

Tesis de Posgrado

Epidemiología molecular del linfoma a células pequeñas no clivadas en Sudamérica

Gutierrez, Marina Inés

1993

Tesis presentada para obtener el grado de Doctor en Ciencias
Biológicas de la Universidad de Buenos Aires

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en digital.bl.fcen.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Gutierrez, Marina Inés. (1993). Epidemiología molecular del linfoma a células pequeñas no clivadas en Sudamérica. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_2557_Gutierrez.pdf

Cita tipo Chicago:

Gutierrez, Marina Inés. "Epidemiología molecular del linfoma a células pequeñas no clivadas en Sudamérica". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1993. http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_2557_Gutierrez.pdf

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

**EPIDEMIOLOGIA MOLECULAR
DEL LINFOMA A CELULAS PEQUEÑAS
NO CLIVADAS EN SUDAMERICA**

LIC MARINA INES GUTIERREZ

DIRECTOR: DRA IRENE BEATRIZ LARRIPA

Tesis para optar al título de Doctor en Ciencias Biológicas

1993

Tesis
2557
42

AGRADECIMIENTOS

Quiero expresar mi más sincero y profundo agradecimiento a todos los que hicieron posible este trabajo de Tesis Doctoral, me enseñaron, estimularon y acompañaron en su desarrollo, y en particular, a las siguientes personas e Instituciones:

- Dra Irene B Larripa, por aceptar dirigir esta Tesis, por su tiempo, paciencia y sobre todo, por sugerirme la iniciación en la Biología Molecular.
- Dr Alberto Kornblihtt, por su colaboración como Consejero de Doctorado.
- Dr Ian T Magrath, del National Cancer Institute (EEUU), en forma destacada por su imponderable apoyo, su incesante entusiasmo en este trabajo y sus constantes y valiosos consejos.
- Muy especialmente al Dr Kishor Bhatia, del National Cancer Institute (EEUU), por sus fructíferas discusiones, sus sugerencias y críticas al trabajo que significaron un aporte invaluable.
- Dra Blanca Diez, del Hospital de Niños "Ricardo Gutiérrez" (Bs As), por su colaboración en la recolección de biopsias tumorales y especialmente por su optimismo y aliento.
- Dr Federico Sackmann Muriel, del Hospital de Pediatría "Prof Dr Juan P Garrahan" (Bs As), por su colaboración en la recolección de las muestras.
- Dr Francisco J Barriga, de la Pontificia Universidad Católica de Chile (Santiago), por haberme iniciado en la caracterización molecular del linfoma de Burkitt y por las biopsias cedidas.

- Dres Maria Lydia de Andreas y Sidnei Eppelman, del Hospital AC Camargo (San Pablo, Brasil), por las muestras recolectadas.
- Dres Miguel de Tezanos Pinto y María Marta Bracco, de la Academia Nacional de Medicina (Bs As) por su apoyo y estímulo.
- A los miembros del Laboratorio de Citogenética (Academia Nacional de Medicina, Bs As), de la Lymphoma Biology Section (National Cancer Institute, EEUU) y de la Molecular Genetics Section (National Cancer Institute, EEUU) por toda la colaboración y compañía que me brindaron.
- Al apoyo Institucional de los siguientes Organismos: Academia Nacional de Medicina (Argentina), National Institutes of Health (EEUU), Encyclopaedia Britannica de Argentina, Fundación Banco de Boston (Argentina), Cancer Research Foundation of America (EEUU) y CONICET (Argentina).

INDICE

INTRODUCCION	
1- Antecedentes	1
2- Epidemiología y etiología	3
3- Eventos moleculares durante la diferenciación normal de los linfocitos B	8
4- Características citogenéticas	14
5- Mecanismo y estadio de diferenciación en el cual ocurren las translocaciones cromosómicas	17
6- Estructura y función del gen c-myc	19
7- Consecuencias de los cambios estructurales del gen c-myc en LB	25
8- Virus de Epstein-Barr y LB	27
9- Otras anomalías genéticas	32
OBJETIVOS	36
MATERIALES Y METODOS	
1- Pacientes	37
2- Aislamiento y purificación de ADN a partir de biopsias tumorales	37
3- Digestión con enzimas de restricción	38
4- Electroforesis y transferencia (Southern blot)	38
5- Hibridización con sondas moleculares radioactivas	39
6- Sondas de ADN utilizadas	40
7- Análisis de las mutaciones en el gen p53: "SSCP"	41
8- Determinación de las mutaciones en el gen p53: Secuenciación	43
RESULTADOS	
1- Estrategia para la determinación de los puntos de ruptura en la t(8;14)	45
-Puntos de ruptura en el cromosoma 8	45
-Puntos de ruptura en el cromosoma 14	48

2- Análisis molecular de pacientes sudamericanos con SNCL	50
3- Puntos de ruptura en el cromosoma 8	52
4- Puntos de ruptura en el cromosoma 14	55
5- Combinación de los puntos de ruptura en en los cromosomas 8 y 14	56
6- Análisis de la región regulatoria 5' inmediateamente flanqueante del c-myc	58
7- Asociación con el virus de Epstein-Barr	61
8- Existencia de infección lítica del EBV en biopsias de SNCL	64
9- Análisis del gen p53	66
10- Descripción de un polimorfismo neutro en el exón 6 del gen p53	73
11- Determinación del estadio de diferenciación celular donde ocurre la t(8;14)	75
-Interpretación de las bandas germinales	76
-Las células B humanas productoras de Ig poseen reordenamientos DJ _H en ambos alelos	76
-Las células de Burkitt frecuentemente presentan un segmento DJ _H no reordenado	79
 DISCUSION	
1- Caracterización molecular de la t(8;14) en SNCL sudamericanos	85
2- Cluster de puntos de ruptura en la región regulatoria del c-myc	91
3- Virus de Epstein-Barr y SNCL	93
4- Mutaciones en el gen supresor p53 en SNCL	98
5- Mecanismo y estadio de diferenciación celular en el cual ocurre la t(8;14)	102
 CONCLUSIONES	108
 BIBLIOGRAFIA	110

INTRODUCCION

1- ANTECEDENTES:

En 1958 el cirujano Denis Burkitt describió la alta frecuencia de tumores mandibulares en niños africanos (específicamente en Uganda) menores de 16 años. Esta localización maxilo-mandibular es muy rara en neoplasias de la niñez. Al mismo tiempo, reconoció que este tumor podía presentarse como una masa abdominal y fue inicialmente designado como sarcoma.

En 1960 el patólogo Gregory O'Connor reconoció a estos tumores como linfomas pobremente diferenciados y comprobó que histológicamente los mandibulares eran iguales a los abdominales, como había propuesto Burkitt.

Así surgió la entidad histopatológica de "linfoma africano" o "linfoma de Burkitt". Subsecuentemente, se concluyó que muchos "linfosarcomas" observados en EEUU y Europa eran histológicamente idénticos al linfoma africano (O'Connor, 1965).

Los linfomas constituyen un grupo heterogéneo de patologías con un factor común: la proliferación descontrolada y anormal de células que normalmente constituyen el sistema linfático. En la niñez, la gran mayoría de ellos (linfomas no-Hodgkin = LNH) representan el 10% de los tumores siendo terceros en frecuencia (Magrath, 1989). La distribución por sexo es desigual, con una relación de varones : mujeres de 3:1. Siempre son de alto grado de malignidad (agresivos y diseminados) pero la respuesta al tratamiento con múltiples drogas combinadas es buena (Kurtzberg, 1991). El porcentaje de curación es del 60-80% (Magrath, 1990).

Se han propuesto diversos sistemas de clasificación de LNH. En la clasificación de Rappaport (1975), el linfoma de Burkitt pertenece a la categoría de linfomas indiferenciados. En una clasificación posterior, propuesta por el National Cancer Institute de EEUU (Working Formulation) (Rosenberg, 1982), constituyen la

categoría de linfomas a células pequeñas no clivadas (SNCL). Este nombre se debe a la similitud morfológica con las células de los centros germinales de los folículos secundarios (aunque el tamaño de la célula de Burkitt es más semejante al de algunos linfomas a células grandes) (Magrath, 1989). Los linfomas indiferenciados y los SNCL se subdividen en Burkitt y no-Burkitt, pero no se conocen diferencias clínicas, fenotípicas o cariotípicas entre ellos (Magrath, 1989). De hecho, el SNCL es indistinguible del linfoma africano o sólo difiere en el grado de pleomorfismo o en el número de grandes nucléolos.

Histológicamente se definen por una alta relación núcleo:citoplasma; el núcleo es redondo u oval, con cromatina relativamente laxa y múltiples nucléolos (usualmente 2-5); el citoplasma es muy basófilo y generalmente contiene vacuolas lipídicas. Las células están intercaladas con macrófagos, dando al preparado una apariencia de cielo estrellado (Magrath, 1989,1991).

Clásicamente, el análisis histológico es la herramienta diagnóstica más utilizada en la clasificación de tumores. Pero en neoplasias hematopoyéticas se presentan, a veces, limitaciones. Así, en los últimos años se están utilizando también criterios más objetivos como el inmunofenotipo, la citoquímica y la citogenética.

