°C de 5-8 minutos para luego ser deshidratadas con alcoholes ascendentes hasta 100%. Finalmente, la **Hibridación** es llevada a cabo siguiendo las especificaciones de la casa comercial para la preparación de la sonda. Unos pasos **post- hibridación** son necesarios antes de su evaluación (buffer post-hibridación a temperatura ambiente y/o 72°C). Se adiciona DAPI como contraste y se almacenaran en la oscuridad durante al menos 30 minutos antes de ser leídas.

La lectura se llevó a cabo en un microscopio de fluorescencia con filtros apropiados, comparando las señales visibles en el filtro triple, verde y rojo (ver grafica). Esperando observar en células con reordenamientos que involucran el gen MYC en el cromosoma 8q24 (Detección de Detección: t(2;8), t(8;22) o t(8;14), una señal de fusión amarilla (roja-verde), una roja y una verde (1A1R1V) o una señal de fusión amarilla y una verde (1A1V). Por el contrario en células normales deben ser identificadas dos señales de fusión amarillas (2A) deben ser identificadas. Se consideró como punto de corte (cutoff) porcentajes validados y usados en estudios previos **Positividad** para reordenamientos del gen MYC **Mayor del 5%** (Johnson N. et al, 2009) en un recuento de al menos **100 células**. Se tomó registro fotográfico de todas las muestras para corroborar el conteo y las láminas se conservaron a -20°C.

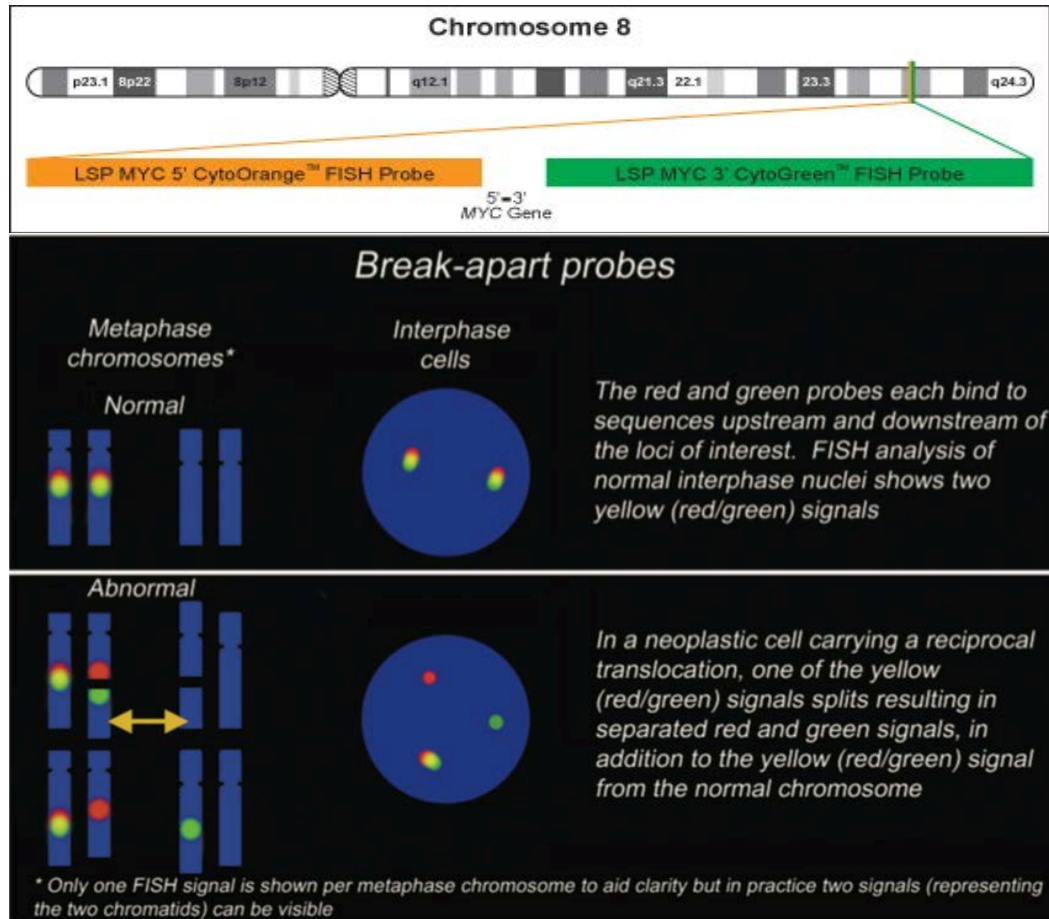


Figura 4. Sonda Break apart. Representación esquemática de las características de la sonda Break apart.

Fuente: Tomado de Ventura et al, J Mol Diagn (2006).

4.5.7 Fase VII. Hibridación *in situ* (ISH) para identificación de EBER

Los bloques de **TMA 1-9**, fueron evaluados para la expresión de EBER (Epstein-Barr virus–encode small RNA) mediante metodología de hibridación *in situ*, usando una sonda DNP (EBER 1 DNP Probe, *Ventana*), diseñada con una secuencia de oligonucleótido conjugada con 2,4 dinitrofenil. Dicha secuencia de oligonucleótido es complementaria al RNA no codificante, EBER 1 (Epstein-Barr virus–Encode RNA 1). El procedimiento se realizó siguiendo las especificaciones de manufactura e implementando un protocolo estandarizado por el Laboratorio de Patología de la Fundación Santa fe de Bogotá,

mediante la utilización del equipo *BenchMark GX* de la compañía *Ventana Medical System* que permite la automatización del proceso.

Las láminas cargadas son secadas en horno antes de ser ingresadas al equipo *BenchMark GX*. De forma breve, los pasos que se llevan a cabo de forma automatizada incluyen:

- *Desparafinización y Rehidratación.*
- *Pretratamiento:* Es llevado a cabo mediante una digestión con Proteasa 3 (Ventana), esto permite el desenmascaramiento y la recuperación de antígenos.
- *Hibridación:* Aproximadamente 100ml de la sonda DNP EBER 1 (Ventana) se aplican a cada lamina para ser hibridadas a 47°C. Esto es seguido por lavados consecutivos.
- *Detección:* La detección se realizó usando el Kit de detección (Ventana Medical Systems Blue plus Detection Kit). Este kit consiste de un Anticuerpo primario (conejo), Anti-DNP, el cual detecta las sondas marcadas con DNP y que fueron completarias a las secuencias blanco. Esto es seguido por una reacción de amplificación (anticuerpo de ratón y conejo) y la unión de un Ac secundario biotinilado (Anti IgG de ratón). Un sistema de Biotina y Estreptavidina conjugada con fosfatasa alcalina es empleado para la detección. La fosfatasa alcalina es utilizada como enzima cromogénica (sustrato BCIP/NBT), la cual genera un intenso color azul al reaccionar con el sitio blanco. Las láminas son contrateñidas por 4 minutos usando Ventana Medical Systems Red Stain II. Una vez la tinción es completada, las láminas son removidas del XT.

Las células que hibridan con la sonda son reconocidas por la tinción en forma de un punteado grueso en el núcleo de un color negro azulado. Considerando **POSITIVIDAD** con ***al menos una célula tumoral inequívoca.*** **Falsos positivos:** reactividad cruzada con mucinas, levaduras o materiales vegetales, linfocitos NO tumorales. **Falsos Negativos:** degradación RNA (Gulley, M. L et al. 2002) (C.H. Dunphy, 2010)

Se usaron controles positivos incluidos en el protocolo del Laboratorio FSB y como control negativo tejido renal incluidos en TMA.

4.6 Análisis Estadístico

Se realizará una descripción estadística (frecuencias, media, mediana y rango) de las diferentes variables demográficas y clínicas más relevantes para el conocimiento de la población. Luego de ello, se efectuarán análisis bi-variados a través de pruebas de asociación entre las variables demográficas, clínicas y patológicas junto con las variables a determinar (expresión de EBER y translocación del gen c-myc). Para esto, se emplearán las pruebas de significancia estadística Chi-cuadrado de Pearson en variables cualitativas y Test Wilcoxon en variables cuantitativas dependiendo de su distribución.

4.7 Posibles dificultades y fuentes de error.

La carencia de información en la Historia Clínica, puede limitar el análisis estadístico de ciertas variables. Adicionalmente el que el material se insuficiente, de mala calidad o no disponible para la realización de todas las técnicas y análisis de biología molecular.

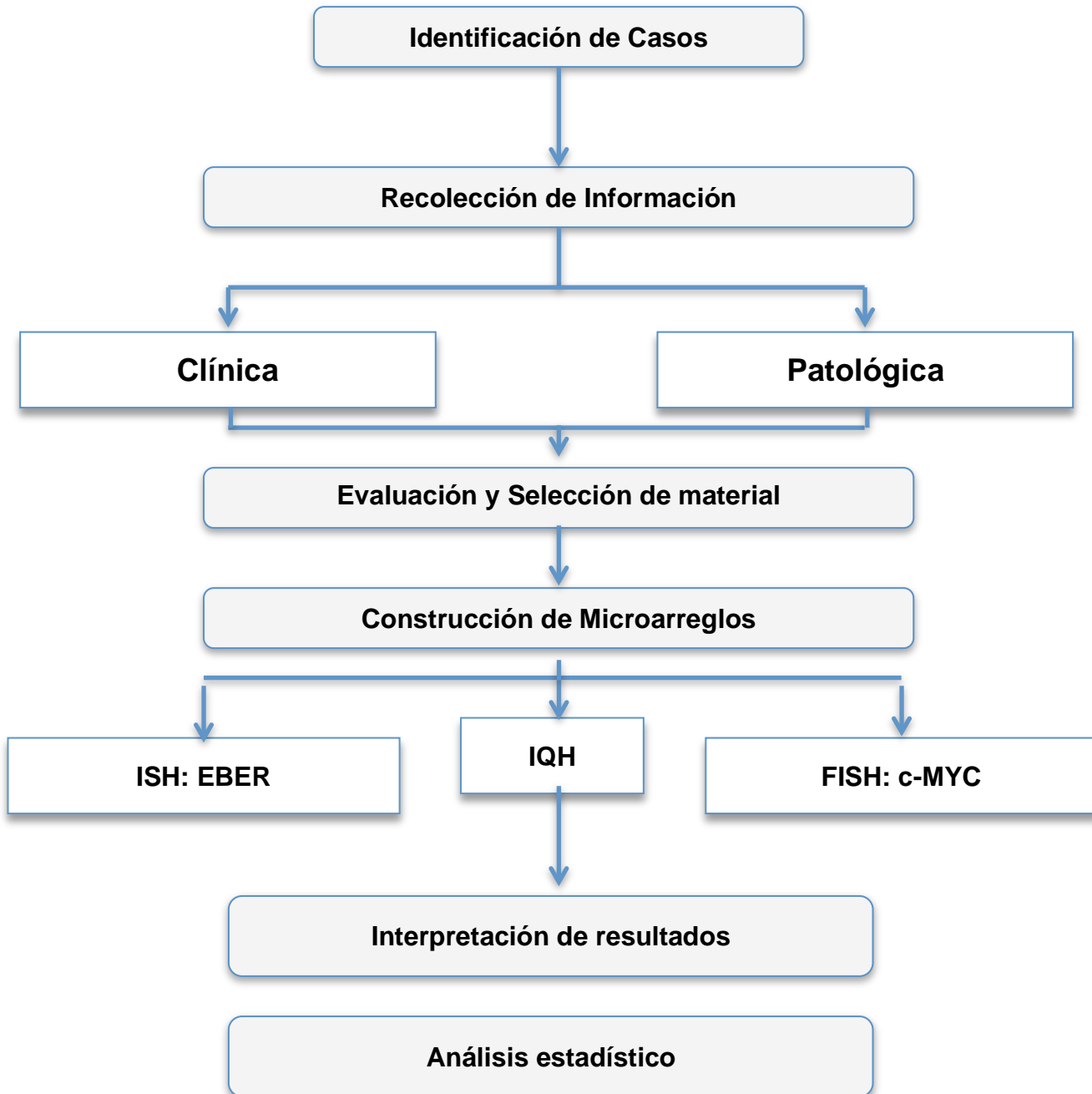


Figura 5. Flujograma de trabajo.

Fuente: Elaboración propia

5. Cronograma de Actividades

Tabla 5
Cronograma de actividades.

AÑO.	2012	2012	2013	2013	2014	2014	2015	2016
Semestre	1	2	1	2	1	2	1-2	1-2
Revisión de la Literatura	X	X						
Diseño del Trabajo		X	X					
Recolección de Información Clínica y Patológica.				X	X			
Diseño y construcción de Microarreglos de tejido.					X	X		
Montaje y evaluación de pruebas de hibridación in situ (EBER y MYC) e IHQ						X	X	
Análisis de Resultados								X
Entrega de Documento								X

Fuente: Elaboración propia.

6. Consideraciones éticas

La ejecución del presente trabajo se acogió a la reglamentación planteada en la Resolución No. 008430 de 1993 (4 de octubre de 1993) del Ministerio de Salud de Colombia, que establece las normas académicas, técnicas y administrativas para la investigación en salud, así como a las recomendaciones para investigación biomédica de la Declaración de Helsinki de la Asociación Médica Mundial.

Este estudio es clasificado como Investigación sin riesgo debido al diseño retrospectivo, en el cual no se realizó ninguna intervención o modificación intencionada de las variables biológicas, fisiológicas, psicológicas o sociales de los pacientes a los cuales se les estudió el material patológico obtenido de sus lesiones. (Título II Capítulo I, Resolución No. 008430 de 1993)

En este estudio prevalece el criterio de respeto a la dignidad y la protección de la privacidad del paciente (artículo 5 y 8). No se diseñó, ni aplicó un consentimiento informado, al ser este un estudio de tipo retrospectivo, cuya información se obtuvo mediante la revisión de historias clínicas e informes de patología. Los resultados serán publicados en revistas de índole académica y científica, preservando la exactitud de los mismos y haciendo referencia a datos globales y no a pacientes particulares.

Este estudio fue presentado para su aprobación por parte del Comité de Ética tanto de la Fundación HOMI Hospital La Misericordia como de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional de Colombia, cumpliendo con los parámetros señalados para su aprobación.

7. Resultados

Un total de 66 pacientes con diagnóstico de Linfoma de Burkitt (51 pacientes), Leucemia Burkitt (1 paciente) y Linfoma de alto grado más probable de tipo Burkitt (14 pacientes) fueron identificados. En este último grupo se excluyeron 8 casos cuyo diagnóstico no podía ser confirmado al no contar con material histopatológico que permitiera la evaluación y/o realización de estudios complementarios. En la tabla 1 se presenta la distribución de los diagnósticos histopatológicos en la población estudiada.

Tabla 6

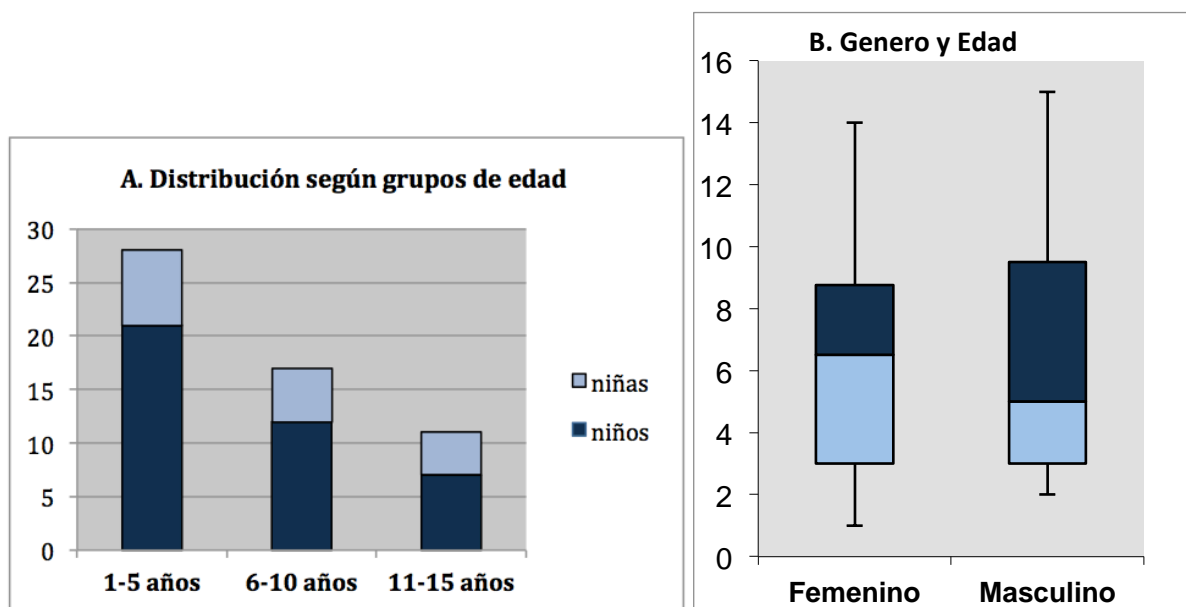
Diagnóstico Histopatológico de casos incluidos en el estudio.

Diagnóstico Histopatológico	N=58	(%)
Linfoma B tipo Burkitt.	51	(87,9%)
Linfoma de alto grado mas probable de tipo Burkitt*	6	(10,3%)
Leucemia Burkitt	1	(1,7%)

Fuente: Elaboración propia. * 8 casos excluidos.

7.1 Características Clínicas

Se observó un predominio de casos del género masculino con una relación de 2,6:1 (42M:16F), 72,4% hombres y 27,6% mujeres. El rango de edad de presentación abarcó desde 1 hasta 15 años, con una media de 6,3 años y desviación estándar de 3,7 años. El 80,4% de los casos eran menores de 10 años (50% entre 1 a 5 años; 30,4% entre 6-10 años y 19,6% entre 11-15 años. Ver gráfica 1). En dos casos la edad no fue reportada y no se disponía de historia clínica. Entre los géneros no se encontraron diferencias estadísticamente significativas en relación a la edad de presentación con una mediana de edad en el género masculino de 5 años y en el género femenino de 6,5 años ($p=0.81$ Wilcoxon Rank sum test).



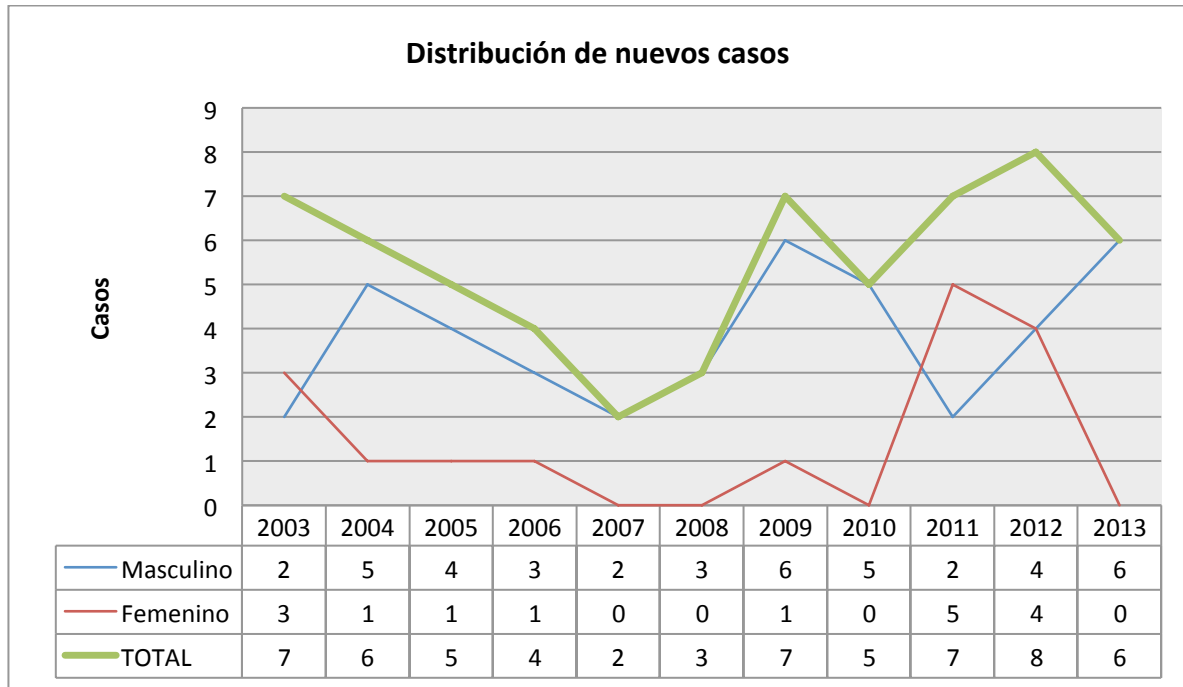
Gráfica 1. Características demográficas. A, Distribución según grupos de edad. B, Género y edad.