Teniendo en cuenta esto y considerando que en el pasado se debatió si el linfoma de Burkitt es un síndrome clínico o una entidad patológica, debería redefinirse como un tumor de células linfoides B, con morfología de linfocito B inmaduro o activado, portador de una translocación cromosómica que causa la yuxtaposición de un gen de inmunoglobulina con el oncogen c-myc (Magrath, 1991) (ver más adelante).

2- EPIDEMIOLOGIA Y ETIOLOGIA:

En la mayoría de los tumores pediátricos, incluyendo a los LNH, las causas de su origen no pueden ser determinadas salvo en casos individuales. En estudios etiológicos, se han demostrado varios factores predisponentes como infecciones virales e inmunodeficiencias.

Las neoplasias linfoides son la consecuencia de un cambio genético en las células del linaje linfocítico, frecuentemente una translocación cromosómica que involucra alguno de los genes de receptores antigénicos, y conduce a una desregulación de la proliferación y diferenciación celular. Para la inducción de un clon maligno, sin embargo, se requiere más de un cambio genético (Nowell, 1976); en algunos casos una infección viral puede colaborar en el proceso de transformación.

Los linfomas presentan una distribución mundial, pero las frecuencias relativas de los subtipos de LNH varían en las distintas regiones geográficas. En Africa ecuatorial, 50% de los cánceres infantiles son linfomas, debido a la gran incidencia del linfoma de Burkitt (LB) (Magrath, 1991). En contraste, en EEUU el LB representa menos del 15% de los tumores pediátricos (Magrath, 1986). Hay, además, una serie de diferencias clínicas entre el linfoma africano o endémico (eLB) y el esporádico (sLB) observado en el resto del mundo, lo cual hace pensar que son dos entidades relacionadas pero diferentes (Tabla 1). El eLB, como ya se mencionó, fue inicialmente reconocido por la alta frecuencia de tumores mandibulares (más del 60%) que es una localización muy rara fuera de Africa. Los tumores abdominales son observados tanto en eLB como en sLB (Magrath, 1983). En eLB es común la invasión del sistema nervioso central (Magrath, 1991) mientras que en sLB la médula ósea está comprometida con alta frecuencia (Benjamin, 1983). La incidencia del LB es 50 veces mayor en Africa ecuatorial que en EEUU y Europa. Esto parecería no deberse a un factor genético

(racial) ya que los niños negros en EEUU padecen menos LB que los blancos (Magrath, 1990). Esta observación apoya la hipótesis de la determinación ambiental.

TABLA 1: Diferencias entre el eLB y el sLB

	endémicos	esporádicos
distribución geográfica	Africa ecuatorial	resto del mundo
incidencia anual	10/100.000	0,2/100.000 (en EEUU)
localización tumoral	mandíbula abdomen órbita paraespinal	abdomen médula ósea nasofaringe ganglios
respuesta del tumor recurrente	pobre	buena
inmunofenotipo	calla- no secreta IgM	calla+ secreta IgM
asociación con EBV	95%	20%
cromosoma 8	rotura lejos del c-myc (5')	rotura "dentro" del c-myc

Una de las grandes contribuciones de Burkitt (1962) fue la demostración de la clara distribución geográfica del tumor endémico en Africa ecuatorial, cuyos límites - 15° latitud Norte y Sur con una prolongación hacia el Sur en la costa este - están climáticamente determinados (Fig 1). Dicha zona tiene un clima caluroso, húmedo y con precipitaciones iguales a las requeridas para la reproducción y crecimiento del mosquito transmisor de la malaria. La asociación climática hizo pensar que el LB era causado por un virus transmitido por un insecto (Haddow, 1970).

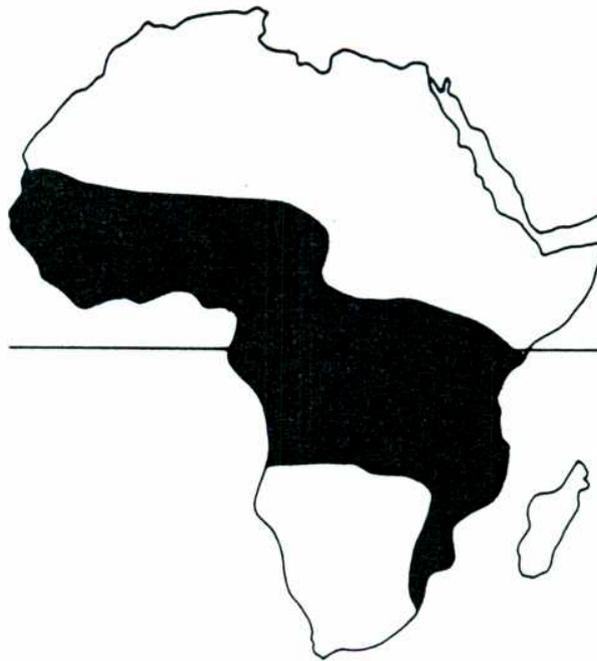


Figura 1: Mapa de Africa que muestra la región (en negro) de alta incidencia de linfomas de Burkitt, donde es endémico. (Tomado de Magrath, 1991).

Con esta hipótesis en mente, las investigaciones culminaron con el descubrimiento del virus de Epstein-Barr (EBV) (Epstein, 1964) y se creyó que era el factor etiológico del LB. Aunque el 95% de los eLB llevan genomas virales, sólo el 20% de los sLB son EBV+ (Barriga, 1988; Shiramizu, 1991). Por otra parte, esta diferencia no refleja la exposición al virus, pues más del 75% de los pacientes en EEUU son seropositivos (Levine, 1982). Más aún, como este virus es ubicuo su presencia en LB africanos no explica la distribución geográfica del tumor. Dado que el área de alta incidencia se corresponde con las regiones holoendémicas para la malaria, el Plasmodium podría predisponer al desarrollo de un linfoma ya que actúa como un mitógeno para los linfocitos B y causa un defecto en la inmunidad celular, induciendo una hiperplasia B (Magrath, 1990).

En 1972 se demostró que el LB, independientemente del origen geográfico, presentaba un marcador citogenético: el 14q+ (Manolov, 1972), resultante de una translocación cromosómica t(8;14) (Zech, 1976). Subsiguientemente, se observaron otras dos posibles translocaciones asociadas con una frecuencia mucho menor: la t(2;8) (Miyoshi, 1979) y la t(8;22) (Berger, 1979; Bernheim, 1981). En todos estos rearrreglos participa el cromosoma 8, roto a nivel de la banda 8q24 (Fig 2). La conclusión de que las translocaciones cromosómicas tenían significado patogenético se reafirmó con la demostración de que la banda 8q24 es el locus del proto-oncogen c-myc (Dalla-Favera, 1982a,b), homólogo al gen transformante del virus de la mielocitomatosis aviaria MC29 (v-myc). Dichas translocaciones conducen a la desregulación del c-myc, componente crítico de la patogénesis del LB. La caracterización molecular de las translocaciones mostraron otra diferencia importante entre el sLB y el eLB (Tabla 1) (Pellici, 1986; Barriga, 1988; Shiramizu, 1991).

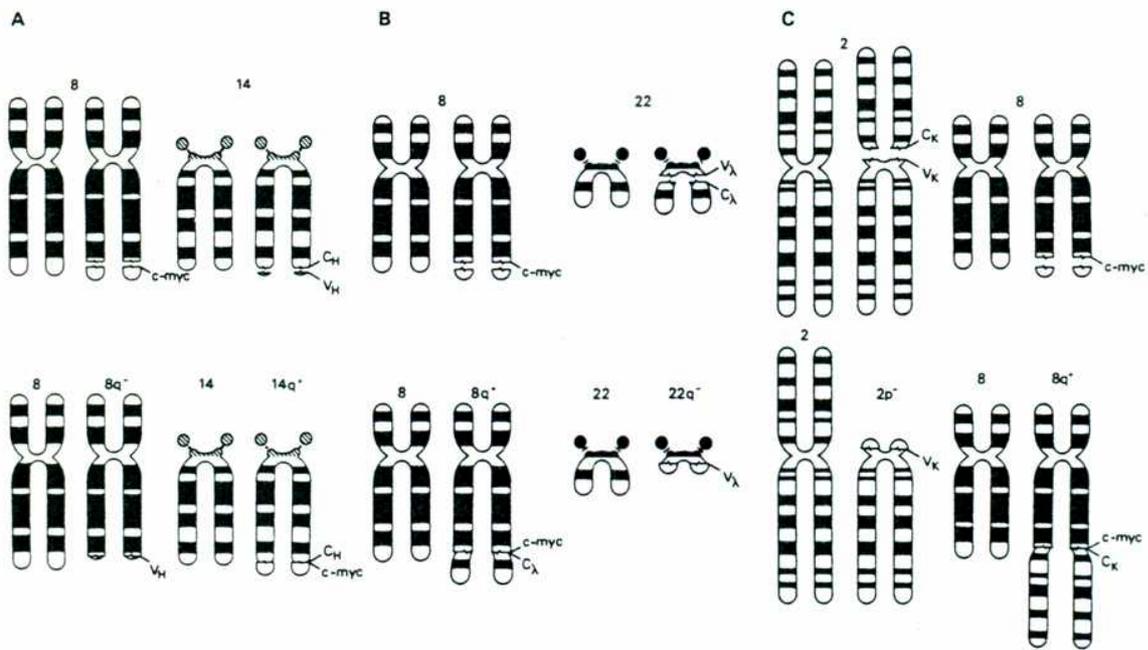


Figura 2: Esquema de las translocaciones cromosómicas específicas observadas en los linfomas de Burkitt. En la parte superior se muestran los cromosomas normales y en la parte inferior, los cromosomas derivados. Se señalan los loci del oncogen *c-myc* y de los genes de las inmunoglobulinas. A: t(8;14). B: t(8;22). C: t(2;8). (Tomado de Sandberg, 1990).