Fuente: Elaboración propia.

La distribución de nuevos casos en el tiempo, mostro picos de mayor incidencia para el año 2009 y 2012, conservando en su mayoría una mayor proporción de casos del género

masculino, excepto por el año 2011 y 2003 con una relación masculino/femenino de 0,4:1 y 0,6:1 respectivamente. (Ver gráfica 2)

Solo en 44 (86,2%) casos la historia clínica estuvo disponible, observando las siguientes características clínicas.



Gráfica 2. Distribución de nuevos casos diagnosticados entre 2003-2013 en el Hospital HOMI.

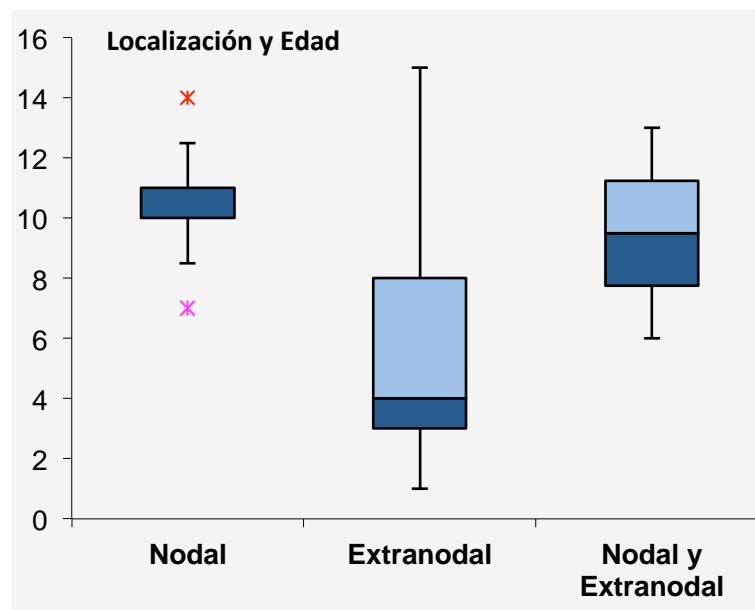
Fuente: Elaboración propia.

Localización.

El 87,9% de los casos se presentaron con compromiso extranodal (51/58 pacientes), mientras que el compromiso nodal fue observado en el 8,6% de los casos (5/58 pacientes). Sin diferencias estadísticamente significativas entre géneros y presentaciones nodales o extranodales (Extranodal: 74,5%M vs 25,5%F y Nodal: 40%M vs 60%F; chi2 p>0,05). En 2 casos (3,4%) la presentación fue tanto nodal como extranodal. La edad en

los casos de presentación nodal fue mayor a diferencia de las otras localizaciones (Nodal: mediana 11 años; Extranodal: mediana 4 años y Nodal/extranodal: mediana 9,5 años. Ver grafica 3). Entre las localizaciones extranodales, destacan como sitio de afectación la cavidad abdominal con un 94,4% de casos (50/53), seguido de nasofaringe con 3,8% (2/53) y Orofaringe con 1,9% (1/53).

Al analizar los casos que comprometieron la cavidad abdominal (50 casos) se identificaron 41 casos (77,4%) limitados a cavidad abdominal, pero en 5 casos (9,4%) se observó compromiso asociado de cavidad oral, en 1 caso (1,9%) de cavidad abdominal y orbita, así como 1 caso en cavidad abdominal y nasofaringe, 1 en cavidad abdominal y huesos largos y 1 caso con presentación en cavidad abdominal, orbita y cavidad oral correspondiendo al 1,9% cada uno. (Ver gráfica 5).



Gráfica 3. Localización tumoral y Edad de presentación.

Fuente: Elaboración propia.

En cavidad abdominal predominó el compromiso de la región ileocecal, con un 44% (22/50), seguidos por Abdomen sin localización especificada (NOS) y Abdomen masivo, con 24% (12/50) y 18% (9/51) respectivamente. En los 9 casos registrados como “Abdomen Masivo” existían grandes masas o el compromiso de múltiples órganos

incluyendo: Riñones, Estómago, Hígado, Epiplón, Yeyuno y Duodeno, entre otros. Otras localizaciones encontradas fueron el estómago, mesenterio, renal bilateral y compromiso Intrarraquídeo- extradular.

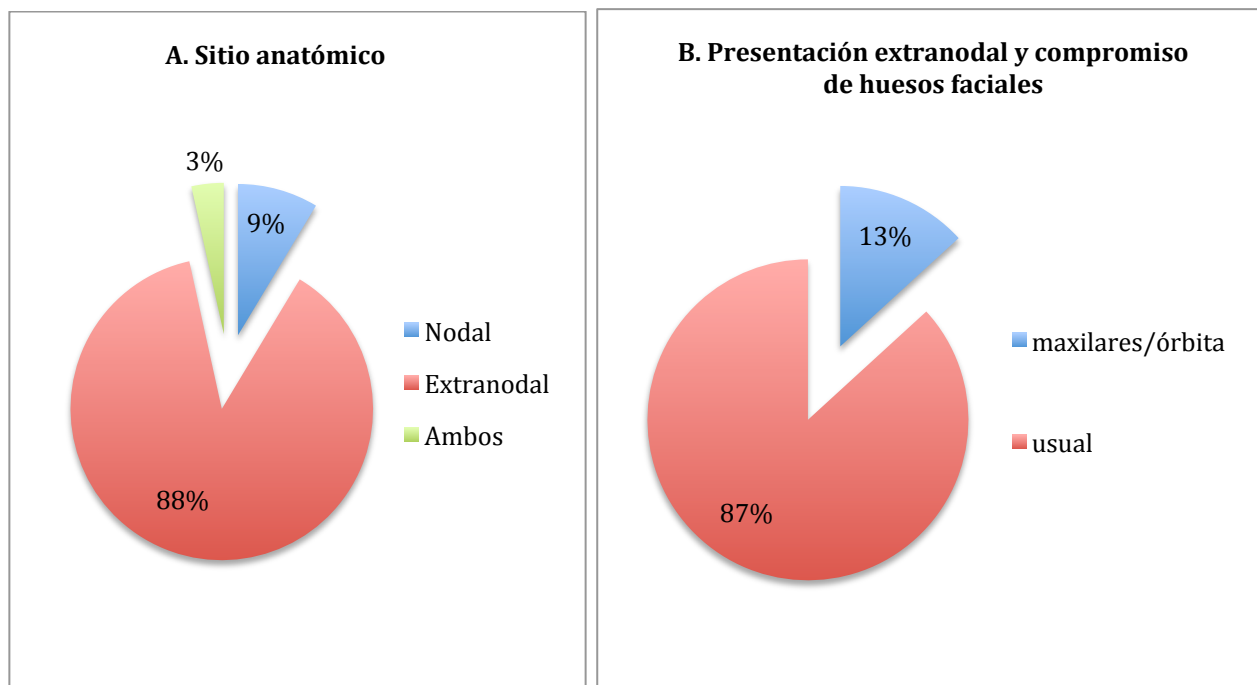
Respecto al compromiso en cavidad oral (6 casos), así como órbita (2 casos) estos son considerados inusuales para la forma de Linfomas de Burkitt esporádico y correspondieron al 13% del total de formas extranodal (Gráfica 4B); comprometieron hueso maxilar, hueso mandibular, fosa pterigomaxilar, hueso malar y piso de orbita. En la gráfica 4 se representan la distribución del sitio anatómica (Gráfica 4A) y localización extranodal (Gráfica 4B y 5). El compromiso designado como orofaringe en un caso correspondía a infiltración de amígdalas palatinas.

Entre los pacientes con enfermedad Nodal, 5/7 (71,4%) casos tenían adenopatías cervicales.

Uno de los pacientes que cursó con una enfermedad agresiva y muerte fue llevado a autopsia clínica, encontrando compromiso extenso del Linfoma de Burkitt infiltrando masivamente páncreas, hígado, riñones, bazo, cadenas ganglionares, pulmón, estómago, pleura, timo, tejidos blandos, medula ósea y SNC.

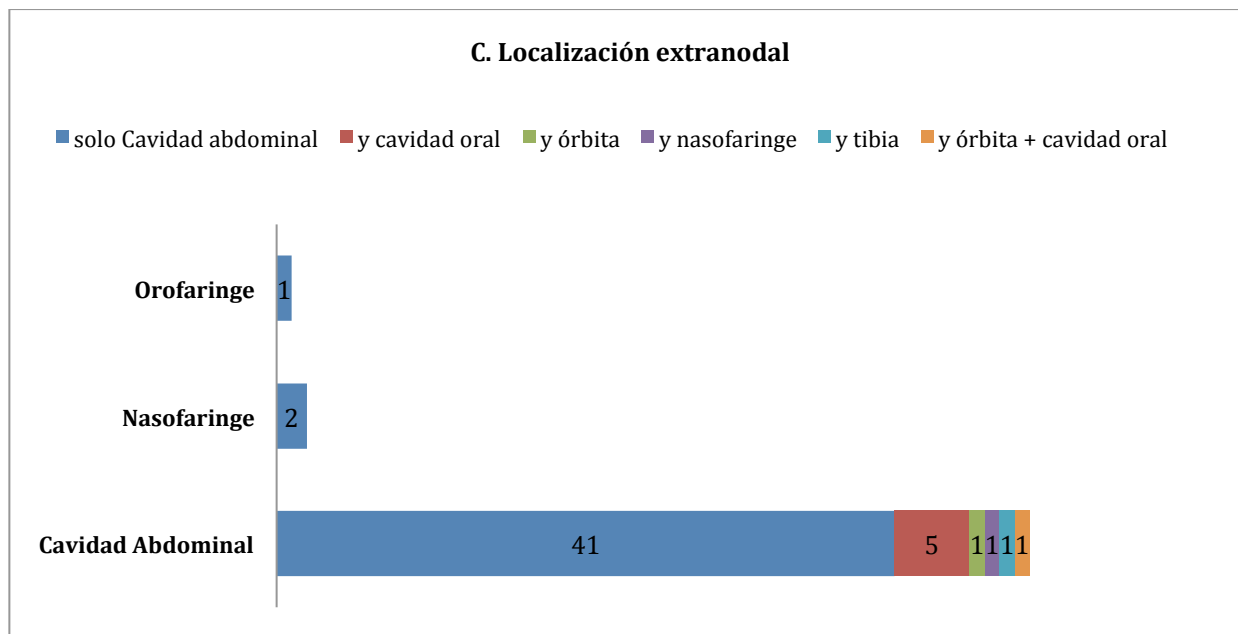
Antecedentes.

Identificamos como antecedente de mayor frecuencia la presencia de algún tipo de cáncer familiar correspondiendo a 14/44 casos (31.8%), de los cuales el 76,5% se trataron de familiares de primer y segundo grado. Otros antecedentes aislados reportados fueron riñones poliquísticos, hidronefrosis y transposición de grandes vasos. En ningún caso se encontró antecedente de inmunodeficiencias adquiridas o congénitas, excluyendo la posibilidad de incluir en el estudio casos de Linfoma de Burkitt asociado a inmunodeficiencias.



Gráfica 4. Características clínicas. A. Distribución del sitio anatómico de presentación. B, Presentación extranodal y compromiso de huesos faciales.

Fuente: Elaboración propia.



Gráfica 5. Características clínicas. Localización extranodal.

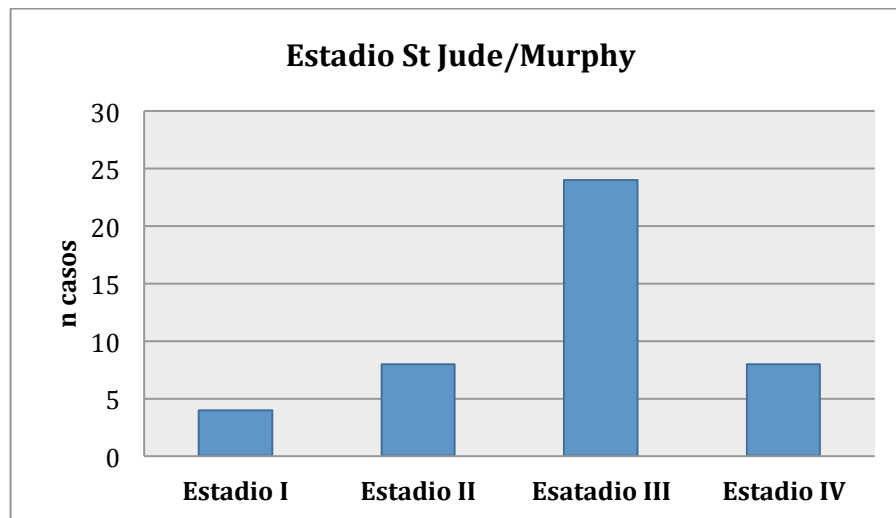
Fuente: Elaboración propia.

Infiltración.

En 44 pacientes se obtuvo información sobre la presencia o no de infiltración a Médula Ósea y/o SNC, encontrando que el 81,8% (36/44) de los casos no presentaron infiltración durante el estudio de estadificación. En el 11,4% (5/44) de los casos se encontró infiltración tanto a SNC como a MO, en el 4,5% (2/44) infiltración a MO y el 2,3% (1/44) infiltración solo a SNC. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre el género y la infiltración (test exacto de Fisher $p=0,25$)

Estadio.

En su mayoría los pacientes se presentaron en estadios avanzados (estadios III y IV de St Jude/Murphy) con un total de 33 pacientes que correspondieron al 72,7%, de los cuales el 54,5% se encontraron en Estadio III y el 18,2% en estadio IV. En los estadios tempranos (I y II de St Jude/Murphy) un total de 12 casos fueron identificados (27,3%), 9,1% en Estadio I y 18,2% en Estadio II. Sin encontrar diferencias entre sitios anatómicos de presentación y estadios (I/II: 82% extranodales y III/IV 91% extranodales; $p=0,3$) (Ver gráfica 6). Edades mayores se encontraron entre estadios avanzados (mediana: 4 años I/II vs 6 años III/IV; Rank sum test $p=0,89$) aunque sin significancia estadística en parte a la pequeña muestra representada.



Gráfica 6. Análisis de Estadio Tumoral.

Fuente: Elaboración propia.

Serología EBV.

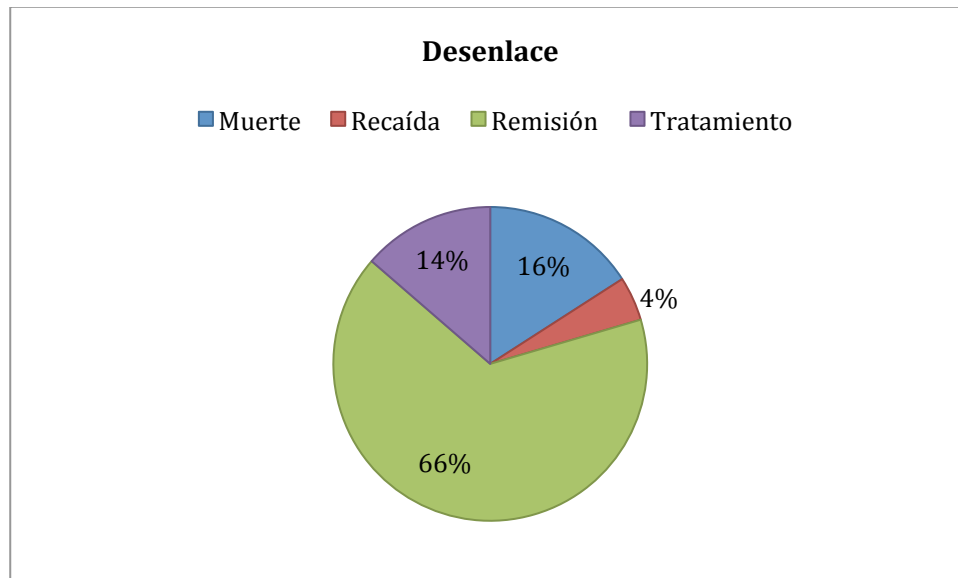
Solo a partir de del 2008 se observó la inclusión del estudio serológico para EBV entre la población estudiada, con un total de 18 resultados. La prueba realizada en todos los casos correspondió a un ELISA IgG e IgM contra antígeno de la cápside (VCA). 15/18 casos que correspondían al 83,3% mostraron IgG positiva e IgM negativa cuyo perfil serológico podría indicar infección primaria en fase tardía infección pasada o reactivación; seguido en frecuencia por un perfil IgG e IgM negativos en 2/18 (11,1%). Un solo caso (5,6%) tuvo tanto IgG como IgM positiva, lo que puede significar una infección primaria en fase aguda o infección pasada con IgM persistente. Uno de los dos casos con ELISA negativo tanto para IgG como IgM correspondía a una paciente femenina de 14 años con LB de presentación nodal, estadio I y con remisión de la enfermedad. El segundo caso correspondía a un paciente masculino de 2 años con LB de presentación extranodal en región ileocecal, estadio II y de igual forma en remisión de la enfermedad.

Aunque con una muestra de pacientes pequeña (n=16), la edad media entre los casos con serologías reactivas (IgG anti-VCA EBV positiva) fue de 6,3 años \pm 3,8años.

Seguimiento y Desenlaces.

La mayoría de los pacientes fueron seguidos durante un año o menos, algunos posiblemente por continuar su manejo en otras instituciones, pérdida de información o pacientes que se encontraban en su primer año de seguimiento al momento de recolectar la información. Con un seguimiento entre 1 a 10 años (3,7 años), distribuidos así: el 31,8% (14/44) contaban con un seguimiento de 1 año o menos, el 50% (22/44) con seguimiento entre 2 y 5 años y el 18,2% (8/44) con más de 5 años. Durante el seguimiento 29/44 pacientes cursaron con remisión de la enfermedad (66,7%) y 6/45 pacientes (13,3%) se encontraban en tratamiento (Ver gráfica 7). Como desenlaces desfavorables considerados Muerte y Recaída (20,5%), observamos que 7/44 pacientes murieron a causa de complicaciones asociadas la enfermedad y del tratamiento con sepsis secundaria (15,9%) 2 pacientes (4,5%) presentaron recaídas. Todos los casos cuyo desenlace se consideró adverso ocurrieron durante el primer año (χ^2 $p < 0.001$) y el 88,9% ocurrieron en el genero masculino (Test exacto de Fisher $p < 0.01$). La ausencia de infiltración se relacionó

de forma significativa con el evento de remisión ($\chi^2 p < 0.01$), con 100% de desenlaces adversos en pacientes con estadios avanzados (III-IV) y no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre la presentación nodal o extranodal y el desenlace ($\chi^2 p = 0,3$).



Gráfica 7. Análisis de Desenlace en casos estudiados.

Fuente: Elaboración propia.

Las muertes ocurrieron en los años 2004 y 2009 y las causas fueron relacionadas con progresión de la enfermedad y con procesos infecciosos secundarios a la terapia. Se observaron además casos con morbilidades asociadas a la enfermedad o al tratamiento, como ACV, Epilepsia focal secundaria, Xifosis y ceguera secundaria a compromiso de nervio óptico y pacientes con eventos probablemente no relacionados como un caso de teratoma maduro testicular.

Tratamiento.

Entre los pacientes evaluados se identificaron varios protocolos de tratamiento, de los cuales el más frecuente correspondió al protocolo LNHB 89-96 (Sociedad Francesa de Oncología Pediátrica: 21/43 pacientes) con un 48,8% de casos. Entre otros esquemas se

encontró COMP (ciclofosfamida, vincristina, metrotexate y prednisolona; 12 pacientes, 27,9%); COPADM (vincristina, prednisolona, metrotexate, ácido folínico, ciclofosfamida, doxorubicina, intratecal: metrotexate e hidrocortisona.: 2 pacientes, 4,7%); LNH-BFM 90 o LNH-BFM 90/95 (Grupo Berlín-Frankfurt-Muster: 6 pacientes, 14%); Otras poliquimioterapias (2 pacientes, 4,7%). Los 2 pacientes con recaída requirieron terapia de rescate con R-ICE y uno de ellos Trasplante autólogo de MO. En 5 pacientes se asoció el manejo con radioterapia holoencefálica y/o raquis.

Regiones geográficas.

Se obtuvo representación de pacientes procedentes de las cinco regiones del país. Con un total de 50 casos con datos registrados se identificó que el 70% (36/50) correspondían a la región Andina, 14% (7/50) región del Pacífico, 12% (6/50) región de la Orinoquia y 2% (1/50) tanto para la región de la Amazonia como la región Caribe.

Tabla 7
Características Clinicopatológicas de la Población estudiada.

Genero	n=58
Masculino	42 (72.4%)
Femenino	16 (27.6%)
Edad	n=57
Rango	2-15 años
Media	6,3 años \pm 3,7años.
Región de residencia o procedencia	n=50
Región Amazonía	1 (2,0%)
Región Andina	36 (70,0%)
Región Caribe	1 (2,0%)
Región Orinoquía	6 (12%)
Región Pacífico	7 (14,0%)
Sitio anatómico	n=58
Nodal	5 (8,6%)
Extranodal	51 (87,9%)
Ambos	2 (3,4%)
Localización extranodal	n=53
Cavidad abdominal	41 (77,4%)
Cavidad abdominal y cavidad oral	5 (9,4%)

Cavidad abdominal y orbita	1 (1,9%)
Nasofaringe	2 (3,8%)
Orofaringe	1 (1,9%)
Cavidad abdominal y nasofaringe	1 (1,9%)
Cavidad abdominal y huesos largos	1 (1,9%)
Cavidad abdominal, orbita y cavidad oral	1 (1,9%)
Cavidad abdominal	n=50
Región ileocecal	22 (44%)
Abdomen Masivo	9 (18%)
NOS	12 (24%)
Retroperitoneo	2 (4%)
Otros	3 (10%)
Localización Nodal	n=7
Ganglios cervicales	5 (71,4%)
Ganglio torácicos y otros	2 (28,6%)
Estadio clínico	n=44
I	4 (9,1%)
II	8 (18,2%)
III	24 (54,5%)
IV	8 (18,2%)
Tratamiento	n=43
COMP	12 (27,9%)
LNHB 89	21 (48,8%)
BFM 90 o 95	6 (14%)
Otro	2 (4,7%)
COPADM	2 (4,7%)
Infiltración	n=44
Medula ósea y SNC	5 (11,4%)
Medula ósea	2 (4,5%)
SNC	1 (2,3%)
No	36 (81,8%)
EBV	n=51
No se realizó o sin información	40 (69,0%)
IgG pos IgM neg	15 (25,9%)
IgG neg IgM neg	2 (3,4%)
IgG pos IgM pos	1 (1,7%)
Seguimiento	n=44
Menor o igual a 1	14 (31,8%)
Entre 2 y 5	23 (50%)
Mayor de 5	8 (18,2%)
Evento	n=44
Muerte	7 (15,9%)

Recaída	2 (4,5%)
Remisión	29 (65,9%)
Tratamiento	6 (13,6%)
ANTECEDENTES	n=44
Algún familiar Ca	14 (31,8%)
No Cáncer familiar	30 (66,2%)

Fuente: Elaboración propia. COMP (ciclofosfamida, vincristina, metrotexate y prednisolona) COPADM (vincristina, prednisolona, metrotexate, ácido folínico, ciclofosfamida, doxorubicina, intratecal: metrotexate e hidrocortisona) LNH-BFM: Linfoma No Hodgkin- Berlín-Frankfurt-Muster: SNC, sistema nervioso central. NOS, no especificado.

7.2 Características Morfológicas e Inmunofenotipo

Morfología

Se evaluó el patrón de crecimiento, aspecto de cielo estrellado, tamaño nuclear, pleomorfismo, cantidad de citoplasma, forma del núcleo y presencia de nucléolos. En todos los casos se observó una infiltración tumoral difusa con presencia de cielo estrellado por numerosas figuras mitóticas y cuerpos apoptóticos. Exceptuando dos casos, las células tumorales eran monótonas, de tamaño mediano con presencia de núcleo redondo, múltiples nucléolos y citoplasma escaso. En la figura 6, se presenta un caso representativo que muestra las características morfológicas típicas descritas.

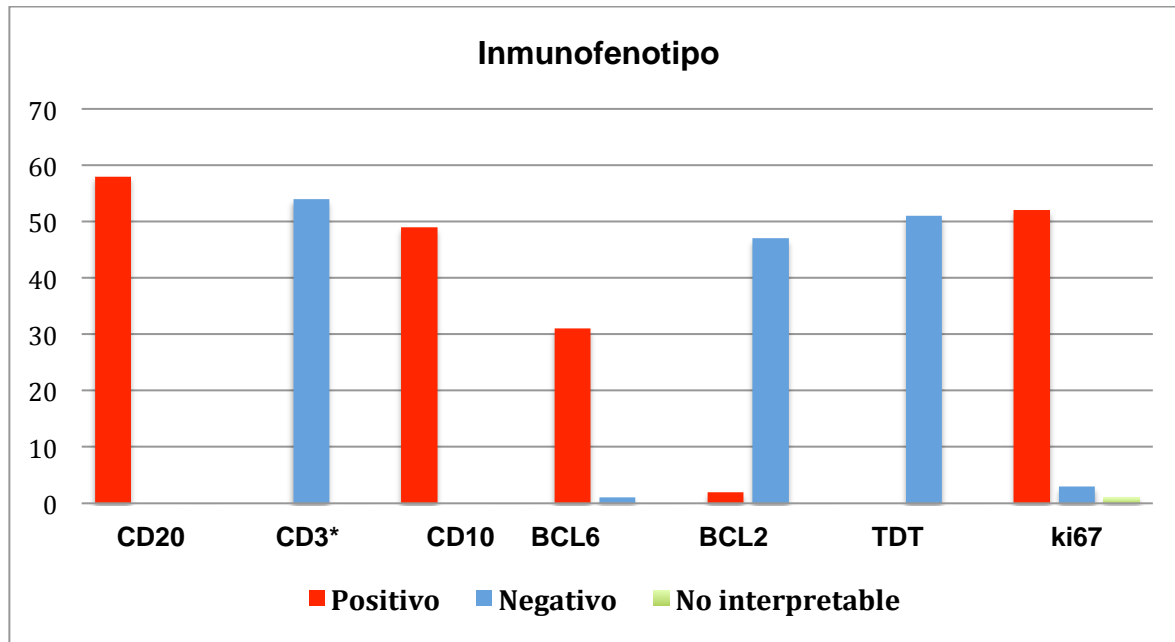
Los dos casos restantes, uno exhibía un patrón de infiltración difuso no monótono, conformado por células grandes a intermedias, con núcleos irregulares con marcada variación en forma y tamaño, cromatina vesiculosa y citoplasma eosinófilo, hallazgos morfológicos no concordantes con el diagnóstico de LB. El otro caso, mostraba un patrón de infiltración difuso, con presencia de cielo estrellado y células de tamaño intermedio cuyos núcleos exhibían cierto grado de variabilidad en tamaño y forma, así como una cromatina más grumosa. Este último, compatible con un Linfoma Inclasificable, con hallazgos intermedios entre LB y LBDCG (Linfoma B de alto grado, NOS en clasificación OMS 2016).

Inmunohistoquímica.

48 casos contaron con reporte de inmunohistoquímica interpretada en el departamento de patología de la Fundación HOMI y en 1 caso el inmunofenotipo fue establecido mediante citometría de flujo realizado en la Fundación Santa Fe de Bogotá. En total 20 diferentes paneles de IHQ que incluyeron marcadores: CD20, CD79, CD10, Bcl2, Bcl6, CD3 o CD5, Ki67, Tdt, CD30, LMP-1 fueron encontrados en los reportes, siendo el más frecuente con un 20%, CD20, CD10, Bcl2, CD3, Ki67, Tdt. No obstante en esta primera evaluación, los marcadores con mayor frecuencia no incluidos en el inmunofenotipo diagnóstico fueron en orden Bcl6, CD10 y Bcl2, para estos dos últimos hasta un 35% de casos, cosa que ocurrió especialmente en los primeros cinco años.

Los 9 casos restantes sin información de IHQ correspondieron a 6 casos con diagnóstico inicial de Linfoma B de alto grado más probable de tipo de Burkitt y 3 casos de LB. Para validar estos casos, en especial los casos probables y para completar perfiles inmunofenotípicos incompletos, se llevaron a cabo los estudios de IHQ necesarios en el Laboratorio de la Fundación Santa fe de Bogotá. Mediante el uso de TMA se realizaron inmunotinciones para CD20, CD10, Bcl2, CD3, Ki67, Tdt, Bcl6. Los resultados de estudios de inmunohistoquímica se resumen en la gráfica 8.

Como se observa en la gráfica 8, de forma global la mayoría mostraron un inmunofenotipo concordante con el diagnóstico de LB de acuerdo a la clasificación de la OMS, con CD20+, CD10+, Bcl-6+/-, CD3-, Bcl-2- y Ki-67 >90%. Los marcadores no realizados fueron consecuencia de las limitaciones del tejido y en un caso el diagnóstico se llevo a cabo por estudio de citometría que no incluyó Tdt, Bcl6 y Ki67. Así, en el 79% de los casos se confirma fenotipo CD20+ y Bcl2-, los restantes correspondieron a casos sin disponibilidad de material y dos con expresión de Bcl2 en la re-evaluación



Gráfica 8. Características inmunofenotípicas de casos estudiados.

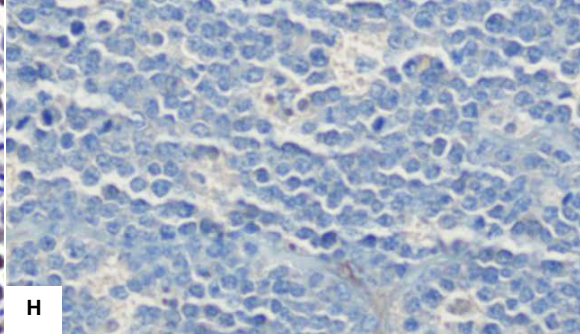
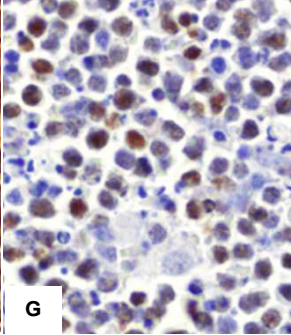
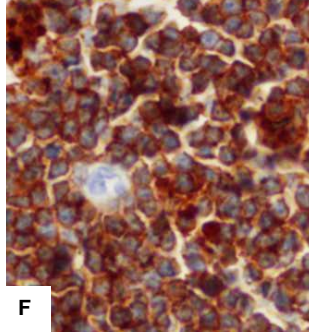
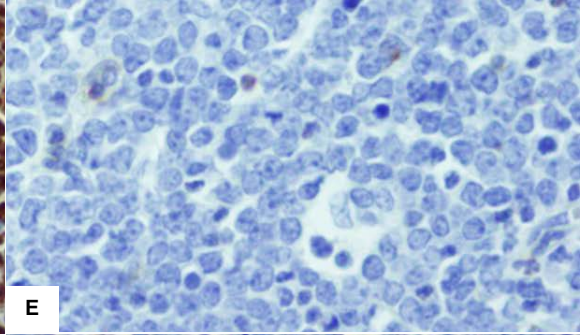
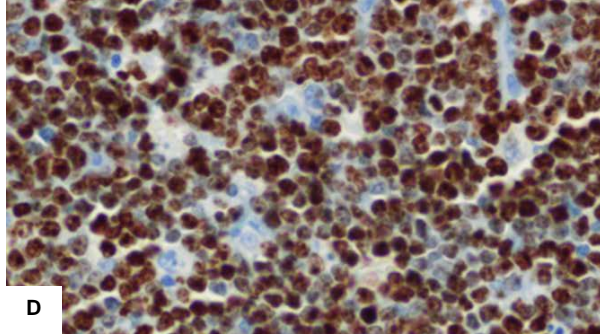
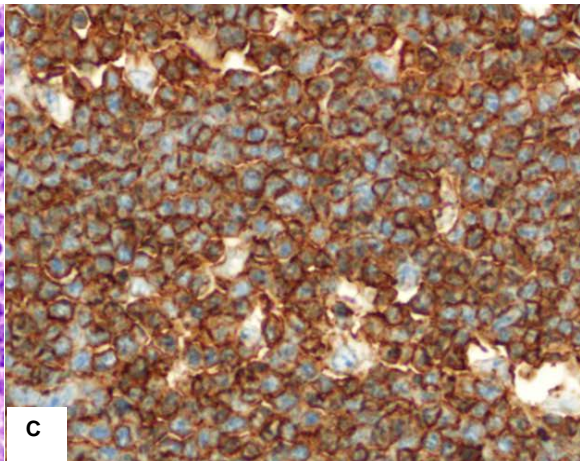
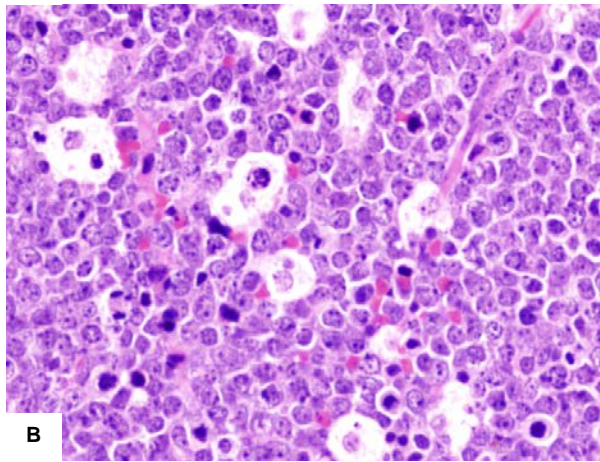
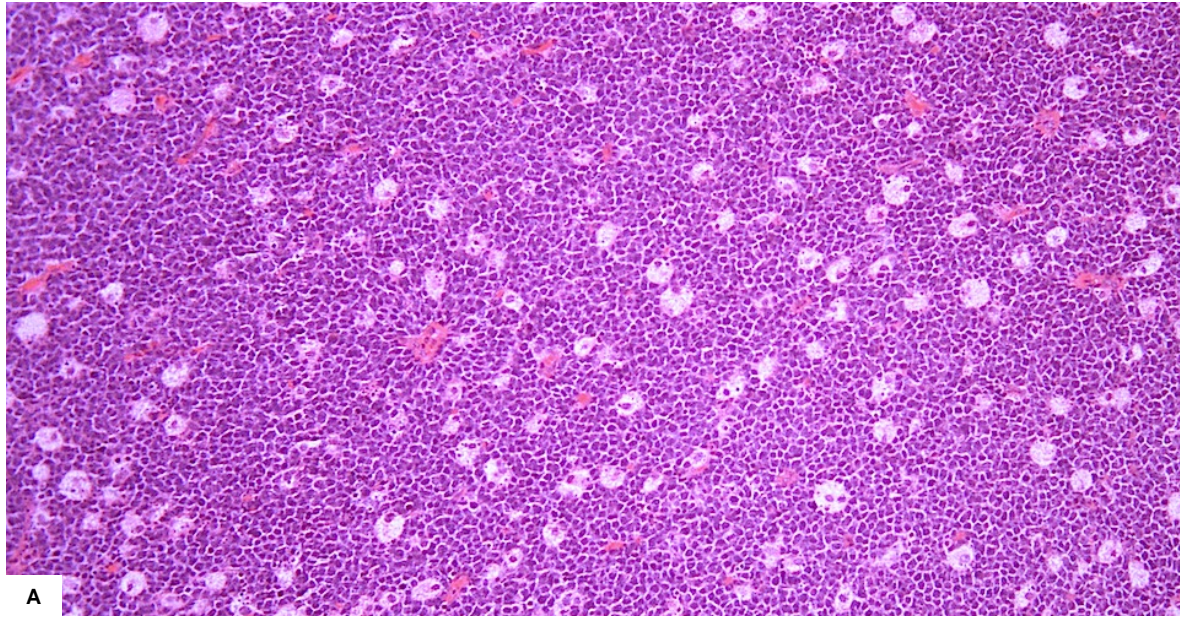
Fuente: Elaboración propia.

En todos los casos hubo expresión de CD20 en células tumorales (58/58), así como de otros marcadores de células B, entre estos CD79 presente en 5 casos y PAX 5 en un caso aislado. El marcador CD10 se analizó en 49 casos, siendo todos positivos. Se encontró expresión nuclear de BCL6 en 31/32 casos (96,8%) y el marcador Tdt fue negativo en todos los casos analizados (51/51). El índice de proliferación evaluado con ki67 fue mayor al 90% (entre 95-100%) en 52/56 y en tres casos del 90%, encontrando en dos importantes limitaciones de interpretación por defectos de fijación. Como marcador de células T, 55 casos emplearon CD3 y en 3 casos solo se disponía de CD5, siendo todos negativos en células tumorales y presentes solo en ocasionales linfocitos acompañantes. La expresión de Bcl2 fue negativa en 47/49 casos, con alguna positividad observada de forma aislada en linfocitos T acompañantes y ninguna superando el 30%. Sin embargo dos casos presentaron un inmunofenotipo más atípico, uno de ellos con expresión difusa y de intensidad moderada para Bcl2 el cual se acompañaba de morfología más atípica y compatible con LBDCG. El segundo caso, con expresión débil y focal de Bcl2 en células tumorales y con citología más atípica, compatible con Linfoma B difuso no clasificable, como se comentó previamente.

De los 6 casos incluidos y cuyo diagnóstico histopatológico inicial fue “Linfoma de Alto grado más probable de tipo Burkitt”, 5 casos mostraron un inmunofenotipo compatible con LB. Con expresión de CD20+, CD10+, Bcl6+, Bcl2-, Tdt - y Ki67% >90%. En solo un solo caso se encontraron defectos de fijación que limitaron la evaluación de IHQ, con CD20+, CD10+, Bcl6+, Bcl2-, Tdt - y Ki67% >90%.

En un caso se valoró la presencia de EBV usando el marcador LMP-1, siendo negativo como se esperaba dado el tipo de latencia encontrando en el LB. Entre otros marcadores incluidos en durante el diagnóstico inicial de forma aislada, fueron CD45 (+) y MUM1, CD99, PAX5, CD4, CD2, AKL, EMA, NSE todos negativos.

Figura 6. Caso 43, Hallazgos morfológicos y de inmunofenotipo A. H&E 40x B. H&E 400x. C. CD20; D. Ki67; E. Bcl2; F. CD10; G. Bcl6; H. Tdt.



7.3 Características Moleculares

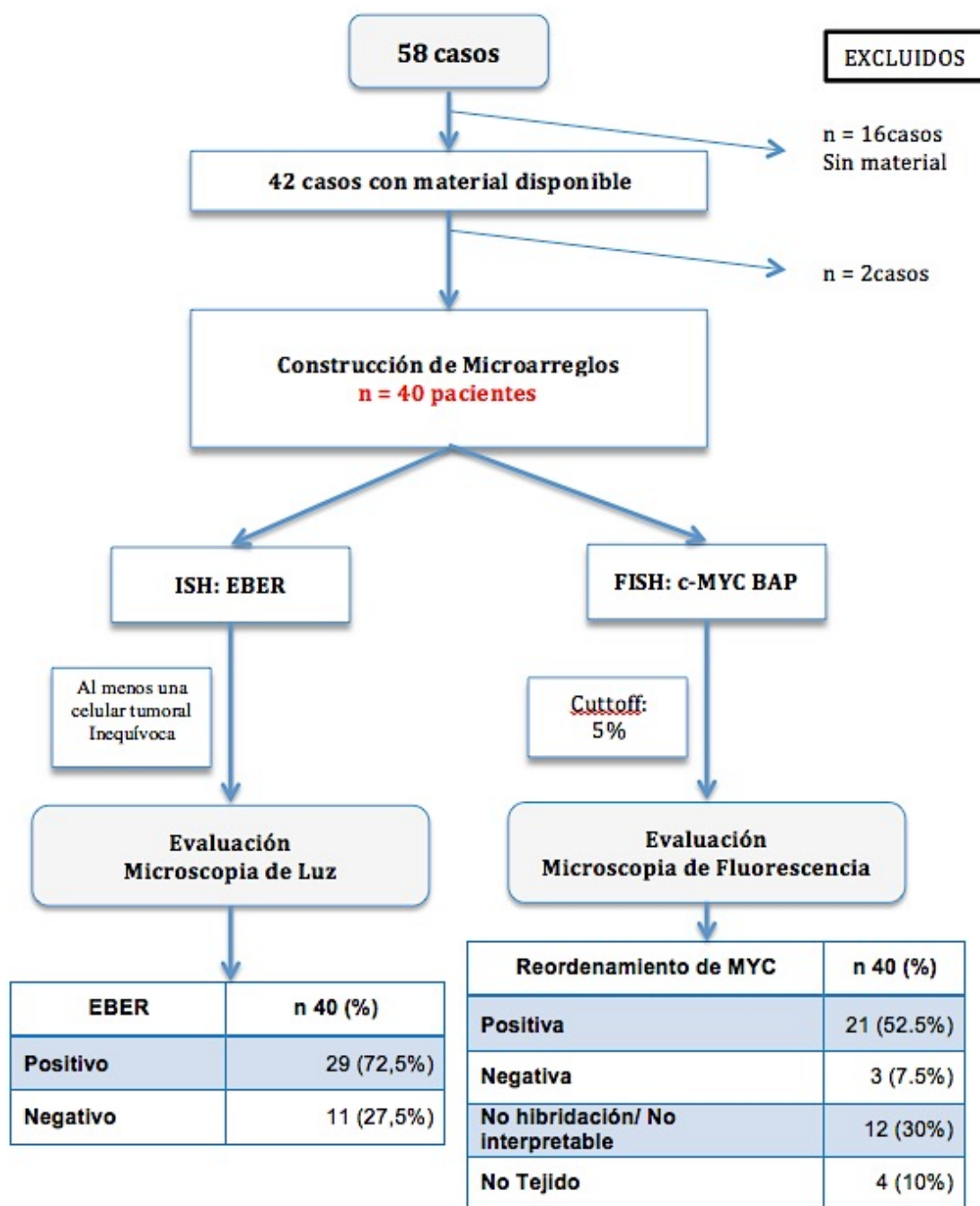


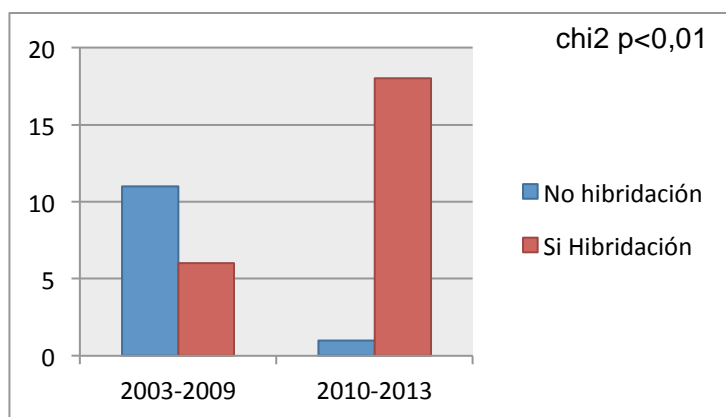
Figura 7. Resultados de técnicas de hibridación in situ para MYC y EBER.