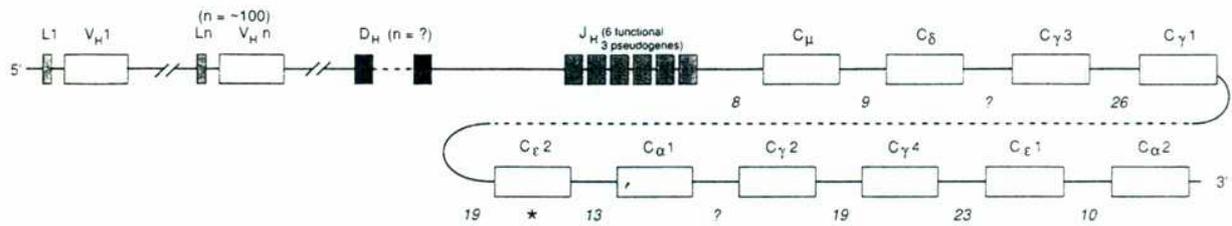
3- EVENTOS MOLECULARES DURANTE LA DIFERENCIACION NORMAL DE LOS LINFOCITOS B:

La médula ósea es el sitio donde ocurre la diferenciación de los linfocitos B, a partir de células multipotenciales. Los eventos moleculares que ocurren durante la maduración están dirigidos a la producción de una molécula de inmunoglobulina (Ig) con reactividad hacia un antígeno (o mejor dicho, un epítopo antigénico). La producción y secreción de anticuerpos, su diversidad, la exclusión alélica (expresión de un solo alelo) y el cambio de isotipo de la cadena pesada (clase de Ig) son procesos regulados por cambios en la organización, transcripción y traducción de los genes de Igs (Abbas, 1991; Alt, 1987).

La molécula de Ig está compuesta por 2 cadenas pesadas y 2 cadenas livianas, cada una con una región variable y una región constante, unidas por puentes disulfuro (Abbas, 1991). El gen de la cadena pesada está situado en el cromosoma 14 (14q32) (Croce, 1979), mientras que el gen de la cadena liviana kappa está en el cromosoma 2 (2p12) (Malcolm, 1981) y el de la cadena liviana lambda está en el 22 (22q11) (Erickson, 1981).

Tonegawa (1983) demostró que las regiones variables y constantes para cada cadena están codificadas en distintos segmentos génicos que se encuentran alejados, separados por secuencias no codificantes (Fig 3), y que son aproximados en las células condicionadas a madurar en linfocitos B. Así, los genes de las Ig sufren un proceso de recombinación del ADN durante la ontogenia B.

Locus de la cadena pesada (cromosoma 14)



Locus de la cadena liviana kappa (cromosoma 2)



Locus de la cadena liviana lambda (cromosoma 22)

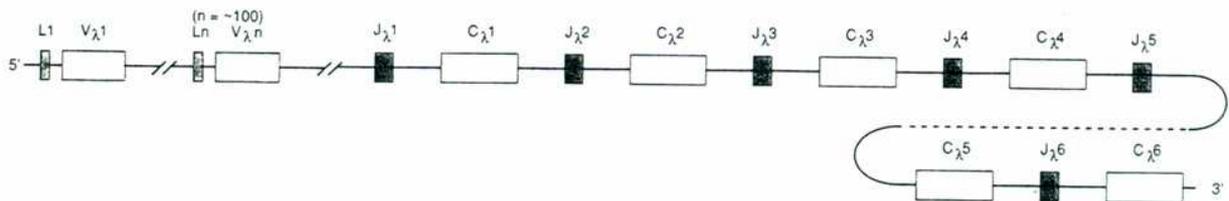


Figura 3: Organización germinal de los genes de las inmunoglobulinas. Los tamaños de los exones y de los intrones no están en escala; los números en *itálicas* se refieren a distancias aproximadas en Kb. El *astrisco* señala un pseudogen. Cada región constante del gen de la cadena pesada está representada con un cuadro, sin detallar los exones que las componen. L: líder; V: variable; D: "diversity"; J: "joining" y C: constante. (Adaptado de Abbas, 1991).

En el extremo 5' del locus de cadena pesada están los genes variables (aproximadamente 100) de unos 300 bp cada uno. Hacia 3', y separados por intrones, se hallan las regiones codificantes D - por "diversity"-, las J -por "joining"-, y las regiones constantes en tandem (Fig 3). En los precursores B, los reordenamientos del ADN para adquirir la organización funcional ocurren en un orden preciso, correlacionado con los distintos estadios de maduración de las células B en la médula ósea. El primer evento en ambos alelos (Alt, 1984) es la reunión de un segmento D y un J_H, con delección de todo el ADN intermedio (Fig 4). Luego, una región V se yuxtapone al complejo DJ_H dando lugar al reordenamiento VDJ_H (Tonegawa, 1983; Alt, 1984, 1986, 1987). Si éste es productivo (o sea, capaz de traducirse en una molécula de cadena pesada) inhibe posteriores reordenamientos en el otro alelo (exclusión alélica) (Alt, 1986). Si el reordenamiento fue abortivo, el otro alelo reordena VDJ, de tal forma que la célula (pre-B) sea capaz de expresar cadena pesada μ en el citoplasma. Previo a la producción de cadena pesada, el transcripto es modificado por el proceso de maduración del ARNm (empalme de los exones y poliadenilación) (Abbas, 1991; Yancopoulos, 1986).

La célula pre-B continúa reordenando un gen de cadena liviana kappa, con igual estructura genómica que la cadena pesada pero sin región D y con una sola región constante (Fig 3). Si fallan los reordenamientos en ambos alelos, se reordena el gen de la cadena liviana lambda (Fig 3) por un mecanismo similar. Las células que producen reordenamientos abortivos son eliminadas por muerte celular programada o apoptosis (Ales-Martínez, 1991).

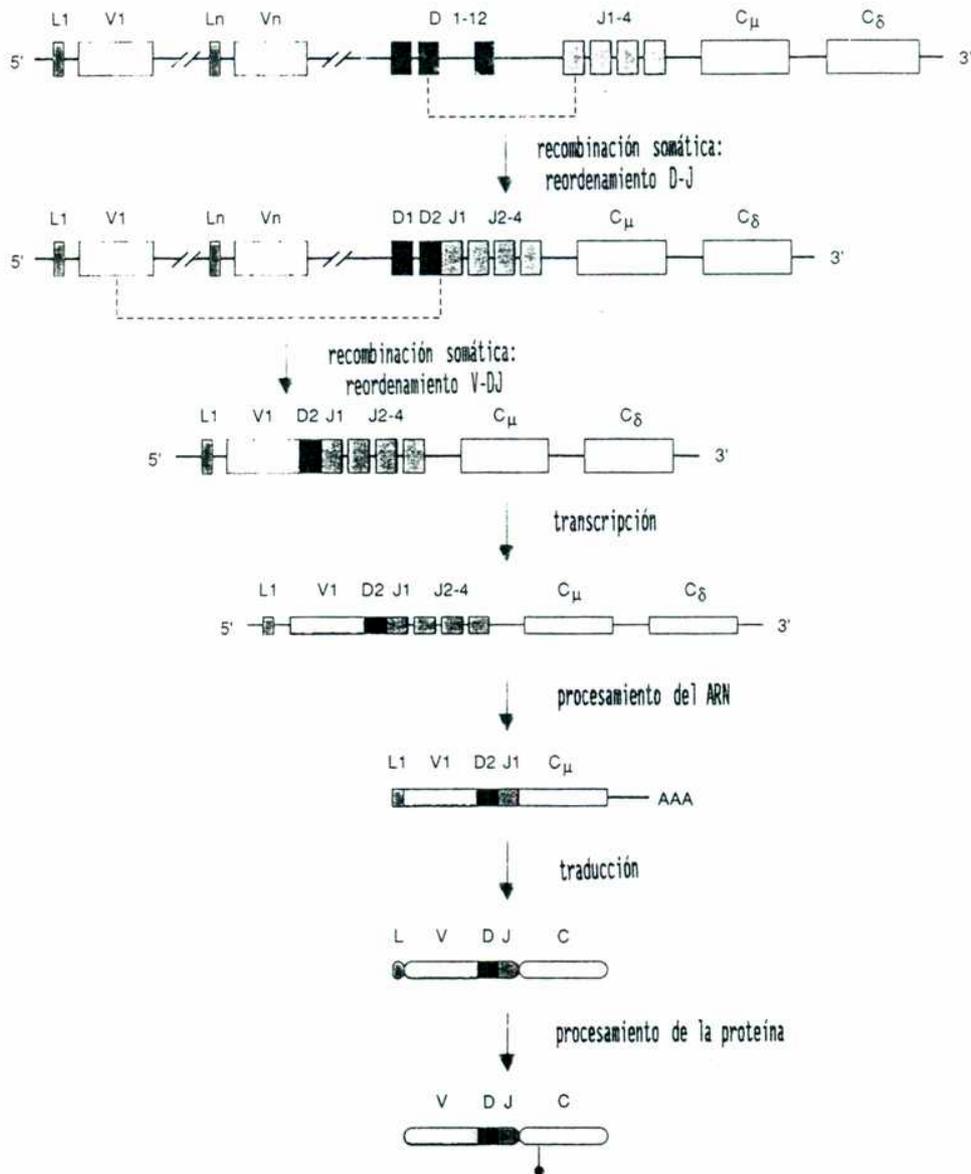


Figura 4: Reordenamiento VDJ del gen murino de la cadena pesada a partir de la estructura genómica germinal, transcripción y síntesis de la molécula proteica. Los segmentos génicos y las distancias entre ellos no están en escala. En humanos, el mecanismo es idéntico; sólo difiere en el número de regiones V, D y J_H en la configuración germinal. (Adaptado de Abbas, 1991).

Los reordenamientos de los genes de Ig representan una recombinación especial que involucra segmentos no homólogos y es mediada por "recombinasas". Estas enzimas son específicas para el tipo celular y son activas sólo en los estadios tempranos de la ontogenia linfocitaria. En el ADN intrónico hay secuencias de reconocimiento, localizadas en los intrones 3' de cada región V, 5' de cada región J y a ambos lados de cada región D. Estas señales de 7 (heptámero) y 9 (nonámero) bases, separadas por espaciadores de 12 y 23 bases, están altamente conservadas (Potter, 1990; Abbas, 1991).

Por otra parte, en la cadena pesada se produce mayor diversificación por la incorporación de nucleótidos N (bases no presentes en el ADN germinal) durante la recombinación VDJ, por la acción de la enzima desoxinucleotidil transferasa terminal (TdT) (Lieber, 1988).

Los reordenamientos del ADN descriptos son antígeno-independientes. Posteriormente a la estimulación antigénica se producen otros cambios en la estructura del ADN: mutaciones somáticas en la región variable, responsables de la maduración hacia una mayor afinidad del anticuerpo por el antígeno. Para que el linfocito B cambie de clase de Ig (producción de IgG, IgA o IgE), se produce otro proceso de recombinación donde participan las regiones "switch", ubicadas en el intrón inmediatamente 5' a cada región constante, y se deleta el ADN intermedio, como se esquematiza en la Fig 5. (Esser, 1990; Potter, 1990).

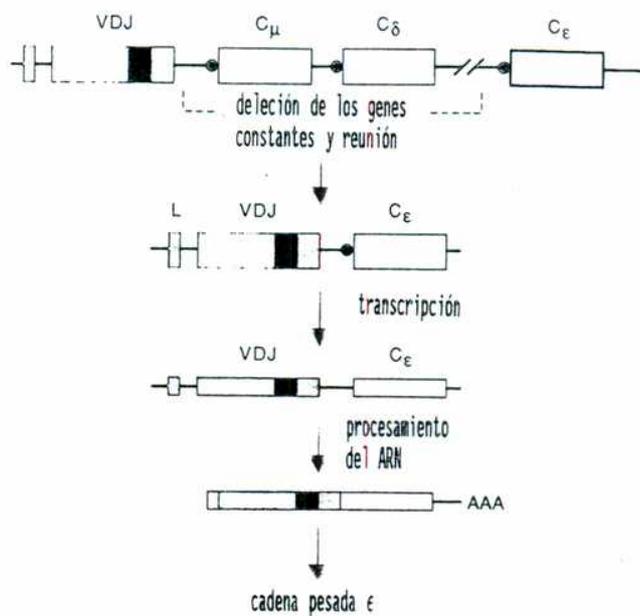


Figura 5: Mecanismo del cambio de clase de Ig (cadena pesada): a partir del ADN reordenado en una célula productora de IgM, la delección de las regiones constantes intermedias conduce a la recombinación del complejo VDJ con la región constante ε y expresión de IgE. Las regiones switch se representan con un círculo negro. (Adaptado de Abbas, 1991).

4- CARACTERISTICAS CITOGENETICAS:

A pesar de las diferencias clínicas y epidemiológicas observadas entre el linfoma endémico y el esporádico, todos presentan la misma anomalía citogenética: una translocación cromosómica recíproca específica. En el 85% de los casos se observa la $t(8;14)(q24;q32)$ y en el 15% restante la $t(2;8)(p12;q24)$ o la $t(8;22)(q24;q11)$ (Fig 2) (Yunis, 1983; Rowley, 1984; Sandberg, 1990). En todas participa la banda 8q24, locus del proto-oncogen c-myc. El otro cromosoma participante contiene uno de los genes de las inmunoglobulinas: cadena pesada en 14q32, cadena liviana lambda en 22q11 y cadena liviana kappa en 2p12. El resultado de estas alteraciones cromosómicas es la yuxtaposición del c-myc con uno de los genes de las inmunoglobulinas, cambio estructural típico del LB que conduce a la desregulación del oncogen (Battey, 1983). Mediante híbridos celulares con una línea de plasmocitoma murino y técnicas de clonado e hibridización in situ se demostró que en la $t(8;14)$ el c-myc se transloca de su posición normal en el cromosoma 8 al locus de la cadena pesada en el cromosoma 14 (Taub, 1982; Dalla-Favera, 1983). En cambio, en las translocaciones variantes, el c-myc permanece en el cromosoma 8 y parte del locus de cadena liviana del cromosoma 2 o 22 se transloca distalmente al c-myc en el cromosoma 8 (Erikson, 1983; Davis, 1984). Como la dirección de transcripción del c-myc es del centrómero al telómero, al igual que los genes de cadena liviana, en las $t(2;8)$ y $t(8;22)$ el c-myc y las secuencias translocadas de cadena liviana tienen la misma dirección de transcripción (la unión es "cabeza-cola") (Fig 6). Sin embargo, el gen de cadena pesada se transcribe en la dirección telómero-centrómero, por lo tanto, en la $t(8;14)$ la dirección de transcripción de los genes involucrados es opuesta (la unión es "cabeza-cabeza") (Fig 6).

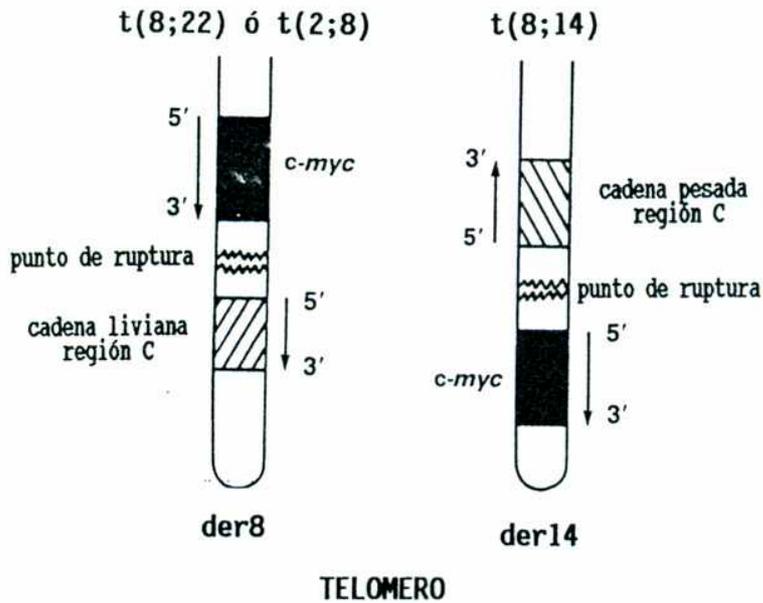


Figura 6: Esquema de la yuxtaposición del *c-myc* con los genes de las inmunoglobulinas como consecuencia de las translocaciones cromosómicas. Sólo se muestra el cromosoma derivado que porta el *c-myc*. La dirección de la transcripción de cada gen se indica con una flecha. En la $t(8;14)$ la orientación transcripcional de los genes es opuesta.