Fuente: Elaboración propia. BAP: Break apart

Casos excluidos: un total de 16 pacientes fueron inicialmente excluidos para la construcción de TMA al no disponer de material (bloques de parafina). Posteriormente, otros 2 casos se excluyeron del análisis luego de la pérdida de tejido durante el procedimiento de diseño y construcción de TMA. En la grafica se resumen los resultados correspondientes a reordenamientos del oncogén *MYC* e identificación de EBER.

7.3.1 MYC

Como se muestra en la figura 9, de los 40 pacientes estudiados y cuyos tejidos fueron incluidos en los TMA, el aspecto mas sobresaliente fue el alto porcentaje de casos con resultados insatisfactorios dados por la ausencia de señal de hibridación o resultados no interpretables, los cuales correspondieron a 30% (12/40) (Ver figura 8). La ausencia de tejido en 4 casos (10%) estuvo relacionada con la calidad y cantidad de tejido disponible durante el estudio. Estos resultados mostraron una relación estadísticamente significativa entre el año de inclusión y los resultados insatisfactorios. Así, durante el periodo de 2003-2009: 11/12 casos fueron insatisfactorios (91,6%) vs en 2010-2013: 1/12 caso (8,3%); $\chi^2 p < 0,01$), como se muestra en la grafica 9.



Gráfica 9. Análisis de casos con resultados satisfactorios e insatisfactorios para MYC y su distribución en el tiempo.

Fuente: Elaboración propia.



Figura 8. Caso 54. Análisis de FISH para detectar translocación de gen MYC. **Resultado insatisfactorio**, células tumorales sin hibridación (Vysis LSI MYC Dual Color Break Apart, 1000x).

En 24/40 casos (60%) los resultados de hibridación fueron evaluables. Se observaron reordenamientos del oncogén MYC mediante sonda Break apart y con punto de corte del 5% en el 87,5% (21/24 casos) (figura 9) y negatividad en el 12,5% (3/24). Confirmando que en esta serie un total de 21 casos cumplen con todas las características morfológicas, inmunofenotípicas y moleculares para Linfoma de Burkitt.

Tres casos fueron negativos así: El caso 5, reconsiderado como Linfoma B difuso de célula grande, se presentó en una paciente femenina de 11 años, procedente de la región Andina, con compromiso nodal, estadio I y remisión luego de ser tratada como LB con quimioterapia COMP. El Caso 46, en una paciente femenina de 1 año, procedente de la región del Pacífico, con compromiso extranodal en región ileocecal, caso que fue reconsiderado Linfoma B de alto grado, NOS (OMS, 2016), antes denominado Linfoma B inclasificable, con características intermedias entre LB y LBDG. Finalmente el caso 40, se presentó en un paciente masculino, de 6 años de edad y procedente de la región andina, con compromiso extranodal por abdomen masivo y con remisión luego de la quimioterapia LNHB 89 para LB, este ultimo con morfología e inmunofenotipo típico del Linfoma de Burkitt (figura 10).

En la tabla 8 se resumen las características morfológicas e inmunofenotípicas de los casos con estudios de hibridación para EBER y MYC.

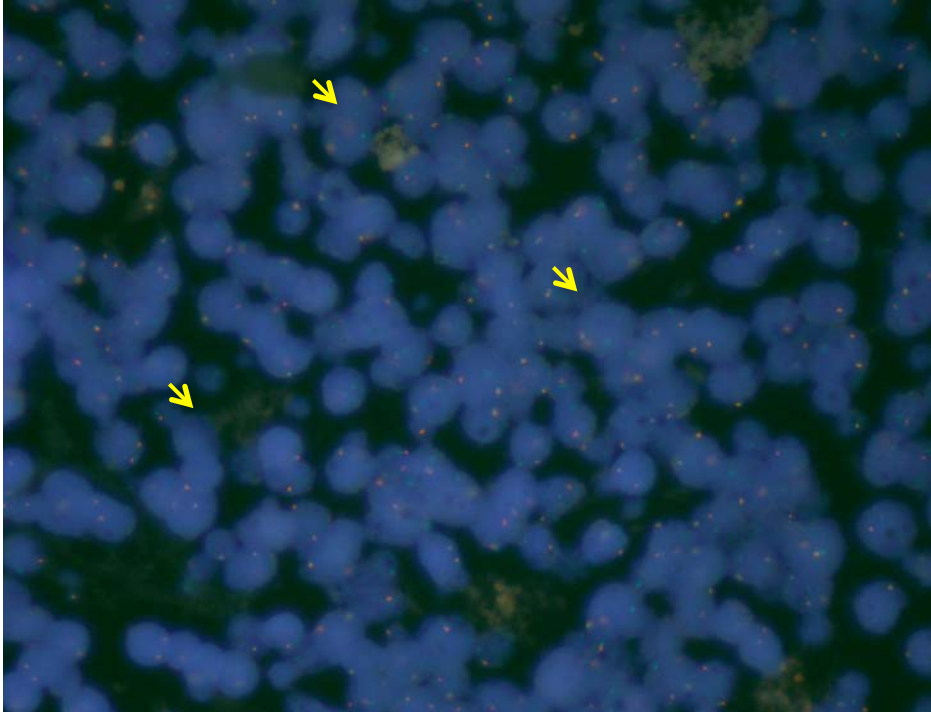


Figura 9. Caso 33. Análisis de FISH para detectar translocación de gen MYC. **Resultado positivo**, células tumorales con rearrreglos de MYC mostrando una señal de fusión amarilla, una señal roja y una verde (Vysis LSI MYC Dual Color Break Apart, 1000x).

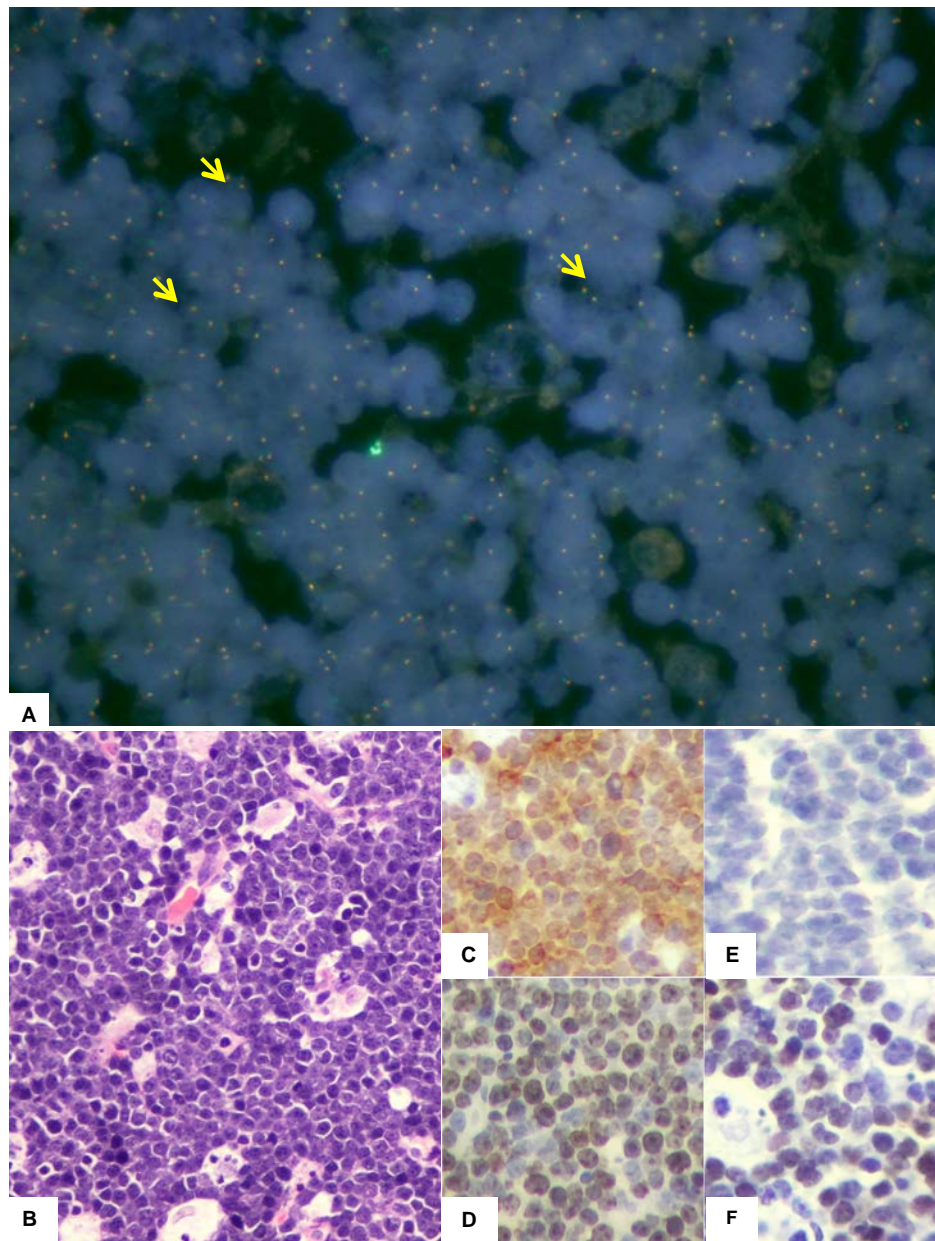


Figura 10. Caso 40, A. Análisis de FISH para detectar translocación de gen MYC. **Resultado negativo**, células tumorales sin rearrreglos de MYC mostrando dos señales de fusión amarilla (Vysis LSI MYC Dual Color Break Apart, 1000x). B. Hallazgos morfológicos en H&E 400x; C. CD79 positivo; D. Ki67% del 95%; E. Bcl2 negativo; F. Bcl6 positivo.

Tabla 8

Características morfológicas e inmunofenotípicas de casos con estudios de hibridación.

CASO	EDAD	GENERO	CD20	CD3*	CD10	BCL6	BCL2	TDT	KI 67%	EBER	MYC	cielo-estrellado	tamaño núcleo	forma núcleo	nucléolo	citoplasma
4	7	F	+	-	+	+	-	-	100	pos						
5	11	F	+	-	+	+	+	-	90	neg						
6	10	M	+	-	+	+	-	-	95							
10	7	F	+	-	+	+	-	-	95	pos						
11	6	M	+	-	+	+	-	-	95	pos						
12	12	M	+		+		-	-	100							
13	3	M	+		+	+	-	-	95	neg						
14	11	M	+		+	+	-	-	95	neg						
15	4	F	+	-	+	+	-	-	95	pos						
16	3	M	+	-	+	+	-			pos						
18	15	M	+	-	+	+	-	-	95	neg						
21	3	M	+		+	+	-	-	100	pos						
22	3	F	+	-	+		-	-	95							
23	10	M	+		+		-	-	>95							
24	6	M	+	-	+		-	-	100	neg						
25	4	M	+	-	+		-	-	>95	pos						
26	3	M	+	-	+		-	-	>95	pos						
27	11	M	+	-			-	-	95							
28	5	M	+	-	+		-	-	95	neg						
29	8	M	+	-	+		-	-	100							
30	4	M	+	-	+	+	-	-	100	pos						
31	8	M	+	-	+		-	-	95	pos						
32	3	M	+	-	+	+	-	-	95							
33	2	M	+	-	+		-	-	95	pos						
34	11	F	+	-	+	+	-	-	95	neg						
35	8	F	+	-			-	-	95	pos						
36	2	F	+	-	+		-	-	95	pos						
37	2	F	+	-	+		-	-	95							
38	4	F	+	-		+	-	-	>95	pos						
39	7	M	+	-		+	-	-	>95	pos						
40	6	M	+	-	+	+	-	-	95	pos						
41	14	F	+	-	+	+	-	-	>95	pos						
42	13	M	+	-	+	+	-	-	100							
43	8	F	+	-	+	+	-	-	>95	pos						
44	3	M	+	-	+	+	-	-	95	pos						

45	3	M	+	-	+		-			pos							
46	1	F	+	-	+	+	+	-	95	pos							
47	12	F	+	-	+	+	-	-	95	neg							
48	9	M	+	-	+		-	-	>95	pos							
49	13	M	+	-	+	+	-	-	>95	neg							
50	2	M	+	-	+	+	-	-	>95	pos							
51	5	M	+	-	+	+	-	-	>95	pos							
52	12	M	+	-	+		-	-	90**								
53	6	F	+	-	+	+	-	-	90**	pos							
54	3	M	+	-	+	+	-	-	95	pos							
55	10	M	+	-	+	+	-	-	95	pos							
56	6	M	+	-	+	+	-	-	95	neg							
57	4	M	+	-	+	+	-	-	95	pos							
58	4	M	+	-	+	-	-	-	**	neg							

	Favorece Burkitt: cielo estrellado, tamaño medio, no pleomorfismo, escaso citoplasma, núcleo redondo, múltiples nucléolos pequeños periféricos.
	En contra de Burkitt: ausencia de cielo estrellado, células grandes, pleomorfismo, abundante citoplasma, núcleo irregular, nucléolo único, grande y centra o cromatina fina/granular
	No realizado/ No tejido
	No interpretable, sin señal de hibridación

* 3 casos sin CD3, empleando CD5 como marcador T; **mala preservación; Gen, Genero; F, femenino; M, masculino; N, nodal; EX, extranodal; BAP, sonda Break Apart; pos, positivo; neg, negativo. En verde casos sin translocación del MYC.

Fuente: Elaboración propia.

7.3.2 Epstein Barr Virus

La determinación de EBER como marcador de latencia fue realizada mediante metodología de hibridación in situ, obteniendo resultados adecuados en la totalidad de casos analizados. Se encontró una alta proporción de casos con presencia de RNA no codificante, correspondiendo al 72,5% de los casos (29/40). La ausencia de infección latente fue observada en el 27,5% (11/40). (Figura 7 y 11)

Se observó una señal nuclear en todos los casos, en su mayoría el cromógeno ocupaba completamente el núcleo de las células tumorales y otras veces la tinción era mas débil y parecía segregarse con la cromatina. La señal en su mayoría mostro una intensidad fuerte y difusa, con pocos casos de expresión focal. No se observaron señales citoplasmáticas ni hallazgos que originaran confusión a la interpretación, como la presencia de fondo de linfocitos no tumorales positivos para EBER o la presencia de reactividad cruzada con mucinas, levaduras o materiales vegetales. Los casos negativos fueron evaluados en paralelo con los controles internos negativos.

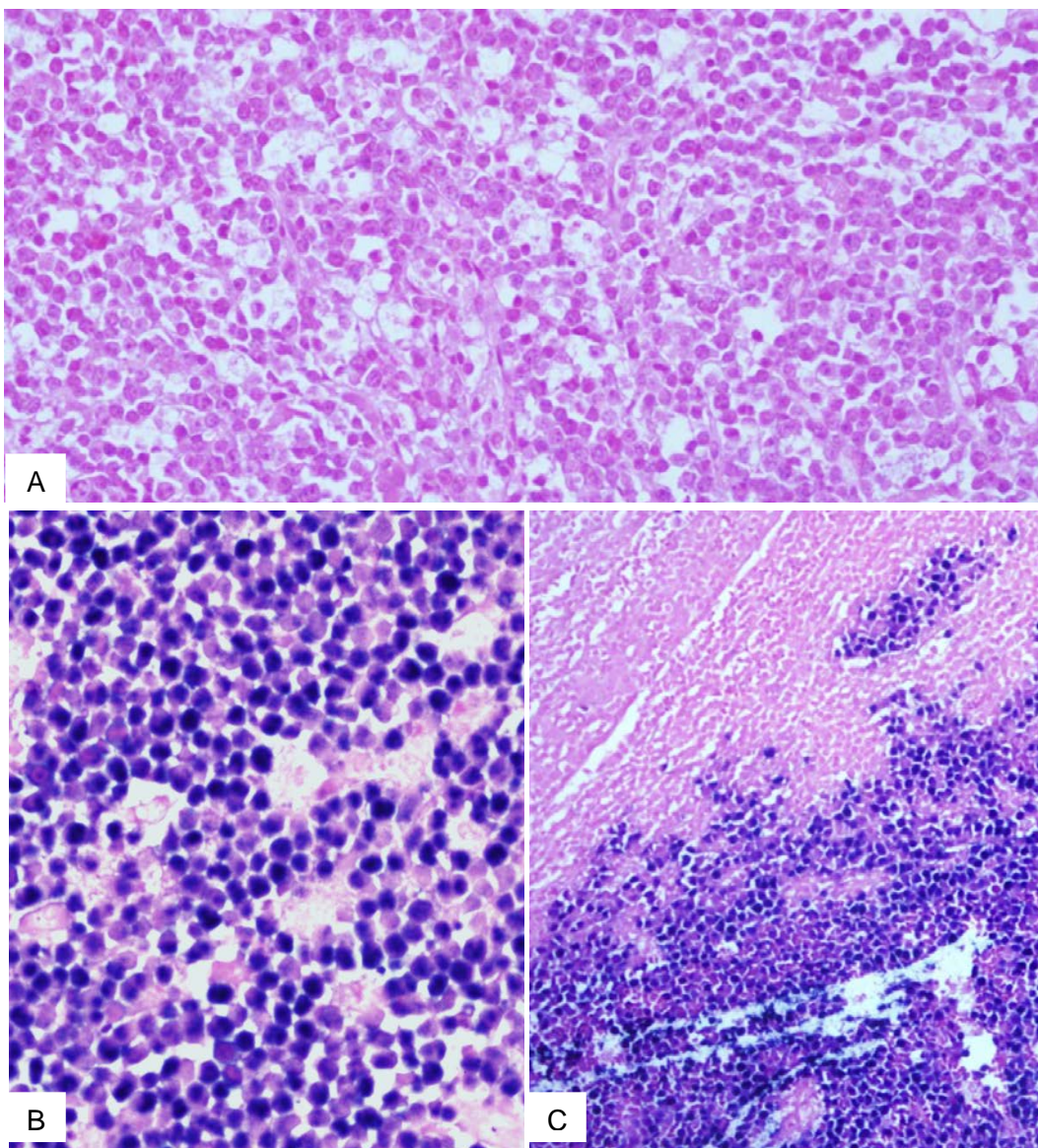
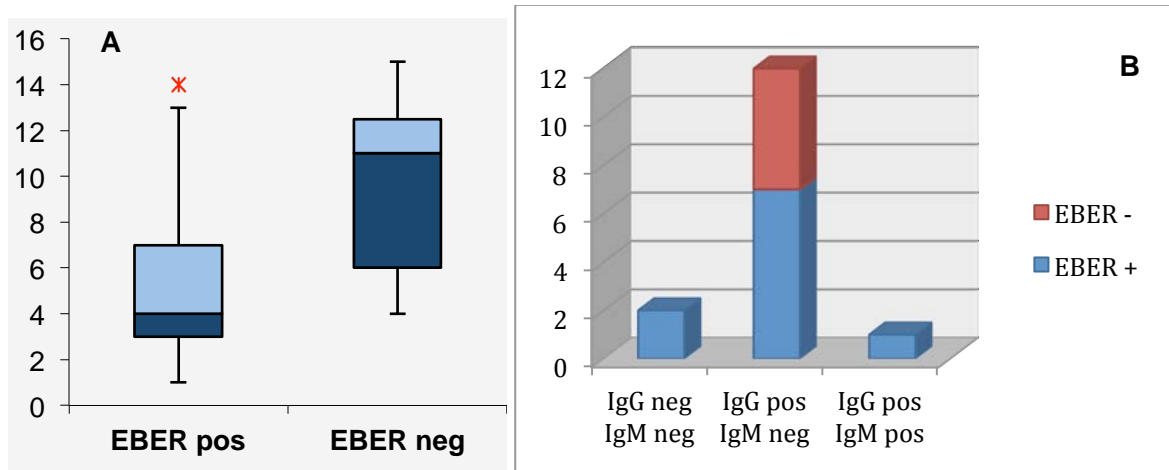


Figura 11. Resultados de Hibridación in situ para EBER-1. A. caso negativo; B. caso positivo difuso. C. Caso positivo focal. (EBER-1 DNP probe, 40x)

La mayoría de los casos con identificación de RNA viral fueron observados entre pacientes menores de 10 años, correspondiendo al 93,1% (27/29) de todos los casos positivos. Con un 58,6% (17/29) de casos EBER positivos entre 1 a 5 años; 34,5% (10/29) entre 6 a 9 años y el 6,9% (2/29) entre 10 a 15 años. En mayores de 10 años se encontrará el mayor numero de casos negativos (EBER negativos 9/12) correspondiendo al 75%. La media de edad entre los casos con positividad para EBER fue de 5,1 años con DE 2,9 años y para casos EBER negativos de 9,7 años con DE 3,8 años, siendo esta diferencia estadísticamente significativa (Chi2 $p < 0,01$, ver grafica 10, A). Por el contrario, géneros entre no se observaron diferencias significativas ($p > 0,05$)



Gráfica 10. Análisis de resultados de hibridación in situ para EBER1. A. Relación entre edad y positividad o negatividad para EBER. B. Relación entre resultados serológicos para anti VCA-EBV e hibridación in situ para EBER1.

Fuente: Elaboración propia.

No se encontró relación estadísticamente significativa entre la localización y la presencia de EBV ($p > 0,05$) en el tejido tumoral. Con una relación EBER+/EBER- para la localización Extranodal de 3,3:1 y Nodal de 2:1. Considerando que el compromiso de cavidad oral y

orbita son inusuales para la variante de LB esporádica, analizamos este grupo sin encontrar diferencias significativas, con un 75% (3/4) de positividad para EBER en pacientes con presentación en huesos faciales versus 73% (24/33) en pacientes con presentaciones usuales. Este grupo además se caracterizó por un predominio del género masculino de 6:1, edad media 5 años (3-11 años), 2/7 casos con desenlaces desfavorables (muerte y recaída) y todos con estadio avanzado III-IV.

De igual forma, no se observaron diferencias entre estadios clínicos, infiltración a MO o SNC y desenlace ($\chi^2 p > 0.05$). Esta información se resume en la tabla 9

Tabla 9
Análisis Bivariado de EBER y características clínicas.

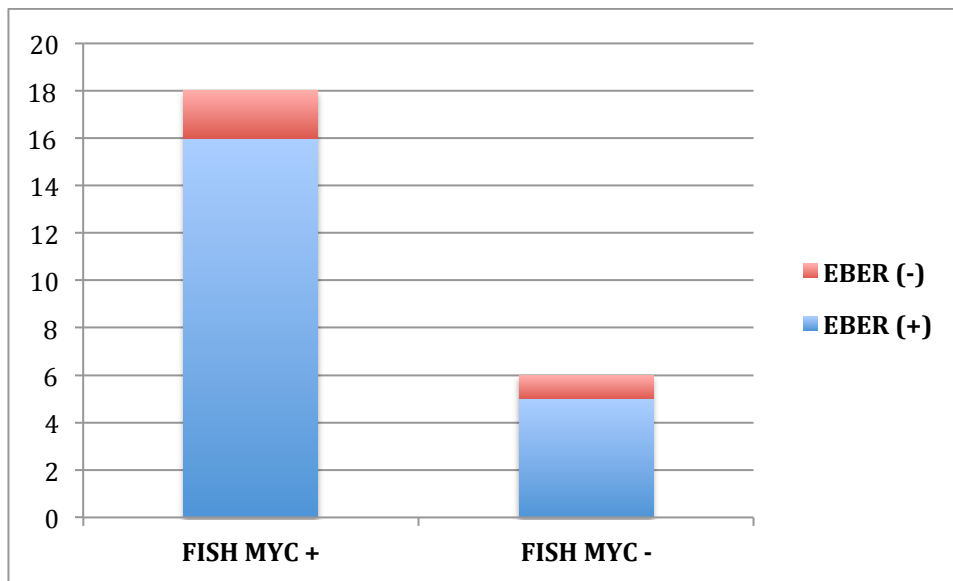
Variable	EBER POSITIVO	EBER NEGATIVO	p- valor
Genero n=40			
Masculino	19 (67,9%)	8 (32,1%)	NS
Femenino	10 (76,9%)	3 (23,1%)	NS
Sitio anatómico n=40			
Extranodal	27 (77,1,1%)	8 (22,9%)	NS
Nodal	2 (66,7%)	1 (33,3%)	NS
Ambos	0 (0%)	2 (100%)	
Estadío clínico n=32			
I-II	5 (50%)	5 (50%)	NS
III-IV	16 (76,2%)	5 (23,8%)	NS
Infiltración n=32			
Medula osea	0 (0%)	1 (100%)	NS
SNC	0 (%)	0 (%)	NS
Ambos	3 (100%)	0 (9%)	NS
No	19 (68%)	9 (32%)	NS
Evento n=32			
Muerte y Recaída	3 (50%)	3 (50%)	NS
Remisión	16 (69,6%)	7 (30,4%)	NS
Tratamiento	3 (100%)	0 (0%)	
Región de procedencia n=37			
Andina	18 (66,7%)	9 (33,3%)	NS
No Andina	8 (80,0%)	2 (20%)	NS
Anticuerpo EBV			
IgG neg IgM neg	2 (100%)	0 (0%)	NS
IgG pos IgM neg	7 (58,3%)	5 (41,7%)	NS

IgG pos IgM pos	1 (100%)	0 (0%)	NS
FISH MYC			
Positivo	16 (76,2%)	5 (23,8%)	NS
Negativo	2 (66.7%)	1 (33.3%)	NS

Fuente: Elaboración propia. NS, sin significancia estadística.

Como se muestra en la gráfica 10 B, se compararon los resultados serológicos de IgG e IgM anti VCA sin encontrar correlación con la detección de material genético viral en tejido tumoral ($\kappa = -0.4$, $p < 0.05$). Los dos casos que presentaron patrón IgG(-)/IgM(-) fueron positivos para EBER y todos los negativos para EBER con estudio serológico correspondieron al patrón IgG(+)/IgM(+).

Comparando el grupo de casos con confirmación de translocación para MYC versus los 3 casos con negatividad para esta, observamos que en ambos se demuestra una alta proporción de infección latente para EBV, correspondiendo al 66.7%. Estos resultados se muestran en la grafica 11.

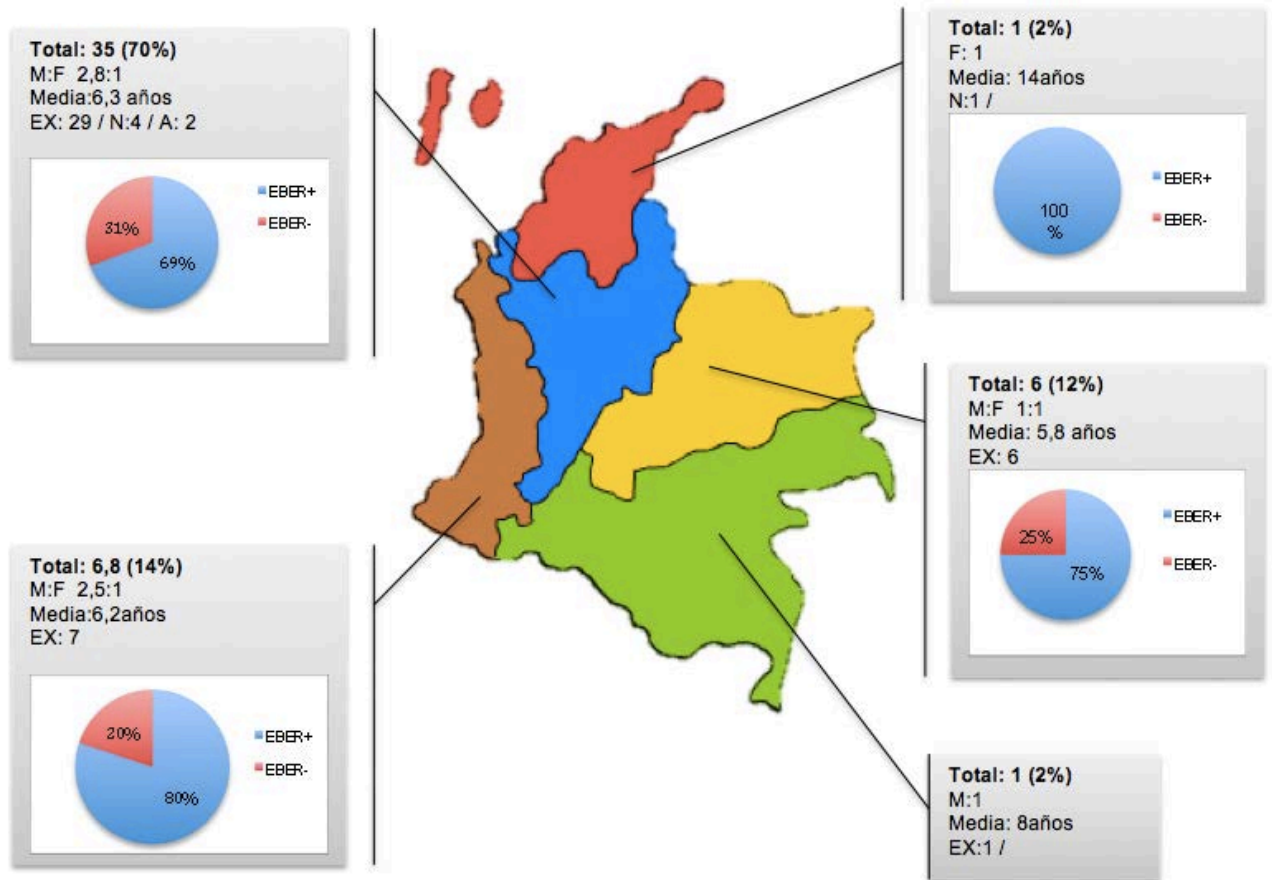


Gráfica 11. Análisis de resultados para EBER1 entre casos con rearreglos y sin rearreglos del gen MYC.

Fuente: Elaboración propia.

Se obtuvo representación de pacientes procedentes de las cinco regiones del país. Con un total de 50 casos con datos registrados se identificó que el 70% (36/50) correspondían a la región Andina, 14% (7/50) región del Pacífico, 12% (6/50) región de la Orinoquia y 2% (1/50) tanto para la región de la Amazonia como la región Caribe.

Al analizar la distribución de casos en el país y su relación con EBV, y excluyendo el caso aislado cuya procedencia fue la región Caribe con EBER+, observamos una mayor proporción de casos EBER positivos en la región del Pacífico con un 80% (5 de 6 casos), seguida de la región de la Orinoquia con 75% (3 de 4 casos) y finalmente la región Andina, que aunque con un mayor número de casos positivos, su porcentaje correspondió a 69% (18 de 26 casos). El caso de la región Amazónica no contó con material para estudios moleculares. Estos resultados no mostraron diferencias estadísticamente significativas. En la gráfica se resume la distribución en las diferentes regiones del país de los casos estudiados incluyendo edad media, género, localización y determinación de EBER.



Gráfica 12. Distribución y características clínicas de casos analizados en población entre las diferentes regiones del país.

Fuente: Elaboración propia

8. Discusión

En Colombia, la información sobre cáncer pediátrico y en especial el LB es limitada. Estadísticas basadas en el registro poblacional de Cali indican que para finales de los 90 el LB mostraba una de las incidencias más altas en Suramérica y Centroamérica (Parkin et al, 1998). Sin embargo, durante los últimos 40 años parece estar incrementando, pasando de Tasas de incidencia de 6.2 a 7.2 por millón, la más alta entre el grupo de los linfomas (Bravo LE et al, 2013). Esta serie de casos reúne 58 pacientes durante un periodo aproximado de 10 años, una cifra cercana a la descrita en el registro poblacional de Cali entre el 2002-2011 (42 casos). Este es el primer estudio realizado en la ciudad de Bogotá, en un centro de referencia de Oncohematología pediátrica que ofrece información de aspectos clínicos, histopatológicos y moleculares del LB. Otras instituciones de referencia nacional como el INC documentan características generales de los LNH en población pediátrica (0-14 años), sin hacer precisiones sobre el LB (Pardo, C, 2015).

El predominio del género masculino fue mayor en concordancia con la literatura, encontrando una relación de 2.6:1 entre niños/niñas. Las causas de esta heterogeneidad no son conocidas (Pizza M, et al, 2008), sin embargo esta distribución de géneros en el cáncer infantil es un hecho que se conoce en muchos países en vías de desarrollo, particularmente entre los LNH (Pearce M, et al, 2001). Los resultados publicados por Bravo LE y cols, en su serie de más de 30 años, muestran que la incidencia de LB entre

niños de 5-9 años fue casi tres veces mayor que en niñas, en nuestra serie la mayor diferencia se encontró entre el rango de 2-5 años con una relación 3:1.

Otro aspecto interesante es la edad en la cual este linfoma se presenta, observando que la población afectada en los países en vía de desarrollo es de menor edad que los pacientes de países europeos y USA. Una compilación de estudios comparando la edad media de presentación entre diferentes regiones mostró un estimado de 6,1 años en África contra 19,2 años en USA (Shapira j, et al 1998). En Colombia, el LB fue el único linfoma frecuente en el grupo de <5 años, y el 94% eran menores de 10 años, opuesto a otros LNH y al LH cuya población pediátrica más afectada se encontró entre los 10 a 14 años. (Bravo LE et al, 2013). En este estudio, con una media de 6,3 años, rango de 2 – 15 años y un 80,4% en menores de 10 años, se asemeja no solo a lo reportado por Bravo y cols, sino a lo observado en Brasil cuyas edades medias son similares al LB en África (Klumb et al, 2004) (Hassan et al, 2008) (Araujo, 1996) (Shapiro, 1998). Para Klumb y cols, en su estudio conducido en el Instituto Nacional de Cáncer en Rio de Janeiro con una media de 6 años (1-16 años) y para Hassam y cols de 5 años (2-14 años). Estos hallazgos podrían sugerir que una edad temprana de presentación es una característica de los LB en Colombia y algunos países de Suramérica, probablemente por ciertos factores medioambientales entre estos una exposición temprana al EBV.

Como era de esperar, el compromiso extranodal es el más frecuente entre los casos estudiados, llegando a ser un 88% del total. Este porcentaje de compromiso extranodal es al parecer mayor que lo observado en población adulta, así lo sugiere la información disponible en la literatura, con 68% de compromiso extranodal en la población general (Queiroga et al, 2008) versus 89% cuando se analiza solo población pediátrica (Hassan et al., 2008). Por otro lado, aunque el compromiso nodal es encontrado con mayor frecuencia en pacientes adultos o con inmunodeficiencias (Swerdlow et al, 2008), en este estudio pediátrico sin pacientes con inmunodeficiencias se encontró con significancia estadística, una mayor edad entre los pacientes con presentación nodal. El compromiso ganglionar más frecuente fue cervical, que aunque concordante con otras series (47,8%,

Queiroga et al, 2008) se considera que los resultados deben tomarse con precaución ya que en dos casos la información de la localización no estuvo disponible.

Al analizar la localización, como una de las características clínicas más importantes, encontramos que en su mayoría se presentaron como una masa abdominal (extranodal) que en esta serie representó el 94.4% del total. Este hallazgo que es concordante o incluso más alto a otros estudios (Araujo, 1996) (Pizza et al. 2008. 42 casos (79.2%) (Cunha et al, 2012. 50 casos (66,7%)). La región ileocecal que ha sido descrita como una hallazgo típico, logro ser determinada en el 44%.

Aunque en su mayoría, la localización recordó al LB esporádico debemos resaltar la existencia de 7 casos que podrían sugerir características de LB endémico. Esto, al considerar que el compromiso de huesos faciales como maxilar, mandíbula y órbita con o sin compromiso abdominal son hallazgos usuales en casos de LB endémicos, con un 32% y 62% respectivamente. Y son raros o inusuales en LB esporádico. (Molyneux et al, 2012). Es claro, por lo tanto que el porcentaje de compromiso de mandíbula es mucho menor en áreas no endémicas. En América varía entre diferentes estudios, de 12,5 a 16% (Tsui S. H. Et al, 2000) (Cunha et al, 2012). En un estudio a gran escala conducido en Brasil, con 234 pacientes se encontró que solo 5 (3,1%) casos comprometieron la mandíbula (Queiroga et al, 2008), mientras que Klumb y cols no reportaron casos y Robelo-Pontes y cols, identificaron 7 casos de LB que afectaba mandíbula y/o maxilares, 5 en población pediátrica (Brasil, Norte) todos con compromiso abdominal asociado y positividad par EBER. De hecho, los resultados en este trabajo sugieren que LB con compromiso de mandíbula en esta población son similares al LB endémico.

En este estudio, los casos con localización inusual correspondieron a pacientes con una edad media de 5 años (3-11años), predominio del género masculino 6:1, todos con estadios avanzados III-IV y en los casos evaluados con una positividad par EBER1 del 75% (3/4). Aunque sin diferencias significativas encontradas, es interesante analizar en grandes serie de LB con afección de mandíbula/maxilar y/o órbita para clarificar los hallazgos de un posible LB endémico. Así mismo, el compromiso de la órbita que fue observado en un caso es considerado una presentación inusual extranodal,

comprendiendo menos del 1% de todos LNH pediátricos (Boudali S et al, 2016)

De acuerdo a la clasificación de St Jude/Murphy, el 72,7% de los pacientes fueron diagnosticados en estadios avanzados (III – IV), con compromiso de MO en un 4,5%, de SNC en 2,3% y tanto MO como SNC en el 11,4%. Este diagnóstico en estadios avanzados parece ser una característica común en todos los casos de LB con un 70% en Estadios III-IV y 30% Estadios I-II. (Swerdlow et al, 2008). Para regiones como Brasil el LB pediátrico es diagnosticado en estadio avanzado, con descripciones que van desde el 68,9% (Cunha et al, 2012) hasta el 90,5% (Pizza et al, 2008), siendo los resultados de este estudio concordantes con la literatura. Aunque la edad de diagnóstico no mostró diferencias estadísticamente significativas entre los estadios, se observó una tendencia de mayor edad entre estadios avanzados: (mediana 6 años vs 4 años, $p= 0.89$) , esto es opuesto a lo encontrado por Hassan y cols, con menor edad en estadios avanzados (III/IV) (media 4.5 vs. 7 años; Mann-Whitney test, $p=0.03$).

Se considera que todas las variables clínicas muestran un riesgo de infiltración a SNC y MO (Ferry et al, 2006) aunque algunos autores consideran que en el LB endémico es rara la infiltración a MO (Molyneux, 2012) y en el esporádico la infiltración a SNC (Cunha et al, 2012). En este estudio la mayor proporción correspondió a casos con infiltración a ambos compartimientos seguido de medula ósea.

El LB es una neoplasia agresiva caracterizada por una significativa respuesta a la quimioterapia intensiva en niños y adolescentes. En esta serie el 66% se encontraron en remisión. Sin embargo, una limitante a considerar es el porcentaje de casos (14%) que se encontraban en tratamiento o que continuaron su manejo en otras instituciones y cuyo desenlace no se puede establecer, pudiendo ser mayor el número de casos en remisión. Si excluimos este grupo de pacientes en tratamiento, el porcentaje asciende a un 76%. Por otro lado, se observó una tendencia creciente al mejor desenlace con el tiempo (77,8% de muertes y recaídas ocurridas entre 2003-2009) y como era de esperar una

mayor remisión entre estadios tempranos, por ende una relación estadísticamente significativa con la ausencia de infiltración.