En las células de Burkitt el alelo normal del *c-myc* no se expresa, mientras que el involucrado en la translocación sí lo hace. (ar-Rushdi, 1983; Nishikura, 1983) Sin embargo, el nivel de ARNm y de proteína *c-myc* es semejante al de otras células normales en proliferación, es decir la transformación se produce por una expresión inapropiada del *c-myc* (Magrath, 1990). Se propuso que el oncogen no se expresaría en la célula normal equivalente a la célula de Burkitt (linfocito en reposo). Como la proteína *c-myc* es necesaria para la proliferación celular (Kelly, 1986), parece probable que la expresión inapropiada -debida a la activación por translocación- mantiene a la célula en un estado proliferativo cuando, en circunstancias normales, debería ser una célula en reposo.

Las secuencias regulatorias del gen de cadena pesada de las Ig participarían en la desregulación del c-myc. Sin embargo, por la orientación de los genes en la t(8;14), en el mecanismo de activación no participa el promotor de las Ig. El "enhancer" intrónico (localizado entre las regiones J_H y C_μ) (Gillies, 1983) no siempre queda yuxtapuesto al c-myc luego de la translocación. Lo más factible es que existan distintos mecanismos de activación del c-myc en LB, pues la localización de los puntos de ruptura del cromosoma 8 varía enormemente. En la t(8;14) puede estar a cierta distancia 5', dentro del gen mismo o en la región 5' inmediatamente flanqueante (Pellici, 1986; Barriga, 1988; Shiramizu, 1991). En las translocaciones variantes se encuentra a una distancia variable (2-300 Kb) 3' del oncogen (Davis, 1984; Hollis, 1984; Henglein, 1989). Por lo tanto, como consecuencia de una translocación, las regiones regulatorias del c-myc pueden quedar físicamente separadas del gen mismo o pueden estar estructuralmente dañadas. Notablemente, los puntos de ruptura nunca se han encontrado en la región traducible (exones 2 y 3), de tal forma que la proteína c-myc en LB es estructuralmente normal.

Para los linfomas con t(8;14), se ha observado una correlación entre la localización del punto de ruptura y el origen geográfico del tumor (Pellici, 1986; Barriga, 1988; Shiramizu, 1991): en el 75% de los pacientes de Africa ecuatorial se halla 5' lejano, mientras que en el 56% de los pacientes de EEUU está en el 1er exón/1er intrón y en el 30% en la región 5' flanqueante. Es importante señalar que ningún LB tiene dos alelos c-myc normales, siempre presentan un alelo estructuralmente alterado, ya sea truncado por la translocación (en la mayoría de los sLB) o presentando mutaciones puntuales en la porción 3' del primer exón (frecuentemente en eLB). Estos cambios estructurales probablemente no sean circunstanciales, sino que representan distintos factores de desregulación del c-myc.

El punto de ruptura del cromosoma 14 determina qué regiones del gen de la cadena pesada quedarán yuxtapuestas al c-myc, aportando otro factor de desregulación. El punto de ruptura también presenta heterogeneidad (Neri, 1988). Generalmente se ha observado en la región μ : V_H , D_H , J_H o $S\mu$, pero también ocasionalmente se ha demostrado cerca de otras regiones constantes como $C\alpha$ y $C\gamma$.

Inicialmente se observó una diferencia entre el sLB y el eLB en cuanto a la localización del punto de ruptura del cromosoma 14. En linfomas esporádicos se encontraba en o cerca de $S\mu$, mientras que en endémicos, en J_H (Neri, 1988). En un estudio posterior, con un mayor número de pacientes, no se pudo confirmar esta observación (Shiramizu, 1991). Si bien las rupturas en $S\mu$ son más frecuentes en el sLB, la localización del punto de ruptura más común en sLB y eLB es fuera de la región $S\mu$. Dicho estudio demostró una correlación entre el origen geográfico del tumor y la combinación de puntos de ruptura de los cromosomas 8 y 14.

5- MECANISMO Y ESTADIO DE DIFERENCIACION EN EL CUAL OCURREN LAS TRANSLOCACIONES CROMOSOMICAS:

No se sabe aún por qué ocurren las translocaciones. La banda 8q24 es un sitio frágil (sitio cromosómico particularmente susceptible de romperse in vitro por inducción con diversos agentes como, por ejemplo, la cafeína) (Hecht, 1984; Le Beau, 1986). También podrían deberse a una deficiencia en el sistema de reparación del ADN.

La localización de los puntos de ruptura del cromosoma 14 en regiones que se reordenan fisiológicamente apoya la hipótesis (Croce, 1985; Haluska, 1986) de que las translocaciones ocurren durante el reordenamiento VDJ_H (en aquellos casos con ruptura en J_H , o sea, principalmente eLB) o durante el cambio de clase (en aquellos linfomas con roturas en $S\mu$, o sea, mayoritariamente sLB)

o durante el reordenamiento VJ₁ de las cadenas livianas (en aquellos tumores con translocaciones variantes). En favor de esto se ha observado una concordancia entre la cadena de Ig expresada y el cromosoma participante. Así, las líneas celulares con roturas en S α o S γ de la cadena pesada, expresan IgA o IgG, respectivamente (Hamlyn, 1983; Showe, 1985); las t(8;22) están asociadas a expresión de lambda y las t(2;8) de kappa (Lenoir, 1982).

Si esta teoría es correcta, se plantean dos hipótesis explicativas del mecanismo de las translocaciones: 1) Serían mediadas por el sistema de recombinasas y 2) Ocurrirían debido a una estructura cromatínica más abierta y por consiguiente más susceptible a roturas (esto es necesario para que las enzimas accedan al ADN para reordenarlo). En este caso actuarían topoisomerasas y enzimas de reparación. En favor de la primera hipótesis, en una línea celular (P3HRI) se han encontrado señales semejantes a heptámeros/nonámeros en las regiones del punto de ruptura correspondientes al cromosoma 8 (Haluska, 1986, 1987). Por otra parte, este mecanismo se ha demostrado para las t(11;14) y t(14;18) en otras neoplasias B (Tsujiimoto, 1985, 1986). Sin embargo, el sitio específico de ruptura en P3HRI no coincide exactamente con los sitios de ruptura fisiológicos y, más aún, en otras líneas celulares donde se ha clonado la zona de la translocación, no se han encontrado dichas secuencias señales (Neri, 1988). Otra observación contrapuesta es la presencia de puntos de ruptura en regiones "switch" en una línea celular pro-B (FLEB-14) (Altoik, 1989).

Independientemente del mecanismo por el cual ocurren las translocaciones, se propone que existen algunos períodos específicos durante la diferenciación de las células B durante los cuales una célula puede transformarse en una célula de Burkitt (Magrath, 1990). Las diferencias en el grado de diferenciación de las células donde se produce la alteración genética podría reflejarse en las distintas manifestaciones clínicas del tumor.

6- ESTRUCTURA Y FUNCION DEL GEN c-myc:

El c-myc es un proto-oncogen por su capacidad transformante luego de su activación por amplificación, inserción viral o translocación cromosómica (Land, 1983; Klein, 1984; Bishop, 1987). Como tal, está altamente conservado en la evolución. Se descubrió por el gen retroviral homólogo: v-myc, causante de la mielocitomatosis aviaria (virus MC29) (Graf, 1978).

El c-myc consta de 3 exones (el v-myc carece del primer exón). Los tres exones están presentes en el ARNm, pero sólo el segundo y aproximadamente 2/3 del tercero codifican la proteína. El primer exón consiste de 550pb, no contiene un ATG y presenta múltiples codones de terminación en los 3 marcos de lectura, siendo entonces no traducible. En las posiciones 5839 y 5980 existen dos señales de poliadenilación AATAAA (Battey, 1983; Hamlyn, 1983; Watt, 1983). El ARNm tiene una vida media corta, de unos 30 minutos (Rabbits, 1985). Tanto la proteína del c-myc como la del v-myc están fosforiladas, se localizan en el núcleo celular y se pueden unir inespecíficamente a ácidos nucleicos (ADN y ARN) con una alta afinidad. Como se esperaría para una proteína regulatoria, la vida media es muy corta: 15-20 min (Rabbits, 1985).

La proteína c-myc se ha hallado en una gran variedad de tipos celulares. Aunque no se conocen con certeza sus efectos bioquímicos, se sabe que está involucrada en el control de la proliferación celular. Se piensa que estimula la duplicación del ADN (Classon, 1987), uniéndose a los orígenes de replicación. En relación a esto, recientemente se demostró que una alta expresión del c-myc conduce a amplificación del gen de la dihidrofolato reductasa en células tratadas con metotrexato. (Denis, 1991). Esto se debe a que la amplificación génica puede ser una consecuencia de una sobre-replicación del ADN.

Todas las células en crecimiento expresan c-myc y las células que entran en G₀ como etapa de su ciclo celular o en virtud de su diferenciación final, como regla, inhiben su expresión. Es interesante mencionar que las células de Burkitt pueden ser inducidas in vitro a diferenciarse pero el c-myc no es silenciado (Benjamin, 1984). Rabbits (1985) demostró que el ARNm del c-myc está presente durante todas las etapas del ciclo celular. Tanto el mRNA como la proteína son sintetizados durante G₁ y G₂. La expresión del c-myc puede ser modulada rápidamente, siendo inducida durante la transición de G₀ a G₁ en las células en reposo, pero persiste a lo largo del ciclo celular en las células en crecimiento.

Es muy probable que el producto del c-myc actúe como un transactivador (Seth, 1991), capaz de unirse a secuencias regulatorias de otros genes, siendo necesario para la recepción o transducción de señales provocadas por un factor de crecimiento. Sorprendentemente, el c-myc que está involucrado con la progresión del ciclo celular, con inhibición de la diferenciación y con transformación, participa también en apoptosis (Shi, 1992; Evan, 1992). Los linfocitos T inmaduros sufren una muerte celular programada cuando son activados a través del complejo del receptor T. Esta apoptosis inducida por activación depende de una activa síntesis de ARN y proteínas en las células que están muriendo. Se observó que oligonucleótidos complementarios del c-myc, que inhiben la síntesis de proteína myc, anulan dicha apoptosis (Shi, 1992). En otro trabajo, Evan (1992) observó que la expresión constitutiva del c-myc es un potente inductor de apoptosis en fibroblastos, cuando se combina con un bloqueo de la proliferación. Postulan que el producto del c-myc activa el mecanismo apoptótico pero que el destino de cada célula estaría controlado por otros factores aún no identificados. Los dominios proteicos necesarios son los mismos que participan en la transformación e inhibición de la diferenciación.

Parece contradictorio que un mismo gen regule la proliferación y la muerte celular programada, dos procesos opuestos. Sin embargo,

se puede hipotetizar una explicación: la célula tendría un riesgo muy alto, ya que cualquier mutación que desregulara al c-myc sería oncogénica. Ahora bien, si c-myc también activa "genes apoptóticos", las células que expresan c-myc proliferarán sólo si se suprime activamente el camino de muerte celular programada.

El c-myc humano posee cuatro promotores, los principales son P1 y P2 (Battey, 1983), en el comienzo del primer exón y separados por 160 pb. Las células normales utilizan P2 cuatro veces más que P1, representando el 75-90% del mRNA y el 10-25% del ARNm, respectivamente (Leder, 1983).

P1 y P2 poseen un solo marco de lectura abierto que codifica 2 proteínas, una mayoritaria de peso molecular 64kD y otra de 67 kD. Esta última se inicia en un codón CTG (en el primer exón) 14 codones antes del ATG donde comienza la traducción del producto proteico de 64 kD en la región 5' del segundo exón (Hann, 1988).

Los otros dos promotores son menos conocidos, P0 se halla localizado 550-650 pb 5' a P1 (Bentley, 1986a), y P3, que es muy débil, en el primer intrón (ar-Rushdi, 1983). P0 y P3 contribuyen con menos del 5% del mRNA del c-myc en células normales. El transcrito de P0 tiene tres marcos de lectura abiertos, siendo uno idéntico al de P1/P2 y los otros tienen codones de iniciación 5' a P1 y potencialmente codifican proteínas de 188 y 114 aminoácidos. P3 tiene varios sitios de iniciación y por encontrarse en el intrón, su capacidad codificante está limitada a la proteína de 64kD.

En LB la utilización de los promotores está alterada. En aquellos que los conservan, P1 es mayoritario, cambiando la relación P1/P2 a >1 (Leder, 1983). Dado que ambos codifican para las mismas proteínas, no presentan diferencias de estabilidad y el nivel de ARNm en LB es semejante al de otras células en proliferación, parece probable que el cambio en el uso de P1 y P2

en LB sea un reflejo de la regulación alterada del c-myc y no tenga importancia patogénica per sé . Más aún, se demostró que el alelo translocado se expresa en altos niveles, mientras que la actividad transcripcional del alelo normal está suprimida en LB (Leder, 1983; ar-Rushdi, 1983) sugiriendo que el alelo normal y el alterado se encuentran bajo diferentes controles transcripcionales. La estructura cromatínica y el nivel de metilación del alelo normal serían las causas principales de que el mismo no se transcriba en LB (Dyson, 1985). Esto sugiere que la célula equivalente normal del LB sería una célula que no expresa c-myc, y por consiguiente, en reposo (linfocito B virgen o linfocito de memoria) (Magrath, 1990).

Cuando el punto de ruptura se haya en el primer intrón, los transcriptos se inician en P3. Como resultado, se produce la misma proteína pero a partir de un transcripto distinto, con secuencias líder diferentes y una vida media duplicada. En un estudio más reciente (Eick, 1990) se observó que la expresión de P0 y P3 está regulada independientemente de P1/P2. El nivel de ARNm iniciado en P0 es muy variable en LB, siendo no detectable en algunas líneas celulares, hasta constituir el 10% del ARNm en otras. Esta variación no se correlaciona con el nivel de utilización de P1/P2 ni con el tipo de translocación cromosómica. El alelo expresado es siempre el translocado, sufriendo P0 la misma supresión alélica que P1/P2. Contrariamente, el ARNm de P3 no está restringido al alelo truncado en LB con rupturas en el primer exón/intrón, pudiendo transcribirse también el alelo normal. Existe un sitio de iniciación potencial, 10 codones antes del segundo exón, pero su funcionalidad no se conoce aún.

La expresión del c-myc está altamente regulada y el principal control se realiza a nivel de transcripción. La abundancia de mRNA iniciados en P1/P2 está gobernada por una serie de reguladores positivos y negativos, ubicados en la región 5' flanqueante (2,3 Kb 5' a P1) (Hay, 1987; Siebenlist, 1988), en el primer exón e intrón. Tanto P1 como P2 presentan características típicas de los

promotores de mamíferos, incluyendo el TATA box y una región rica en GC donde se uniría el factor de transcripción SP1. Se han descrito varias regiones regulatorias; las principales son las siguientes:

- 1) -101/-293: esencial para la transcripción desde P1 y puede duplicar la transcripción desde P2.
- 2) -293/-353: represor que actúa sobre los dos promotores cuando están sujetos únicamente a las secuencias 3' del mismo.
- 3) -353/-2329: fuertes efectos positivos sobre P1 y P2. Contiene 2 dominios de unión a NFI (factor de transcripción positivo) y algunas secuencias semejantes a las secuencias consenso de los enhancers.
- 4) Atenuación de la transcripción en el extremo 3' del primer exón (bloqueo de la elongación, impidiendo el paso de la ARN polimerasa II). (Bentley, 1986b)
- 5) En el primer intrón existe un sitio de unión (20pb) de una posible proteína regulatoria MIF ("myc intron factor") (Zajac-Kaye, 1988).

Por otra parte, en la cromatina existen sitios que son hipersensibles a la digestión con ADNasa I que representan secuencias importantes cerca de los genes activos. En la cromatina alrededor del c-myc transcripcionalmente activo se han descrito cinco sitios (I, IIa, IIb, IIIa, IIIb) y uno de ellos (IIa) es donde se une el factor nuclear I (NFI) (Dyson, 1985). En el LB, a pesar de que el c-myc se encuentra desregulado, no se han observado cambios en el patrón de dichos sitios, salvo la pérdida de algunos debido a la translocación que incluso no se correlacionan con cambios en el nivel de mRNA. Sin embargo, pueden aparecer nuevos sitios hipersensibles en el gen de inmunoglobulina, cerca del punto de ruptura (Dyson, 1985). Esto indica que nuevas regiones de control se hallan cerca del c-myc luego de la translocación, pudiendo causar su expresión constitutiva.

Todos los elementos descritos regulan la transcripción del c-myc. Pero es muy probable que exista además una regulación de la actividad biológica del c-myc a nivel post-traducciona. Hay evidencias sustanciales de que la fosforilación es un mecanismo importante en el control funcional de los factores de transcripción y, por consiguiente, de la expresión génica. Recientemente se ha demostrado que la Ser⁶² es un sitio de fosforilación de myc (Seth, 1991). El dominio NH₂-terminal es necesario para la transformación y está altamente conservado en los otros miembros de la familia de genes myc (c-myc, N-myc, L-myc). La ubicación de la Ser⁶² dentro de este dominio conservado sugiere que la fosforilación de la proteína c-myc regularía la función del dominio transactivador. De hecho, Seth (1991) observó que la fosforilación de dicho residuo está asociada a un incremento en el nivel de transactivación génica.

En los últimos años se ha podido conocer la estructura proteica de c-myc, correlacionándose con su actividad reguladora.

La proteína del gen c-myc humano posee una región de unión al ADN de aminoácidos básicos adjacente a un dominio hélice-lazo-hélice (Rabbits, 1991). El dominio hélice-lazo-hélice (HLH) es un nuevo tipo de motivo proteico que permite la dimerización (Visvader, 1991). Caracteriza a una familia de proteínas implicadas en la regulación de la transcripción, oncogénesis y/o diferenciación celular, incluso en proteínas que se unen a "enhancers".