Todos los casos con desenlace desfavorable, tanto recaída como muerte ocurrieron en el primer año, esto es concordante con la literatura en donde el riesgo de recaída luego del primer año es menor del 5% (Molyneux, 2012). Así, la evaluación de sobrevida libre de evento en el primer año, es probablemente un buen indicador de sobrevida a largo plazo. Algunas de las características que han sido asociadas con un resultado adverso en niños fueron evidenciadas de forma significativa en este grupo de pacientes, como una edad mayor, estadio avanzado e infiltración del SNC o MO.

La mortalidad encontrada (7 pacientes, 16%) es mayor a lo observado en países desarrollados cuya tasa global de curación es mayor al 90%, la sobrevida libre de enfermedad en estadios tempranos llega al 99% (Molyneux, 2012) y la mortalidad es alrededor del 2.8% (Patte C, et al 2001). En este estudio, los hallazgos son cercanos a las observaciones en países en vía de desarrollo, por ejemplo en África la mortalidad fue del 23,8% (Harif et al 2008) y en Brasil del 26% (Cunhany et al 2012) entre población pediátrica. En los casos analizados la mortalidad fue relacionada con progresión de la enfermedad (¿diagnóstico tardío?) y complicaciones infecciosas asociadas al tratamiento. Otros autores consideran como causas de muerte, recaída y/o falla del tratamiento en países como el nuestro, las terapias incompletas y menos agresivas (Molyneux E.M. et al 2012), además de la malnutrición la cual probablemente incrementa el riesgo de toxicidad e infecciones relacionada a la terapia (Cunha et al, 2012). En este estudio no se evaluaron factores como el estado nutricional, sin embargo es una consideración para futuras investigaciones.

La búsqueda de antecedentes fue enfocada en especial a la identificación de casos asociados con inmunodeficiencias, sin embargo en esta serie de 10 años en ningún paciente se registró este antecedente. El cáncer en la familia fue el antecedente más frecuente, encontrando que el 31.8% de casos tenía historia familiar de cáncer en primero y/o segundo grado. Al respecto, el papel de los antecedentes familiares de

cáncer en la etiología de los tumores malignos hematopoyéticos en la infancia ha sido ampliamente investigado por Rudan y cols quienes utilizando los datos del estudio ESCALE en Francia, concluyeron que una historia familiar de cáncer se asoció con un mayor riesgo de LH (OR = 1,5 [1,0-2,2]) y la LNH (OR = 1,8 [1.3 a 2.5]), pero no con Leucemias Agudas (OR = 1,0 [0,9-1,2]). Aunque el tipo y características de este estudio no permite dar conclusiones, podemos considerar que la historia familiar de cáncer en la población analizada fue un factor relevante y que estudios con otro diseño se requieren para confirmar una posible asociación en LB pediátrico.

Como se menciona previamente, aunque es aceptada la clasificación clínica del LB, los hallazgos morfológicos y de inmunofenotipo son comunes, siendo el objetivo de este estudio describir dichos hallazgos que permitieron hacer el diagnóstico de LB. Durante el análisis de estas características patológicas se encontró que un importante porcentaje de casos que fueron diagnosticados y tratados como LB no contaba con un perfil completo que apoyara el diagnóstico, estos casos se ubicaron entre los primeros 5 años de la serie, en donde el acceso a los estudios de IHQ era mas limitado. Una de las tareas que se tuvo fue entonces reunir el material e intentar confirmar los diagnósticos, además de estudiar 6 casos incluidos con diagnóstico de Linfoma de Alto grado mas probable de tipo Burkitt que no contaban con inmunofenotipo. Para esto los microarreglos tisulares facilitaron la realización de estudios de IHQ, proporcionando homogeneidad en los protocolos de laboratorio, mediante la realización de todas las reacciones simultáneamente, economizando tiempo, costo y la posibilidad de evaluar un gran número de muestras.

Así, considerando la “Guía de Práctica Clínica para la protección oportuna, diagnóstico, tratamiento y seguimiento del linfoma de Hodgkin y linfoma no Hodgkin en niños y adolescentes”, 2013 MinSalud., la cual recomienda un panel de inmunohistoquímica en primera línea diagnostica para LB con CD20, CD10, Bcl2, CD3, ki67 y TdT. En este estudio el 74% cumplieron con esta recomendación y el 79% fueron CD20 + y bcl2-. El porcentaje restante correspondió a casos en donde no fue posible completar el inmunofenotipo por falta de material.

EBV – EBER1:

Múltiples estudios han demostrado el rol del EBV en la transformación maligna, siendo el primer virus en ser considerado un carcinógeno clase I en humanos. El mecanismo oncogénico exacto en el LB luego de 50 años aun no es completamente entendido y su relación causal parece ser mucho más compleja. Numerosos trabajos han sido desarrollados con el objetivo de identificar productos virales en el programa de Latencia I que ofrezcan una ventaja de supervivencia a las células del Linfoma de Burkitt, de los cuales hay evidencia experimental de potencial antiapoptótico con EBERs, EBNA 1 y recientemente varios micro-RNAs derivados de BART.

Con este limitado repertorio de expresión proteica (Latencia I) se empleó la determinación de EBER por hibridación *in situ* considerada actualmente la metodología de elección para la detección y localización de infección latente por EBV en tejidos y muestras citológicas de LB. Estos dos RNA no codificantes (EBER1 y EBER2) son altamente expresados en todas las formas de latencia, con alrededor de 10^7 copias por célula hacen de estos los mejores y más sensibles marcadores naturales de infección latente. (Ok CY, et al, 2015). Estos RNAs confieren resistencia a la apoptosis dependiente de PKR (proteína quinasa dependiente de RNA) la cual también es inducida por interferón, a través de la inhibición de la fosforilación del eIF2 α . Además, son capaces de unir otras moléculas como La, PRR y RIG-I, esta ultima facilitando la producción IL-10 que promueve el crecimiento celular (Kang M-S, et al, 2015)

Este procedimiento se realizó a través de una metodología automatizada y estandarizada en el Laboratorio de Patología de la Fundación Santafé de Bogotá. Cabe mencionar, que aunque EBNA-1 es expresada también en todos los programas de latencia, su detección por IHQ no es lo suficientemente sensible para sustituir de forma fiable la metodología de Hibridación *in situ* para EBERs, además otros problemas técnicos y biológicos han sido descritos como la reacción cruzada que limitan su sensibilidad y especificidad (Hennard

C. et al 2006) (Gulley ML. et al, 2008). Dado que la expresión de EBER es constante en todas las latencias, en este estudio no es posible confirmar con certeza que exista una la Latencia I, esto requeriría el uso de marcadores adicionales que incluya EBNA-1, EBNA-2, LMP1 y Zebra.

Los resultados de hibridación fueron interpretados bajo las guías publicadas por Gulley ML y cols para dicha evaluación, encontrando señales nucleares en su mayoría con intensidad fuerte y difusa, siendo esto al parecer relacionado con el grado de preservación de RNA. Uno de los aspectos que dificultan la interpretación es la presencia de un fondo de linfocitos positivos para EBER, estos aunque son raros (<0,1%) pueden estar presentes en cualquier portador asintomático y no deben interpretarse como positivos. Sin embargo, en esta serie de LB como es de esperar, la proporción de linfocitos T maduros acompañantes en todos los casos fue baja y no fueron una limitante para la adecuada interpretación, tampoco hubo hallazgos sospechosos de reacción cruzada con levaduras, materiales vegetales o mucinas.

En Colombia como en otros países, excluyendo el África ecuatorial y Papua Nueva Guinea, el LB es considerado clínicamente la variante no endémica o esporádica, esperando por lo tanto una baja la asociación con EBV. En esta serie, la positividad encontrada para EBER en tejido tumoral fue del 72.5%, siendo esta frecuencia intermedia entre las variantes esporádicas (30%) y endémicas (hasta 100%), pero de forma clara superando la frecuencia esperada para el LB esporádico que ocurren en USA y Europa. Por el contrario, sus porcentajes se aproximan a lo encontrado en el LB endémico. Hallazgos similares de asociaciones intermedias han sido demostrados en otras regiones de Sur América, específicamente en Brasil (con asociación global del 52,6%, Quiroga et al, 2008). En Colombia este corresponde al primer estudio que permite establecer una alta frecuencia de asociación entre LB pediátrico y EBV, sugiriendo que este virus juega un importante rol en la patogénesis de LB en la población pediátrica estudiada.

Está bien establecida la gran variación geográfica existente entre EBV y LB alrededor del mundo, una evidencia de esto son los interesantes hallazgos observados en diferentes

regiones de un mismo país, con porcentajes que van desde el 29% al 87% en Brasil (Queiroga et al, 2008) (Gutiérrez MI et al, 1992) (Sandlund et al, 1997) (Klumb CE, et al, 2004) (Bacchi et al, 1996) (Araujo et al, 1996) (Hassan et al, 2008). Así, en la Región de Noreste de Brasil, las frecuencias entre población pediátrica han sido descritas por Araujo y cols del 87% (47/54) y por Sandlund y cols del 73% (8/11). Este porcentaje fue encontrado más bajo (63%) en una de las series más grandes con 234 pacientes que incluyeron población pediátrica y adulta, siendo el porcentaje más alto en la Región del Norte (76%) (Quiroga et al, 2008). Las regiones del Sur y Suerdeste muestran las frecuencias más bajas, con un 29% para Queiroga y cols y con porcentajes del 58%, 61% 71% y 72% para Gutiérrez MI, Bacchi MM, Klumbd CE y Hassan R respectivamente.

Estos valores parecen modificarse por factores como el estatus socioeconómico bajo, el cual puede incrementar el riesgo de exposición temprana al virus y por ende de primoinfección. Ocurriendo durante los primeros años de vida en países en vía de desarrollo y hacia la adolescencia y adultez en países desarrollados (Grömminger 2012) (de Thé *et al.*, 1975). Por otro lado, desde la descripción por Denis Burkitt la relación geográfica del LB endémico aún conserva validez, considerando zonas endémicas para malaria como una de las principales característica del cinturón del Linfoma en el África ecuatorial, donde las temperaturas anuales son mayores a 15°C y las precipitaciones de 24 pulgadas (Magrath 2012). Nuestro país, el cual se encuentra atravesado en su extremo sur por la línea ecuatorial, extendiéndose entre los 12°30'40" de latitud norte y los 4°13'30,5" de latitud sur, comparte ciertas características climáticas y geográficas con el África ecuatorial, con regiones de alta temperatura y pluviosidad como la costas selváticas del Chocó, la Amazonía y la Orinoquía y con un amplio territorio afectado por enfermedades tropicales como la malaria, siendo esta endémica en el 75 % de las áreas localizadas por debajo de los 1.500 metros de altitud (Padilla J, et al, 2011).

En este estudio, se observó una tendencia de mayor número de casos EBV+ en el Pacífico (83%), seguida de la Orinoquia (75%), regiones que muestran ciertas características comunes con África ecuatorial, apoyando las particularidades geográficas del LB y la infección latente por EBV. Aunque las diferencias encontradas no fueron

significativas dado el bajo número de casos y la no representación en todas las regiones, estos datos ponen en relieve la necesidad de estudios epidemiológicos que involucren diferentes regiones del país y un mayor número de casos.

En la correlación del estatus de EBV en tejido tumoral y las características clínicas de la población estudiada, se observó una asociación estadísticamente significativa con la edad, siendo de 5,1 años DE 2,9 años para casos EBER+ y de 9,7 años DE 3,8 años para EBER- ($p < 0.05$), sin correlación con género, estadio, infiltración o localización. Por otro lado, es de resaltar que la frecuencia de positividad para EBER-1 se conservó entre casos con confirmación de translocación de MYC (75% EBER+). Estos hallazgos son concordantes con otros reportes en donde la positividad muestra una relación inversa con la edad (Quiroga et al 2008) (Klumn, 2001) (Piezza M et al, 2008). Para Hassan y cols la infección por EBV fue asociada con una menor edad, para EBV+ de 4 años vs EBV - de 8 años, $p < 0.05$. Como se ha expuesto, una clara característica en el LB endémico es la relación con la infección por EBV adquirida de forma temprana. En Uganda, cerca del 100% de niños son seroconvertidos antes de los 3 años (de Thé, et al, 1978) (Magrath IT, et al, 1991). Esta edad de primoinfección que varía sustancialmente alrededor del mundo está relacionada con factores socioeconómicos, como el hacinamiento y / o la práctica de la masticación de alimentos para los bebés (Grömminger 2012). Aunque con información limitada, al analizar el perfil serológico disponible solo en 15 casos, se puede sugerir que existe una exposición a EBV en edades tempranas, encontrando serologías positivas (IgM y/o IgG positiva) con una edad mediana de 6,3 años \pm 3,8años. Esta alta frecuencia de LB EBV+ en niños puede ser el punto de partida de futuras investigaciones que exploren la relación entre la edad y seroconversión del EBV en Colombia y sus posibles implicaciones.

No existe un patrón específico de respuesta humoral en LB que pueda ser usado como marcador pronóstico o diagnóstico de la enfermedad (IARC, 2011), tampoco como lo sugieren los resultados, como un posible marcador infección latente. El grado de concordancia encontrado entre EBER y serología fue precisamente el que se espera a causa del azar, con un índice kappa de -0.4, $p > 0.05$. Siendo los dos casos con

serología negativa IgG(-)/IgM(-) positivos para EBER y todos los negativos para EBER con serología positiva IgG(+)/IgM(+) o IgG (+) IgM (-)

Aunque la positividad para EBV no parece impactar el pronóstico ni la selección del régimen de tratamiento (Ok CY, et al 2015), las neoplasias EBV positivas muestran alteraciones genéticas que son distintas de aquellas neoplasias EBV negativas. Con LB endémico EBV+ asociado con baja frecuencia de mutaciones de ID3 y TCF3 comparada con el LB esporádico (Ko Y-H, 2015). Estudios a futuro que exploren este tipo de mutación en LB de población Colombiana son valiosos, así como la búsqueda de nuevas terapias que interfieran con la señalización del EBV, las cuales puedan impactar en poblaciones con alta frecuencia de asociación a EBV, como la nuestra.

Es claro que la clasificación del LB se basa en aspectos epidemiológicos relacionados con la distribución geográfica, la asociación con la infección por EBV, su presentación clínica y más recientemente con ciertas características citogenéticas y moleculares (puntos de ruptura del MYC y mutaciones de ID3 y TCF3). Por lo tanto, siendo la variante de LB endémico circunscrita al África ecuatorial y Papúa Nueva Guinea, en países como Colombia el LB sería considerado como una variante esporádica o no endémica. Sin embargo, se ha sugerido que en Sur América puedan ocurrir ambas variantes clínicas (esporádica y endémica) o que existan características específicas (Cardy et al. 2001). Una clasificación alternativa de los tres tipos estándares, basado en tres diferentes condiciones epidemiológicas fueron consideradas por Hassan y cols: LB en áreas de alto riesgo o incidencia (endémicos), LB en áreas de bajo riesgo o incidencia (esporádicos, casos de USA, Norte y Oriente de Europa y Japón) y LB en áreas de riesgo o incidencia intermedia (Norte de África, Medio oriente y las regiones del Norte y centro de América del Sur).

Aunque probablemente esta clasificación clínica no ofrece predicciones pronosticas para casos individuales, con los resultados se ofrece información sobre algunos de los aspectos que definen las variantes clínicas y que permiten discutir y plantear el tipo de LB que ocurre en población pediátrica de Colombia. Con características intermedias entre la forma endémica y esporádica con una alta asociación con EBV, edad de

presentación temprana, localizaciones que incluyen huesos faciales e incidencia intermedia.

MYC – translocación.

Antes de discutir los resultados de translocación para MYC, uno de los aspectos más relevantes durante el proceso de interpretación fueron los resultados insatisfactorios, dados por casos sin señal de hibridación o no interpretables. Un ajuste inicial en los tiempos de digestión buscando mejorar la penetración de la sonda no optimizó los resultados. Al respecto, se encontraron diferencias estadísticamente significativas relacionadas con la antigüedad del bloque, identificando el 93% de los casos insatisfactorios entre los años 2003-2009. Por lo tanto, soportados con la literatura se considera que factores pre analíticos están estrechamente relacionados con los resultados. Siendo las potenciales fuentes de variabilidad los procesos de prefijación, fijación, procesamiento y almacenamiento (Bass BP et al, 2014).

Es claro que los archivos de tejidos fijados en formol y embebidos en parafina constituyen una fuente invaluable para la investigación, sin embargo se requiere asegurar las condiciones pre analíticas para lograr resultados adecuados. Esto incluye en estudios de DNA: isquemia fría menor de 1 hora para FISH y de 4 días para PCR; decalcificación con EDTA, fijación con formaldeído tamponado por <72hr a temperatura ambiente o 4°C y parafinas puras. Para estudios de RNA: isquemia fría <12 horas, EDTA como decalcificador y fijación entre 8-48 horas.

En este estudio se desconocen los tiempos de isquemia fría a las que pudieron ser sometidas, siendo este un importante factor en estudios de FISH (reducción de la fluorescencia con isquemia fría >1 hora, (Bass BP et al, 2014)). Otra limitante encontrada se relaciona con las diferentes parafinas que fueron observadas y que junto con el uso de

formaldeidos no tamponados son factores que de forma clara pueden afectar la calidad de los resultados en estudios moleculares.

Finalmente, de acuerdo a la recomendación dada por Bass BP y cols, los estudios de DNA deben realizarse con bloques de parafina cuya antigüedad sea menor de 5 años y para RNA menor de 1 año. Los resultados, evidencian el efecto del tiempo con los estudios de FISH, ya que este procedimiento fue desarrollado en el año 2015, momento en el cual los bloques de años menores al 2009 excedían los 5 años. Por el contrario, en estudios de ISH para RNA viral, se encontraron hibridaciones satisfactorias. Se sugiere que esto se relacione con la alta expresión de EBER en células tumorales (≈ 10 millones de copias por célula) lo cual permite que aun con el paso del tiempo se logren detectar secuencias de RNA viral.

La participación del oncogén MYC se encuentra ampliamente descrita en varias neoplasias. Sus posibles alteraciones incluyen amplificación, rearrreglos o hipometilación, los cuales conllevan a la activación y sobreexpresión de la proteína MYC. En este estudio se confirma en 20/24 casos (83.3%) la presencia de translocación del gen MYC, siendo la $t(8;14)(q24;q32)$ y sus variantes $t(8;22)(q24;q11)$ - $t(2; 8)(q12;q24)$ el mecanismo de activación y marcador molecular del LB (Aquino G et al, 2013) (Salaverria I. et al, 2014)

Aunque existen varias metodologías para la identificación de translocaciones del gen MYC, en este estudio se utilizó FISH ya que ofrece un rendimiento superior a la PCR y Southern blot (Aquino G et al, 2013). En cuanto al tipo de sonda, break apart permite en una única aproximación evaluar la integridad del gen, pero no ofrece información sobre el patrón de translocación. Aunque en este sentido son menos informativas que las dual fusión, son más sensibles, más fáciles de interpretar y ofrecen la ventaja que puede dar claramente resultados anormales también para translocaciones variantes (translocaciones no-IGH/MYC), lo que requeriría de varias sondas independientes con dual fusión, no todas disponibles comercialmente (Aquino G et al, 2013) (Ventura R, et al, 2006). Estrictamente hablando, las sondas dual-fusión son superiores a las break apart

independiente de la sensibilidad porque su tasa de falsos positivos en tejido normal es cero (Ventura R, et al, 2006). En estudios futuros, no solo sería de gran interés una segunda aproximación con el uso de sondas dual fusión que permitan identificar el tipo de translocación en nuestra población, sino también mediante la implementación de otras tecnología que logren determinar puntos de ruptura, los cuales difieren entre la forma Endémica versus Esporádica y la asociada a Inmunodeficiencia (Michelow 2012) (Ng 2009).

Otro factor a considerar es el punto de corte que define la positividad o negatividad de una translocación. En este estudio se empleó el 5% (Johnson N, et al, 2009) el cual ha sido usado y validado por otros autores. Sin embargo, se recomienda la determinación usando controles negativos (amígdalas normales), siendo un caso positivo aquel que supere 3 DS sobre la media del grupo control (Cogliati S, et al, 2006) (Haralambieva E, et al, 2004) (Queiroga et al, 2008). Variando estos porcentajes, por ejemplo para Queiroga y cols, el valor establecido fue de 2,19% (media del grupo control negativo de 0.73%).

La consecuencia molecular de las tres translocaciones es la alteración de la expresión del oncogén MYC, siendo este un regulador global de la transcripción que afecta cientos de genes involucrados en varios procesos celulares como proliferación, apoptosis, diferenciación, renovación celular y modulación global de la cromatina (De Flaco et al, 2015). Sin embargo, aunque esta translocación del MYC ha sido considerado evento temprano e iniciador, información creciente indica que no es suficiente para conducir la linfomagénesis (Richter J, et al, 2012), en parte, porque su sobreexpresión no solo implica un estímulo proliferante sino la activación de apoptosis (Campo E, 2012). De tal forma que deben existir mecanismos que permitan equilibrar el balance hacia la proliferación de células tumorales. Las primeras respuestas a esto fueron encontradas con la identificación de mutaciones somáticas frecuentes en los genes que codifican para el TCF3 (Transcription factor 3) y su regulador negativo, el gen ID3 (DNA-binding protein inhibitor). Estas mutaciones fueron observadas en el 40% de LB Endémicos, 70% de LB Esporádicos y 67% de LB asociados a VIH, correspondiendo en el LB tipo esporádico el 58% a mutaciones del gen ID3, 11% a mutaciones del TCF3 y en el 13% a mutaciones

de ambos genes (Richter y cols, 2012) (Schmitz y cols, 2012) (Schmitz R, 2014). Así, TCF3 promueve la supervivencia y proliferación de células linfoides activando las vías de señalización BR/PI3K y modulando la expresión de genes del ciclo celular como CCND3 (Campro E. 2012).

Estos nuevos hallazgos, dan lugar a una mejor definición de las características genéticas de este tumor y ofrecerán un mejor entendimiento de la carcinogénesis, aspectos esenciales para la búsqueda de nuevas estrategias diagnósticas y terapéuticas, necesarias en regiones donde esta entidad es endémica y en países como el nuestro donde su diagnóstico es aun tardío.

Por otro lado, no menos interesante es la presencia de 3 casos (12.5%) con ausencia de translocación. Dos de ellos mostraron morfologías atípicas y expresión de Bcl2 lo cual está en contra con un diagnóstico de Linfoma de Burkitt y favorecen Linfoma B difuso de célula grande, pero el restante mostraron características morfológicas e inmunofenotípicas compatibles con LB.

En otras series, entre el 5 al 10 % de casos no se logra demostrar la translocación del MYC por métodos citogenéticos ni mediante técnicas moleculares como FISH (De Flaco et al, 2015) (Swerdlow 2008). Al respecto, Salaverria I. y cols, consideran que en muchos casos no fue aplicado un set completo de sondas necesarias para excluir variantes raras de translocaciones. Otras posibles causas propuestas incluyen: fallas técnicas de FISH, rupturas de pequeños fragmentos que se insertan en el locus de genes de las IG y que no logran ser reconocidos con las sondas disponibles, puntos de ruptura localizados fuera de la región cubierta por la sonda (Jaffe ES, et al, 2011) o incluso otros mecanismos como los epigenéticos (Lindstrom MS, et al, 2002) en especial, los relacionados con la expresión de microRNAs. Para De Falco y cols, la regulación a la baja de los miembros de la familia de microRNAs hsa-miR-29 podría ser un posible mecanismo que llevan a la sobreexpresión de la proteína MYC en casos de LB sin la translocación. Otros miRNA como hsa-mir-34b has sido planteados como un posible mecanismo patogénico sustituyente de la translocación (Leucci E, et al, 2008)

Este hallazgo es también importante por la reciente descripción de una entidad denominada Linfoma de Burkitt-like con anomalías del 11 q (Swerdlow SH, et al, 2016). Aunque esta es una entidad provisional, aun es controversial si el LB sin excepción es definido por la presencia de una translocación IG-MYC o si existe un subgrupo de verdaderos LB sin la translocación (Salaverria I. et al, 2014). Estudios recientes identificaron casos de linfomas que desde la morfología, el inmunofenotipo y mediante perfiles de expresión génica (GEP) eran similares al LB, diferenciándose por la ausencia de translocaciones del gen MYC (Pienkowska B, et al, 2011) (Ferreriro J, et al, 2015) ((Salaverria I. et al, 2014). Los casos descritos por Salavarría I y cols, documentan alteraciones en el cromosoma 11q, dado por ganancias proximales incluyendo 11q23.2-q23-3 y pérdidas teloméricas de 11q24.1-qter. Además, mostraron cariotipos más complejos, niveles más bajos de expresión de RNAm de MYC, un cierto grado de pleomorfismo nuclear, en algunos con un patrón folicular y en todos (3 casos) una presentación nodal en menores de 25 años.

Soportados además por la significativa baja expresión de MYC, a nivel de RNAm y a nivel proteico (De Falco et al, 2015) (Salaverria I, et al, 2014), se sugiere que este gen no se encuentra activado y que probablemente éste represente un grupo distinto de linfomas de alto grado que recuerdan pero no son idénticos al LB. Sin embargo, dado el limitado número de casos es claro que se aún se requieren más estudios que permitan confirmar esta entidad provisional y definir en especial las características y curso clínico.

Una limitante de este estudio, fue precisamente la no determinación de sobreexpresión proteica, al menos mediante estudios de IHQ. Esto nos permitiría demostrar aspectos concordantes con la enfermedad (sobreexpresión) y la evaluación de la expresión en el caso MYC negativo.

Se puede sugerir que este caso (uno o dos) puede corresponder a la nueva categoría denominada Linfoma B de alto grado, NOS. Este, que reemplaza en 2016 el diagnóstico

de Linfoma B inclasificado con características intermedias entre LB y LBDCG. Ya que aunque su inmunofenotipo fue concordante con LB y mostraban una apariencia en cielo estrellado presentaban cierta variación citológica atípica. También se podría plantear que este podría corresponder a la nueva categoría de Linfomas de Burkitt-like, con alteraciones del 11, sin embargo no existen criterios claros (Salaverria I, et al, 2014), no es posible confirmar desde el punto de vista de perfiles de expresión molecular y finalmente, ninguna técnica actualmente usada para el diagnóstico genético puede inequívocamente descartar todas las translocaciones (Jaffe ES, et al, 2011).

9. Conclusiones y recomendaciones

- El linfoma de Burkitt en la población pediátrica analizada se caracteriza por afectar de forma predominante al género masculino, se presenta en su mayoría entre niños(a) menores de 5 años con una edad media de 6.3 años. El compromiso más frecuente es la cavidad abdominal en región ileocecal (extranodal). La localización nodal no se relaciona a inmunodeficiencias, antecedente no encontrado en ningún caso, pero es más frecuente a edades mayores. En 7 casos se registra una presentación inusual en maxilar, mandíbula y orbita todos con compromiso abdominal asociado y estadio avanzado.
- Esta enfermedad se diagnostica en estadios avanzados III-IV y cuando infiltra SNC o MO lo hace en su mayoría comprometiendo ambos compartimientos. Aunque se caracteriza por una significativa respuesta a la quimioterapia intensiva, el porcentaje de remisión llega al 74%. Las muertes y recaídas ocurren todas en el primer año luego del diagnóstico y son asociadas de forma significativa con género masculino, infiltración a SNC y/o MO y estadio avanzado. Aunque la mortalidad mejora en los últimos cinco años de la serie, es mayor a la observada en países desarrollados, siendo procesos infecciosos asociados al tratamiento y progresión de la enfermedad la causa de muerte entre los niños estudiados.

- Con excepción de dos casos, los restantes analizados muestran hallazgos morfológicos concordantes con el diagnóstico de linfoma de Burkitt. En dos casos con expresión de Bcl2, el diagnóstico de Linfoma de Burkitt fue excluido, considerando que corresponden a Linfoma B difuso de célula grande y a Linfoma B difuso NOS, ambos con citología atípica y ausencia de translocación del gen MYC.
- Se demuestra la existencia de una alta asociación entre el LB pediátrico y el virus Epstein Barr, con una frecuencia que es intermedia a lo descrito entre la variante esporádica y la endémica. Esta frecuencia no se modifica de forma significativa cuando se analizan solo el grupo de casos con confirmación de translocación de MYC. Este es el primer estudio que permite definir la relación entre el Linfoma de Burkitt pediátrico en población colombiana y el EBV.
- La infección latente por EBV, demostrada por la identificación de EBER-1 en el tejido tumoral se asocia de forma significativa con una menor edad (media de 5.1 años) y no muestra diferencias con las diversas localizaciones. Junto a la seroconversión de IgG anti- VCA-EBV encontrada a una edad media de 6.3 años, se considera que entre la población analizada existe una exposición e infección temprana por Epstein Barr virus, siendo esta una característica de los LB endémicos, estrechamente relacionada con factores socioeconómicos.
- La alta asociación con infección por EBV apoya las particularidades geográficas del LB ya que Colombia, así como el África, Brasil y Papua Nueva Guinea son atravesados por el ecuador, mostrando características climáticas similares y una alta prevalencia de enfermedades tropicales como la malaria. Aunque se representaron casos de todas las regiones del país, no se encontraron diferencias significativas en las características clínicas y prevalencia de EBER 1, en parte por el bajo número de casos.
- No existe un patrón específico de respuesta humoral en LB que pueda ser usado como marcador pronóstico o diagnóstico de infección latente como lo confirman los resultados. El grado de concordancia encontrado entre hibridación in situ para EBER-1 y determinación de anticuerpos contra VCA-EBV es la espera a causa del azar.

- La técnica de hibridación in situ para EBER-1 mediante metodología automatizada es una herramienta útil y fácil de interpretar. Muestra un alto rendimiento para detectar RNA viral aún en tejidos archivados por más de 5 años, posiblemente en relación al gran número de copias por célula de este RNA.
- Los archivos de tejidos fijados en formol y embebidos en parafina constituyen una fuente invaluable para la investigación, sin embargo es necesario asegurar las condiciones pre analíticas para lograr resultados adecuados en técnicas de FISH. El tiempo de almacenamiento mayor de 5 años y posiblemente las diferentes parafinas usadas fueron los factores mas significativos para la no obtención de una señal de hibridación.
- La translocación del gen MYC $t(8;14)(q24;q32)$ y sus variantes $t(8;22)(q24;q11) - t(2;8)(q12;q24)$ son consideradas el mecanismo de activación y marcador molecular del LB. En este estudio se logra confirmar este mecanismo en 21/23 casos, mediante sondas break apart, aunque sin determinar el tipo de translocación dadas las características de la sonda.
- En dos de tres casos sin rearrreglos del gen MYC, se confirman hallazgos morfológicos e inmunofenotípicos en contra de un diagnóstico de Linfoma de Burkitt. El caso restante con ausencia de translocación presenta características clínicas, morfológicas e inmunofenotípicas de Linfoma de Burkitt, planteando múltiples interrogantes sobre sus causa. A considerar, relacionadas a la técnica, tipo de translocación, mecanismos epigenéticos o una nueva categoría diagnóstica incluida en la nueva clasificación de la OMS. Para confirmar esta última consideración, se requeriría la confirmación molecular desde el punto de vista de perfiles de expresión y posiblemente un panel mas amplio de sondas que permitan descartar otras translocaciones que involucren el gen MYC.
- Este estudio extiende el conocimiento actual de los linfomas B agresivos en población pediátrica Colombiana, específicamente del Linfoma de Burkitt; una de las neoplasias sólidas más frecuentes entre la población pediátrica. Este documento aporta

información sobre aspectos clínicos, patológicos y moleculares no antes detallados en esta entidad, además ofreciendo una descripción fuera de las regiones endémicas o esporádicas clásicas, lo cual permitirá una mejor caracterización de la enfermedad al redor del mundo.

- Los resultados del presente estudio permiten sugerir que el LB en población pediátrica exhibe características intermedias entre la forma endémica y esporádica con una alta asociación con EBV, edad de presentación temprana, localizaciones que incluyen huesos faciales e incidencia intermedia. Probablemente factores socioeconómicos y geográficos estén relacionados, así como la desnutrición; resaltando la necesidad de estudios epidemiológicos que involucren diferentes regiones del país y un análisis más amplio de las características moleculares.
- Se espera que este sea el punto de partida de nuevos trabajos de investigación que permitan validar estos resultados en escenarios mas controlados. Así mismo, que logren explorar otras características moleculares en Linfoma de Burkitt para mejorar el entendimiento de la enfermedad y la búsqueda de terapias que interfieran con la señalización del EBV, las cuales impactarían en poblaciones como la nuestra

Anexo A: Instrumento para la recolección de datos.

<https://docs.google.com/forms/d/1w8P1Jcpf5XTYrnQjuJjVKOpVQMzfeLmUm0k5cS6SP6o/viewform>.

LINFOMA DE BURKITT

IDENTIFICACION

AÑO DEL DIAGNOSTICO

QUIRURGICO

EDAD

GENERO

MASCULINO

FEMENINO

ANTECEDENTES DE IMPORTANCIA

ANTECEDENTES

Algun Cancer Familiar

- No Cancer Familiar
- Inmunodeficiencia
- Otro

REGION DE PROCEDENCIA O RESIDENCIA

- REGION ANDINA
- REGION CARIBE
- REGION ORINOQUIA
- REGION PACIFICO
- REGION AMAZONIA
- SIN INFORMACION

IMPRESION CLINICA

SITIO ANATOMICO DE COMPROMISO TUMORAL

SITIO ANATOMICO EXTRANODAL

- CAVIDAD ORAL
- ORBITA
- NASOFARINGE
- CAVIDAD ABDOMINAL
- HUESO Y TEJIDOS BLANDOS
- CAVIDAD ABDOMINAL Y ORAL
- ORBITA Y CAVIDAD ABDOMINAL
- NASOFARINGE Y CAVIDAD ABDOMINAL
- OTROS

SITIO ANATOMICO CAVIDAD ABDOMINAL

- REGION ILEOCECAL
- RETROPERITONEO
- OTROS
- NO APLICA

SITIO ANATOMICO NODAL

- GANGLIOS CERVICALES
- GANGLIOS TORACICO
- OTROS
- NO APLICA

DIAGNOSTICO TUMORAL

- LINFOMA B DE TIPO BURKITT
- LINFOMA DE BURKITT-LIKE O LINFOMA B DE ALTO GRADO INCLASIFICABLE
- LEUCEMIA TIPO BURKITT
- LINFOMA DE ALTO GRADO MAS PROBABLE DE TIPO BURKITT
- LINFOMA DE ALTO GRADO
- OTRO

DIANGOSTICO CLINICO

ESTADIO

- ESTADIO I
- ESTADIO II
- ESTADIO III
- ESTADIO IV
- SIN INFORMACION

INFILTRACION MEDULA OSEA identificada durante el seguimiento

- SI
- NO
- SIN INFORMACION

INFILTRACION A SNC

- SI
- NO
- SIN INFORMACION

TRATAMIENTO

- PROTOCOLO LNHB 89

- PROTOCOLO BFM 90 O 95
- COPADM
- COMP
- RADIOTERAPIA HOLOENCEFALICA Y/O RAQUIS
- TERAPIA DE RESCATE R-ICE
- SIN INFORMACION
- OTRO

SEROLOGIA PARA EBV IGG VCA

- POSITIVO
- NEGATIVO
- NO REALIZADA
- SIN INFORMACION

SEROLOGIA PARA EBV IGM VCA

- POSITIVA
- NEGATIVA
- NO REALIZADA
- SIN INFORMACION

SEGUIMIENTO

- 1 AÑO O MENOS
- 2 AÑOS
- 3 AÑOS
- 4 AÑOS
- 5 AÑOS
- 6 AÑOS
- 7 AÑOS
- 8 AÑOS
- MAS DE 9 AÑOS
- SIN INFORMACION

EVENTOS DURANTE EL SEGUIMIENTO

- MUERTE
- ALTA/EN REMISION
- EN TRATAMIENTO

- RECAIDA
- SIN INFORMACION
- OTROS

CD20

- POSITIVO
- NEGATIVO
- OCASIONALES O ACOMPAÑANTES
- NO SE REALIZA
- NO INTERPETABLE
- SIN INFORMACION

CD79

- POSITIVO
- NEGATIVO
- OCASIONALES O ACOMPAÑANTES
- NO SE REALIZA
- NO INTERPETABLE
- SIN INFORMACION

CD10

- POSITIVO
- NEGATIVO
- OCASIONALES O ACOMPAÑANTES
- NO SE REALIZA
- NO INTERPRETABLE O EQUIVOCO
- SIN INFORMACION

BCL2

- POSITIVO
- NEGATIVO
- OCASIONALES O ACOMPAÑANTES
- NO SE REALIZA
- NO INTERPETABLE
- SIN INFORMACION

BCL6

- POSITIVO
- NEGATIVO
- OCASIONALES O ACOMPAÑANTES
- NO SE REALIZA
- NO INTERPETABLE
- SIN FORMACION

CD3

- POSITIVO
- NEGATIVO
- OCASIONALES O ACOMPAÑANTES
- NO SE REALIZA
- NO INTERPETABLE
- SIN INFORMACION

Ki67

- mayor 90%
- menor de 90%
- menor 50%
- 100%
- NO SE REALIZA
- SIN INFORMACION

TdT

- POSITIVO
- NEGATIVO
- OCASIONALES O ACOMPAÑANTES
- NO SE REALIZA
- NO INTERPETABLE
- SIN INFORMACION

CD30

- POSITIVO
- NEGATIVO
- OCASIONALES O ACOMPAÑANTES
- NO SE REALIZA

- NO INTERPRETABLE
- SIN INFORMACION

IHQ PARA EBV

- POSITIVO
- NEGATIVO
- OCASIONALES O ACOMPAÑANTES
- NO SE REALIZA
- NO INTERPETABLE
- SIN INFORMACION

OTROS MARCADORES

HISTORI CLINICA DISPONIBLE

- SI
- NO

Submit

Never submit passwords through Google Forms.

Anexo B: Mapa de Microarreglos tisulares (TMA)

TMA 1				
CONTROL	783-04	890-05	1939-06	899-06
461-03	1131-04	1793-05	1825-06	
930-03	1701-04		1844-06	1107-07
65-04	906-05	1207-05	621-05	99-08

TMA 2			
CONTROL	525-09	1387-09	
247-09		2064-09	1387-09
1492-09	1149-05	089-10	1149-05

TMA 3			
CONTROL	829-10	au-10-10	
362-10		362-10	725-10
725-10	2501-10	327-11	au-10-10

TMA 4			
CONTROL	479-11	1787-11	
327-11		2275-11	1286-11
2900-11	1286-11	410-12	2900-11

TMA 5			
CONTROL	21--12	761-12	
527-12		1611-12	761-12
1256-12	EXT 154-12	384-13	527-12

TMA 6			
CONTROL	363-13	2130-13	
384-13		2136-13	2130-13

1611-12	64-12	2768-13	1611-13
---------	-------	---------	---------

TMA 7			
control	99-08	525-09	control
890-05	control	2064-09	au-10-10
1825-06	1492-09	2501-10	1787-11

TMA 8			
2275-11	21.12	1611-12 (5)	control
control	control	2130-13 bloque 5	2768-13 (3)
410-12	761-12 bloque 1	2136-13 bloque 4	363-13 HM1

TMA 9		
control	1611-12 bloque 6	2130-13 Bloque 6
384-13	control	2136-13
363-12	761-12 bloque 3	2768-13

TMA IHQ-A			
930-03	783-04	890-05	1207-05
461-03	control	906-05	1793-05
control	65-04	1131-04	control

TMA IHQ-B			
control	1107-7	290-11	1492-9 o 247
	1492-9 o 247	1107-7	290-11
	783-4	2768-13	783-4

Bibliografía

1. Allday MJ. How does Epstein-Barr virus (EBV) complement the activation of Myc in the pathogenesis of Burkitt's lymphoma? *Semin Cancer Biol.* 2009;19(6):366-76. doi:10.1016/j.semcancer.2009.07.007.
2. Anwar N, Kingma DW, Bloch AR, et al. The investigation of Epstein-Barr viral sequences in 41 cases of Burkitt's lymphoma from Egypt: epidemiologic correlations. *Cancer.* 1995;76(7):1245-52.
3. Aquino G, Marra L, Cantile M, De Chiara A, Liguori G, Curcio M, et al. MYC chromosomal aberration in differential diagnosis between Burkitt and other aggressive lymphomas. *Infect Agent Cancer* 2013;8(1):37
4. Araujo I, Foss HD, Bittencourt a, et al. Expression of Epstein-Barr virus-gene products in Burkitt's lymphoma in Northeast Brazil. *Blood.* 1996;87(12):5279-5286..
5. Aukema SM, Siebert R, Schuurig E, et al. Double-hit B-cell lymphomas. *Blood.* 2011;117(8):2319-2331.
6. Bacchi MM, Bacchi CE, Alvarenga M, Miranda R, Chen YY, Weiss LM. Burkitt's lymphoma in Brazil: strong association with Epstein-Barr virus. *Mod Pathol.* 1996;9:63-7
7. Bass BP, Engel KB, Greytak SR, Moore HM. A review of preanalytical factors affecting molecular, protein, and morphological analysis of Formalin-Fixed, Paraffin-Embedded (FFPE) tissue: How well do you know your FFPE specimen? *Arch Pathol Lab Med.* 2014;138(11):1520–30.
8. Bellan C, Lazzi S, De Falco G, Nyongo A, Giordano A, Leoncini L. Burkitt's lymphoma: new insights into molecular pathogenesis. *J Clin Pathol.* 2003;56(3):188-192.
9. Bornkamm GW. Epstein-Barr virus and its role in the pathogenesis of Burkitt's lymphoma: an unresolved issue. *Semin Cancer Biol.* 2009;19(6):351-65. doi:10.1016/j.semcancer.2009.07.002.
10. Bouali, S., Said, I. Ben, Yedeas, M. D., Abderrahmen, K., Maatar, N., Boubaker, A., ... Jemel, H. (2016). Primary sporadic Burkitt lymphoma of the orbit, clinical characteristics, management, and outcomes: a case study. *Child's Nervous System*, 32(3), 437–440.
11. Bouvard V, Baan R, Straif K, et al. A review of human carcinogens—Part B: biological agents. *Lancet Oncol.* 2009;10(4):321-322 pp. 321-322. doi:10.1016/S1470-2045(09)70096-8.
12. Burkitt D. A sarcoma involving the jaws in African children. *Br J Surg.* 1958;46(197):218-23.
13. Blum K, Lozanski G, Byrd JC. Adult Burkitt leukemia and lymphoma. *Blood [Internet].* 2004 Nov 15;104(10):3009–20. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15265787>
14. Bravo LE, García LS, Collazos P, Aristizabal P, Ramirez O. Descriptive epidemiology of childhood cancer in Cali: Colombia 1977-2011. *Colomb médica (Cali, Colomb [Internet].* 2013 Jul;44(3):155–64. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24892613>
15. Campo E. New pathogenic mechanisms in Burkitt lymphoma. *Nat Genet.* 2012;44(12):1288-9.
16. Cardy AH, Sharp L, Little J. Burkitt's Lymphoma : A Review of the Epidemiology. *Kuwait Med J.* 2001;4 (December):293-306.
17. Cogliatti SB, Novak U, Henz S, Schmid U, Möller P, Barth TFE. Diagnosis of Burkitt lymphoma in due time: A practical approach. *Br J Haematol.* 2006;134(3):294–301.