El dominio HLH abarca aproximadamente 60 aminoácidos y comprende dos alfa-hélices separadas por un lazo intermedio (con un tamaño y secuencia conservados), estructura que media la dimerización de polipéptidos. En las proteínas activadoras generalmente está precedido por un motivo altamente básico, de 10-20 aminoácidos, que determina la especificidad de unión al ADN.

Las proteínas con HLH pueden formar homodímeros o heterodímeros con otros miembros de esta familia, modulando su capacidad de unión al ADN. Esta estructura básico-HLH de c-myc le

permite interactuar con la proteína Max, también con un motivo básico-HLH (Blackwood, 1991). El c-myc tiene también un segundo dominio de dimerización en la región carboxi-terminal: el cierre de leucina (Landschulz, 1988), que permite la interacción con otras proteínas. Esta repetición periódica de residuos leucina, espaciados cada 7 aminoácidos, ha sido identificada en varias proteínas reguladoras transcripcionales que se unen al ADN en una secuencia específica, como jun y fos. Rabbits (1991) propone que en las células existiría un equilibrio de interacciones proteicas, donde los niveles de las proteínas individuales controlarían las concentraciones relativas de los diversos monómeros y dímeros. Cuando cambia la expresión de algún componente, el desequilibrio provocado produciría una alteración de la transcripción de los genes respondedores al c-myc y a las otras proteínas con las que interactúa.

7- CONSECUENCIAS DE LOS CAMBIOS ESTRUCTURALES DEL GEN c-myc EN LB:

Se ha postulado que la activación transcripcional del c-myc resulta de su yuxtaposición con un gen de inmunoglobulina. Sin embargo, todavía no es claro cuáles son los mecanismos específicos por los cuales el gen de Ig contribuye a la activación. Probablemente la translocación ocurra en una célula en proliferación (durante el reordenamiento VDJ, o durante el cambio de clase) y, como consecuencia, pierde la capacidad de silenciar o inactivar uno de los alelos c-myc (que normalmente se logra por un cambio de la cromatina). Además, las alteraciones estructurales en las regiones regulatorias del c-myc permitirían un ajuste fino del nivel de expresión.

Como se mencionó anteriormente, una característica común a todos los LB es la existencia de un alelo c-myc (el translocado) estructuralmente alterado. Los cambios son variables, desde mutaciones puntuales hasta la separación física del 2do y 3er exón.

Por lo tanto, los mecanismos que conducen finalmente a la expresión inapropiada del c-myc seguramente son variados y se correlacionan con las diferencias clínicas y epidemiológicas descritas.

De aquí surge la importancia del análisis de los puntos de ruptura en los cromosomas participantes en la translocación, pues determinan qué regiones del c-myc y de los genes de las inmunoglobulinas quedan yuxtapuestas. Asimismo, pueden causar daños estructurales en las regiones regulatorias o separar a las mismas del resto del gen.

En el caso de puntos de ruptura 5' lejanos a c-myc [en t(8;14)], a pesar de que el gen se transloca entero, se han observado mutaciones puntuales en el límite del 1er exón/1er intrón. Esto ocasiona, al menos en algunos casos, la eliminación del bloqueo de la transcripción. Otra consecuencia es la inhabilidad de sintetizar la proteína de 67kD, aunque su significado es especulativo.

En cuanto a los puntos de ruptura en la región 5' flanqueante del c-myc, pueden tener una serie de efectos dependiendo de qué regiones regulatorias queden adyacentes al resto del gen. Por ejemplo, mutaciones en la región supresora contribuirían con un aumento de la expresión.

Cuando el punto de ruptura se localiza en el primer exón/primer intrón del c-myc, se pierden las regiones regulatorias y los promotores principales. El gen se transcribe desde P3 cuando se haya bajo la influencia de un "enhancer" (probablemente aportado por el gen de la cadena pesada) y sólo se produce la proteína de 64 KD.

Los puntos de ruptura 3' a c-myc se hayan muy dispersos, desde 7 hasta 300 Kb. Frecuentemente están asociados a mutaciones en la región de 600 pb que contiene el límite del primer exón/ primer

intrón (Szajnert, 1987), pudiendo tener consecuencias similares a las roturas 5' lejanas.

A pesar de todo esto, se ha demostrado que un gen c-myc truncado, e incluso un gen normal, es incapaz de inducir tumores en ratones transgénicos (Cory, 1986). Por lo tanto, la yuxtaposición con un gen de inmunoglobulinas es esencial para la linfomagénesis. Esto hace suponer que debería haber una correlación entre el punto de ruptura del cromosoma 8 y el del otro cromosoma participante. De hecho, las roturas 5' o dentro del c-myc están invariablemente asociadas a las t(8;14) mientras que las roturas 3' a c-myc se observan exclusivamente en las t(2;8) o t(8;22). Más aún, en el grupo de las t(8;14), la mayoría de los puntos de ruptura en S μ se correlacionan con puntos de ruptura dentro del c-myc.

8- VIRUS DE EPSTEIN-BARR Y LB:

Desde el descubrimiento de Epstein, Achong y Barr en 1964 de partículas de un virus herpes en líneas celulares establecidas de linfomas africanos, se ha avanzado mucho en el conocimiento de la biología del virus de Epstein-Barr (EBV) (Purtilo, 1987). Es el causante de la mononucleosis infecciosa (Henle, 1968) y está asociado a diversos procesos malignos como el linfoma de Burkitt (Barriga, 1988; Shiramizu, 1991), el carcinoma nasofaríngeo (Desgranges, 1975) y la enfermedad de Hodgkin (Pallesen, 1991a; Armstrong, 1992). En LB todavía no está claro qué rol cumple. En un principio se postuló que era el factor etiológico (Epstein, 1964; Haddow, 1970). Aunque esto está actualmente descartado, existen evidencias de que tiene importancia en la linfomagénesis. Para abordar este tema, es necesario mencionar diversas observaciones así como algunos aspectos básicos de la biología del EBV.

En 1967 se reconoció que los pacientes africanos tenían títulos elevados de anticuerpos contra el antígeno de la cápside

viral (VCA) y, con alta frecuencia, también anticuerpos contra los antígenos tempranos (EA) (Henle, 1967a). Subsecuentemente quedó claro que virtualmente todos los linfomas africanos presentan genomas virales en sus células mientras que en los linfomas esporádicos se hallan sólo en una minoría (20-30%) (Kiwauka, 1988; Barriga, 1988; Shiramizu, 1991).

El hecho de que el EBV pueda transformar e inmortalizar linfocitos B in vitro (Henle, 1967b) y causar síndromes linfoproliferativos o linfomas en pacientes inmunodeficientes (Purtilo, 1987), sugiere que el virus sería importante en la patogénesis de los LB EBV+.

El virus de Epstein-Barr es un virus herpes envuelto por una membrana, con ADN lineal, doble cadena de 173 Kb (Farrell, 1989). El genoma consiste de dos dominios únicos, uno corto, de 15000 pb (Us) y otro más extenso de 150000 pb (U1), separados por repeticiones en tandem de una secuencia de 3071 pb (Ir). Dentro del dominio más extenso, hay otras regiones internas repetidas y cada extremo del ADN viral incluye 4-12 copias de una secuencia (500 pb) terminal repetida (TR) en tandem.

El EBV ingresa al cuerpo humano a través de secreciones, generalmente saliva, de otros individuos que contienen partículas virales. Se ha calculado que para la edad adulta, el 90% de la población mundial posee anticuerpos contra EBV (Henle, 1979). La infección ocurre más temprano en las poblaciones económicamente menos privilegiadas. Por ejemplo, en Africa Ecuatorial, el 100% de los niños están infectados a la edad de 3 años (de-Thé, 1975).

En la infección primaria el virus establece un ciclo lítico (productivo) en las células epiteliales de la orofaringe. Esta infección lítica de células epiteliales persiste a lo largo de toda la vida en individuos normales. Los viriones liberados podrían infectar linfocitos del tejido linfoide adyacente o de los

capilares de la mucosa. También es posible que los linfocitos sean infectados directamente durante la exposición primaria en los tejidos linfoides asociados a la mucosa, como las amígdalas. No está claro aún, hasta qué grado los viriones liberados de las células epiteliales infectan linfocitos luego del desarrollo de anticuerpos neutralizantes. Los linfocitos infectados también persisten a lo largo de toda la vida y, más aún, la frecuencia de aquellos circulantes es constante (incluso luego de un tratamiento con aciclovir que inhibe el ciclo lítico). Por lo tanto, parece probable que el mantenimiento de linfocitos infectados sea independiente de la infección lítica epitelial.

Si bien por mucho tiempo se creyó que el EBV era B-linfo-trópico, en 1988 Jones describió linfomas T asociados a EBV. Además, el EBV es capaz de infectar células B inmaduras (Hansson, 1983), lo cual podría representar otro reservorio de células EBV+ para su mantenimiento.

El virus penetra en los linfocitos B por medio del receptor de C3d (molécula CD21), que se expresa sólo en células en reposo (Magrath, 1990). La infección in vitro conduce a la transformación de los linfocitos, producción de Igs (Kirchner, 1979) y propagación del clon infectado (Henle, 1967b). Sin embargo, in vivo, las células infectadas son controladas por el sistema inmune en individuos normales.