18. C.H. Dunphy. Chapter 7: Viral Oncogenesis, Ed. Benders A. Gulley M. Chapter 23: The Molecular Pathology of Burkitt Lymphoma, Ed. C. Mosse and K. Weck *Molecular Pathology of Hematolymphoid Diseases*, Molecular Pathology Library 4. 2010.
19. Chene A, Donati D, Orem J, et al. Endemic Burkitt's lymphoma as a polymicrobial disease: new insights on the interaction between Plasmodium falciparum and Epstein-Barr virus. *Semin Cancer Biol.* 2009;19(6):411-420. doi:10.1016/j.semcancer.2009.10.002.
20. Cohen JI. Epstein-Barr Virus Infection. *N Engl J Med.* 2000;343(7):481-492. doi:10.1056/NEJM200008173430707.
21. Cunha KCCMS, Oliveira MCLA, Gomes ACS, de Castro LPF, Viana MB. Clinical course and prognostic factors of children with Burkitt's lymphoma in a developing country: the experience of a single centre in Brazil. *Rev Bras Hematol Hemoter* [Internet]. 2012 Jan [cited 2014 May 9];34(5):361-6
22. Dave SS, Fu K, Wright GW, et al. Molecular Diagnosis of Burkitt's Lymphoma. *N Engl J Med.* 2006;354(23):2431-2442. doi:10.1056/NEJMoa055759.
23. De Falco G, Ambrosio MR, Fuligni F, Onnis A, Bellan C, Rocca BJ, et al. Burkitt lymphoma beyond MYC translocation: N-MYC and DNA methyltransferases dysregulation. *BMC Cancer* [Internet]. *BMC Cancer*; 2015;15(1):668.
24. de-Thé G, Geser A, Day NE, Tukei PM, Williams EH, Beri DP, et al. Epidemiological evidence for causal relationship between Epstein-Barr virus and Burkitt's lymphoma from Ugandan prospective study. *Nature* [Internet]. 1978 Aug 24;274(5673):756-61.
25. Elaine S. Jaffe NLH, James W. Vardiman, Campo E. and Daniel A. Arber. *Hematopathology*. Edited by Elsevier. London, UK. 2011
26. Epstein A. Burkitt lymphoma and the discovery of Epstein-Barr virus. *British Journal of Haematology*, 2012, 156, 777-779
27. Epstein MA, Achong BG, Barr YM. Virus particles in cultured lymphoblasts from Burkitt's lymphoma. *Lancet* 1964; 283: 702-03.
28. Ferry JA. Burkitt's lymphoma: clinicopathologic features and differential diagnosis. *Oncologist.* 2006;11(4):375-383.
29. Fujita S, Buziba N, Kumatori A, et al. Early stage of Epstein-Barr virus lytic infection leading to the "starry sky" pattern formation in endemic Burkitt lymphoma. *Arch Pathol Lab Med* 2004; 128: 549-52.
30. Frick M, Dörken B, Lenz G. New insights into the biology of molecular subtypes of diffuse large B-cell lymphoma and Burkitt lymphoma. *Best practice & research. Clinical haematology* 25 (2012) 3-12.
31. Gerrard M, Cairo MS, Weston C, et al. Excellent survival following two courses of COPAD chemotherapy in children and adolescents with resected localized B-cell non-Hodgkin's lymphoma: results of the FAB/LMB 96 international study. *Br J Haematol* 2008; **141**: 840-47.
32. Grömminger S, Mautner J, Bornkamm GW. Burkitt lymphoma: the role of Epstein-Barr virus revisited. *Br J Haematol.* 2012;156(6):719-729. doi:10.1111/j.1365-2141.2011.09007.x.
33. Guech-Ongey M, Simard EP, Anderson WF, et al. AIDS-related Burkitt lymphoma in the United States: what do age and CD4 lymphocyte patterns tell us about etiology and/or biology? *Blood.* 2010;116(25):5600-5604.
34. Gulley ML, Tang W. Laboratory assays for Epstein-Barr virus-related disease. *J Mol Diagn.* 2008;10(4):279-92.
35. Gulley, M. L., Glaser, S. L., Craig, F. E., Borowitz, M., Mann, R. B., Shema, S. J., & Ambinder, R. F. (2002). Guidelines for interpreting EBER in situ hybridization and LMP1 immunohistochemical tests for detecting Epstein-Barr virus in Hodgkin lymphoma. *American Journal of Clinical Pathology*, 117(2), 259-67

36. Gutierrez MI, Bhatia K, Barriga F et al. Molecular epidemiology of Burkitt's lymphoma from South America: differences in breakpoint location and Epstein-Barr virus association from tumors in other world regions. *Blood* 1992; 79: 3261–3266.
37. Haralambieva E, Schuurin E, Rosati S, Van Noesel C, Jansen P, Appel I, et al. Interphase Fluorescence In Situ Hybridization for Detection of 8q24/MYC Breakpoints on Routine Histologic Sections: Validation in Burkitt Lymphomas from Three Geographic Regions. *Genes Chromosom Cancer*. 2004;40(1):10–8
38. Harif M, Barsaoui S, Benchekroun S, et al. Treatment of B-cell lymphoma with LMB modified protocols in Africa—report of the French-African Pediatric Oncology Group (GFAOP). *Pediatr Blood Cancer* 2008; 50: 1138–42.
39. Hassan R, White LR, Stefanoff CG, Elgui de Oliveira D, Felisbino FE, Klumb CE, et al. Epstein-Barr Virus (EBV) detection and typing by PCR: A contribution to diagnostic screening of EBV-positive Burkitt's lymphoma. *Diagn Pathol* 2006;1:17
40. Hennard C, Pfuhl T, Buettner M, Becker KF, Knofel T, Middeldorp J, Kremmer E, Niedobitek G, Grasser F: The antibody 2B4 directed against the Epstein-Barr virus (EBV)-encoded nuclear antigen 1 (EBNA1) detects MAGE-4: implications for studies on the EBV association of human cancers. *J Pathol* 2006, 209:430–435
41. *IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans: Volume 100: A Review of Human Carcinogens, Part B: Biological Agents*. IARC, Lyon, France. WHO 2011.
42. Johnson N a, Savage KJ, Ludkovski O, Ben-Neriah S, Woods R, Steidl C, et al. Lymphomas with concurrent BCL2 and MYC translocations: the critical factors associated with survival. *Blood* [Internet]. 2009 Sep 10;114(11):2273–9.
43. Jones D. Neoplastic Hematopathology Experimental and Clinical Approaches. Chapter 17 Aggressive B-cell Lymphomas: Diffuse Large B-cell Lymphoma and Burkitt Lymphoma Humana Press 2010. P 303.
44. Kang M-S, Kieff E. Epstein-Barr virus latent genes. *Exp Mol Med* [Internet]. Nature Publishing Group; 2015;47(1):e131. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25613728>
45. Kanungo A, Medeiros LJ, Abruzzo L V, Lin P. Lymphoid neoplasms associated with concurrent t(14;18) and 8q24/c-MYC translocation generally have a poor prognosis. *Mod Pathol*. 2006;19(1):25–33.
46. Kelly GL, Long HM, Stylianou J, et al. An Epstein-Barr virus anti-apoptotic protein constitutively expressed in transformed cells and implicated in burkitt lymphomagenesis: the Wp/BHRF1 link. *PLoS Pathog*. 2009;5(3):e1000341. doi:10.1371/journal.ppat.1000341.
47. Klein G, Klein E, Kashuba E. Interaction of Epstein-Barr virus (EBV) with human B-lymphocytes. *Biochem Biophys Res Commun*. 2010;396(1):67–73. doi:10.1016/j.bbrc.2010.02.146.
48. Klumb CE, Apa AG, Kadma Carrico M, et al. Long-term outcome of children with B-non-Hodgkin's lymphoma: results from Brazilian National Cancer Institute. *Hematology Meeting Reports* 2009; 3: 15
49. Klumb CE, Hassan R, Elgui de Oliveira D, Magalhães de Resende LM, Carriço MK, Dobbin JA, et al. Geographic variation in EBV associated Burkitt's lymphoma in children from Brazil. *Int J Cancer* 2004; 108: 66–70.
50. Ko Y-H. EBV and human cancer. *Exp Mol Med* [Internet]. Nature Publishing Group; 2015;47(1):e130. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/emmm.2014.109>
51. Komano, J., Sugiura, M., & Takada, K. (1998). Epstein-Barr Virus Contributes to the Malignant Phenotype and to Apoptosis Resistance in Burkitt's Lymphoma Cell Line Akata. *Journal of Virology*, 72(11), 9150–9156.
52. Klumb CE, Hassan R, De Oliveira DE, et al. Geographic variation in Epstein-Barr virus-associated Burkitt's lymphoma in children from Brazil. *Int J Cancer*. 2004;108(1):66–70. doi:10.1002/ijc.11443.

53. Leucci E, Cocco M, Onnis A, De Falco G, van Cleef P, Bellan C, et al. MYC translocation-negative classical Burkitt lymphoma cases: an alternative pathogenetic mechanism involving miRNA deregulation. *J Pathol* 2008 Dec;216(4):440–50
54. Lindstrom MS, Wiman KG. Role of genetic and epigenetic changes in Burkitt lymphoma. *Semin Cancer Biol* 2002; 12: 381–87.
55. Li Q, Spriggs MK, Kovats S, et al. Epstein-Barr virus uses HLA class II as a cofactor for infection of B lymphocytes. *J Virol.* 1997;71:4657–4662.
56. Magrath IT. African Burkitt's lymphoma. History, biology, clinical features, and treatment. *Am J Pediatr Hematol Oncol* 1991; 13: 222–46
57. Magrath I. Epidemiology: clues to the pathogenesis of Burkitt lymphoma. *Br J Haematol.* 2012;156(6):744-756.
58. Maurmann S, Fricke L, Wagner HJ, Schlenke P, Hennig H, Steinhoff J, Jabs WJ: Molecular parameters for precise diagnosis of asymptomatic Epstein-Barr virus reactivation in healthy carriers. *J Clin Microbiol* 2003, 41:5419–5428
59. Michelow P, Wright C, Pantanowitz L. A review of the cytomorphology of Epstein-Barr virus-associated malignancies. *Acta Cytol.* 2012;56(1):1-14. doi:10.1159/000334235
60. Molyneux EM, Rochford R, Griffin B, et al. Burkitt's lymphoma. *Lancet.* 2012;379(9822):1234-44.
61. Ng S-B, Khoury JD. Epstein-Barr virus in lymphoproliferative processes: an update for the diagnostic pathologist. *Adv Anat Pathol.* 2009;16(1):40-55.
62. Ok CY, Li L, Young KH. EBV-driven B-cell lymphoproliferative disorders: from biology, classification and differential diagnosis to clinical management. *Exp Mol Med [Internet].* Nature Publishing Group; 2015;47(1):e132. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/emm.2014.82>
63. Orem J, Mbidde EK, Lambert B, de Sanjose S, Weiderpass E. Burkitt's lymphoma in Africa, a review of the epidemiology and etiology. *Afr Health Sci.* 2007;7(3):166-75. doi:10.5555/afhs.2007.7.3.166.
64. Padilla J, Montoya R. Guía de Atención Clínica de Malaria. Asoc Colomb Infectología [Internet]. 2011;15(4):302–23. Available from: <http://www.acin.org/acin/new/Portals/0/Templates/Guia Malaria 2011 Infectio.pdf>
65. Pardo, C. Cendales R. Incidencia, mortalidad y prevalencia de Cáncer en Colombia 2007-2011. Instituto Nacional De Cancerología. 2015. 148 p
66. Parkin DM, Hamdi-Cherif M, Sita F, et al. Cancer in Africa: epidemiology and prevalence. Burkitt lymphoma. *IARC Scientific Publications* 2003; 153: 324–28
67. Parkin DM, Kramárová E, Draper GJ, Masuyer E, Michaelis J, Neglia J et al. International incidence of childhood cancer, Vol.II. Lyon: IARC; 1998
68. Patte C. The Societe Francaise d'Oncologie Pediatrique LMB89 protocol: highly effective multiagent chemotherapy tailored to the tumor burden and initial response in 561 unselected children with B-cell lymphomas and L3 leukemia. *Blood* 2001 Jun 1; 97(11):3370–9.
69. Pearce MS, Parker L. Childhood cancer registrations in the developing world: still more boys than girls. *Int J Cancer* 2001;91:402-6.
70. Perry AM, Crockett D, Dave BJ, et al. B-cell lymphoma, unclassifiable, with features intermediate between diffuse large B-cell lymphoma and burkitt lymphoma: study of 39 cases. *Br J Haematol.* 2013;162(1):40-49.
71. Quintanilla-Martínez L, Lome-Maldonado C, Ott G, Gschwendtner A, Gredler E, Reyes E, et al. Primary non-Hodgkin's lymphoma of the intestine: high prevalence of Epstein-Barr virus in Mexican lymphomas as compared with European cases. *Blood* 1997 Jan 15;89(2):644–51. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9002968>
72. Rebelo-Pontes H-A, Abreu M-C De, Guimarães D-M, Fonseca F-P, Andrade B-A-B De, Almeida O-P De, et al. Burkitt's lymphoma of the jaws in the Amazon region of Brazil. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal [Internet].* 2014;19(1):e32–8. Available from

73. Richter J, Schlesner M, Hoffmann S, et al. Recurrent mutation of the ID3 gene in Burkitt lymphoma identified by integrated genome, exome and transcriptome sequencing. *Nat Genet.* 2012;44(12):1316-20.
74. Rodig SJ, Vergilio JA, Shahsafaei A, Dorfman DM. Characteristic expression patterns of TCL1, CD38, and CD44 identify aggressive lymphomas harboring a MYC translocation. *Am J Surg Pathol.* 2008 Jan;32(1):113-22.
75. Rudant J, Menegaux F, Leverger G, Baruchel A, Nelken B, Bertrand Y, et al. Family history of cancer in children with acute leukemia, Hodgkin's lymphoma or non-Hodgkin's lymphoma: the ESCALE study (SFCE). *Int J cancer [Internet].* 2007 Jul 1;121(1):119–26. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17330239>
76. Salaverria I, Martin-Guerrero I, Wagener R, Kreuz M, Kohler CW, Richter J, et al. A recurrent 11q aberration pattern characterizes a subset of MYC-negative high-grade B-cell lymphomas resembling Burkitt lymphoma. *Blood* 2014 Feb 20;123(8):1187–98.
77. Sample J, Young L, Martin B, Chatman T, Kieff E, Rickinson a. Epstein-Barr virus types 1 and 2 differ in their EBNA-3A, EBNA-3B, and EBNA-3C genes. *J Virol.* 1990;64(9):4084-4092. PMID:2166806.
78. Sandlund JT, Fonseca T, Leiming T, Verissimo L, Ribeiro R, Lira V, et al. Predominance and characteristics of Burkitt's lymphoma among children with non-Hodgkin lymphoma in northeastern Brazil. *Leukemia* 1997; 11:743-6.
79. Shapira J, Peylan-Ramu N. Burkitt's lymphoma. *Oral Oncol [Internet].* 1998 Jan;34(1):15–23. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9659515>
80. Schmitz R, Ceribelli M, Pittaluga S, Wright G, Staudt LM. Oncogenic mechanisms in Burkitt lymphoma. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2014;4(2). doi:10.1101/cshperspect.a014282.
81. Schmitz R, Young RM, Ceribelli M, et al. Burkitt lymphoma pathogenesis and therapeutic targets from structural and functional genomics. *Nature.* 2012;490(7418):116-20. doi:10.1038/nature11378.
82. Scholtysik R, Kreuz M, Klapper W, et al. Detection of genomic aberrations in molecularly defined Burkitt's lymphoma by array-based, high resolution, single nucleotide polymorphism analysis. *Haematologica.* 2010; 95:2047–2055.
83. Schragger JA, Pittaluga S, Raffeld M et al. Granulomatous reaction in Burkitt lymphoma: correlation with EBV positivity and clinical outcome. *Am J Surg Pathol* 2005;29:1115–1116
84. Shiramizu B, Barriga F, Neequaye J, et al. Patterns of chromosomal breakpoint locations in Burkitt's lymphoma: relevance to geography and Epstein-Barr virus association. *Blood.* 1991;77(7):1516-26.
85. Swerdlow S.H., Campo E., Harris N.L., Jaffe E.S., Pileri S.A., Stein H., Thiele J., Vardiman J.W. Chapter 10. Mature B-cell Neoplasm. Ed: Stein H, Harris N.L, Campo E. WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues, IARC: Lyon 2008. p 262 – 264.
86. Swerdlow SH, Campo E, Pileri SA, Harris NL, Stein H, Siebert R, et al. The 2016 revision of the World Health Organization classification of lymphoid neoplasms. *Blood [Internet].* 2016 May 19;127(20):2375–90
87. Thorley-Lawson D., Gross A. Persistence of the Epstein-Barr virus and the origins of associated lymphomas. *N Engl J Med.* 2004;350(13):1328-1337. doi:10.1056/NEJMra032015.
88. Tsui SH, Wong MH, Lam WY. Burkitt's lymphoma presenting as mandibular swelling--report of a case and review of publications. *Br J Oral Maxillofac Surg.* 2000 Feb;38(1):8–11.
89. Ventura, R. A., Martin-Subero, J. I., Jones, M., McParland, J., Gesk, S., Mason, D. Y., & Siebert, R. (2006). FISH analysis for the detection of lymphoma-associated chromosomal abnormalities in routine paraffin-embedded tissue. *J Mol Diagn,* 8(2), 141–151.
90. Young LS, Rickinson AB. Epstein-Barr virus: 40 years on. *Nat Rev Cancer.* 2004;4(10):757-768.
91. Zech L, Haglund U, Nilsson K, Klein G. Characteristic chromosomal abnormalities in biopsies and lymphoid-cell lines from patients with Burkitt and non-Burkitt lymphomas. *Int J Cancer* 1976; 17: 47–56.

92. Ziegler, J.L., Drew, W.L., Miner, R.C., Mintz, L., Rosenbaum, E., Gershow, J., Lennette, E.T., Greenspan, J., Shillitoe, E., Beckstead, J., Casavant, C. & Yamamoto, K. (1982) Outbreak of Burkitt's-like lymphoma in homosexual men. *Lancet*. 1982;320(8299):631-633. doi:10.1016/S0140-6736(82)92740-4.