Los linfocitos B infectados son transformados luego del establecimiento del ciclo latente del EBV (no productivo) (Kieff, 1990). Cuando penetra el virión, pierde la envoltura, el ADN se circulariza y permanece como episoma, que se replica simultáneamente al ADN celular. Durante el proceso de circularización, en el provirus quedan incorporadas un número variable de regiones repetidas terminales (TR) (Kintner, 1979). De esta forma, en cada linfocito infectado habrá múltiples copias del episoma, pero todas con el mismo número de TRs.

El rol potencial del EBV en LB está relacionado con su ciclo latente, pues la infección lítica -asociada a muerte celular- sería incompatible con un crecimiento neoplásico. La mayoría de los genes latentes son antígenos nucleares (EBNA), o sea, proteínas presentes en el núcleo celular en ausencia del ciclo lítico (Rowe, 1986, 1987). Se han descrito 6 EBNA (EBNA 1 - EBNA 6) (Farrell, 1989). Además se expresan la proteína latente de membrana (LMP) y 2 pequeños ARNs no poliadenilados (EBERs), transcritos por la ARN Polimerasa III, que estarían relacionados con la traducción y procesamiento de los mRNA virales.

EBNA 1 es una proteína que se une a una región del genoma ("oriP") que contiene el origen de replicación del episoma (Yates, 1984). Esta unión es necesaria para la replicación del ADN viral. EBNA 1 regula el número de copias por célula y también su propia expresión. EBNA 2 parece ser necesario para la transformación de linfocitos, ya que cepas virales deficientes, con deleciones de este gen, no son transformantes. La proteína es un transactivador que se une al ADN e influencia la expresión de otros genes (Magrath, 1993). No se conoce aún la función de los otros 4 EBNA descritos (EBNA 3-6). LMP es una proteína de membrana de las células infectadas.

Luego de una infección primaria por EBV, la cual es controlada por células NK ("natural killers") y linfocitos T citotóxicos inespecíficos, los individuos normales desarrollan inmunidad celular específica. En este proceso serían importantes las proteínas LMP y EBNA.

En los procesos neoplásicos como el LB, las células tumorales deben evitar la acción de los linfocitos T. Se ha demostrado que la expresión de genes latentes virales en las células de Burkitt es diferente a lo descrito para líneas linfoblastoideas (Rowe, 1986, 1987). LMP, EBNA 2 y EBNA 5 virtualmente no se expresan en LB EBV+. Por lo tanto, dichas proteínas no son esenciales para la

proliferación de las células de Burkitt. Esto no es sorprendente ya que el c-myc desregulado probablemente hace que no se requiera la misma conducción proliferativa que en el caso de las líneas celulares. Además, dichas proteínas son blanco para los linfocitos T citotóxicos y, obviamente, sólo las células que puedan escapar a la inmunidad celular dirigida contra EBV, podrán proliferar como un tumor. El único gen viral que invariablemente se expresa en los LB asociados a EBV es EBNA 1.

Como se mencionó al principio, todavía es controvertido el rol del EBV en la patogénesis del LB. Si bien existe consenso general en que el virus no sería un mero pasajero en el LB, hay dos hipótesis generales, que no son mutuamente excluyentes: 1) El virus aumentaría el número de células susceptibles de sufrir translocaciones. 2) El virus sería crítico en la desregulación del c-myc, participando directamente, quizás mediante EBNA 1.

En favor de la primera hipótesis, no hay duda de que el EBV incrementa la población de linfocitos B y es capaz de transformarlos (in vitro). Pero, aunque parece muy probable que el EBV infecte a las células antes de que ocurra la translocación cromosómica, no se puede descartar la posibilidad de que la infección sea posterior al rearrreglo citogénético y por consiguiente represente el elemento final para la transformación de una célula que contiene un c-myc yuxtapuesto a un gen de Ig. Recientemente se ha demostrado que el EBV precede la expansión clonal del LB (Neri, 1991).

Apoyando la segunda hipótesis, recientemente se demostró que EBNA 1, in vitro, puede incrementar la actividad del enhancer de Ig, transactivando indirectamente al c-myc (Magrath, 1993). Además, se ha descrito una correlación entre la presencia del EBV y el punto de ruptura del cromosoma 8 en el locus del c-myc (Barriga, 1988; Shiramizu, 1991). 22/23 linfomas con roturas 5' lejanas a c-myc (o sea principalmente eLB) son EBV+. En cambio, los tumores con

roturas dentro del c-myc (o sea mayoritariamente sLB) pueden o no estar asociados a EBV. Es más, cuando la rotura se produce en la región 5' flanqueante del c-myc, el LB es EBV-. Esto sugiere que el virus es necesario en determinados cambios estructurales del c-myc para completar el proceso de transformación maligna.

9- OTRAS ANOMALIAS GENETICAS:

Desde que Nowell (1976) postuló la teoría de que el cancer es un proceso en múltiples etapas hubo diversas y variadas evidencias a su favor. Actualmente se piensa que el fenotipo maligno es el resultado de la acumulación de varios cambios genéticos discretos; cada uno juega un papel y, generalmente, ninguno es por sí mismo suficiente para transformar a una célula. Así, cuando una célula acumula suficientes cambios genéticos adquiere la capacidad de constituir un tumor maligno. (Esto no implica que dichos cambios sean azarosos). Para el carcinoma de colon se han descrito las mutaciones necesarias para el proceso de transformación desde un pólipo benigno hasta un carcinoma, con activación de proto-oncogenes e inactivación por mutación de genes supresores del crecimiento tumoral (Vogelstein, 1991).

De manera similar, es muy probable que para el LB se requiera algo más que el c-myc desregulado. De hecho, en modelos animales se ha observado una fase pre-neoplásica con hiperplasia B anterior a la inducción de un linfoma monoclonal (Cory, 1986) y el c-myc tendría importancia patológica en presencia de un genotipo determinado, o sea en un "ambiente" celular apropiado. Seguramente se requieren cambios genéticos adicionales o, alternativamente, diversas lesiones pueden cooperar con el c-myc desregulado en el proceso de linfomagénesis. Hasta 1991 no se habían observado otras anomalías genéticas persistentes en LB, aparte de las mencionadas translocaciones cromosómicas, aunque en sLB son frecuentes las alteraciones del cromosoma 1 (Douglass, 1980).

La pérdida de función (por delección o mutación) de un gen recesivo involucrado en la inhibición de la proliferación (anti-oncogen o gen supresor) se ha observado en diversos tipos de tumores sólidos (Levine, 1990; Weinberg, 1991). El prototipo es el gen del retinoblastoma (Knudson, 1985) y en los últimos años se han identificado varios más: p53 (Levine, 1991), DCC, MCC (Kinzler, 1991), etc.

El gen p53 es especialmente interesante pues las mutaciones en éste constituyen la alteración génica más frecuente en cánceres humanos (Nigro, 1989). Además, presenta un comportamiento especial: la proteína normal suprime el crecimiento y la división celular (gen supresor) pero algunas proteínas mutantes adquieren una función y estimulan la proliferación (oncogen) (Michalovitz, 1991).

El locus del p53 se encuentra en el cromosoma 17 (17p13) (Isobe, 1986) y codifica para una fosfoproteína nuclear de 53 kD. Se han postulado dos alternativas para explicar el funcionamiento del p53 (Levine, 1991; Michalovitz, 1991): podría regular la iniciación de la replicación y la entrada al estadio S; o podría actuar como un transactivador regulando la transcripción génica (la proteína posee una estructura que le permitiría unirse al ADN).

En muchas formas hereditarias (Srivastava, 1990; Malkin, 1990) y adquiridas (Nigro, 1989; Hollstein, 1991) de cancer, se han observado mutaciones puntuales dentro del gen p53 y también la pérdida de un alelo, pequeños reordenamientos y delecciones. Por ejemplo, la pérdida de heterocigosis o reducción a homocigosis se ha descrito en tumores de colon, pulmón, mama, sistema nervioso central, etc.

Las mutaciones tienen ciertas características: la mayoría son mutaciones que producen un cambio en un aminoácido; generalmente no están distribuidas al azar sino que el 98% (Hollstein, 1991) se encuentran entre los residuos 110 y 307 (exones 5 a 8), en 4

regiones altamente conservadas a lo largo de la evolución (amino-ácidos 117-142; 171-181; 234-258; 270-286) (Nigro, 1989); hay al menos tres codones especialmente susceptibles que se consideran puntos críticos: 175, 248 y 273; todas las mutaciones conducen a una proteína que se estabiliza y por lo tanto se acumula en la célula (Hinds, 1990; Gannon, 1990).

Sin embargo, las distintas proteínas mutantes presentan diferentes propiedades biológicas y bioquímicas, en cuanto a su capacidad para regular negativamente la proliferación celular, transactivar otros genes y cooperar con otros oncogenes como ras (Hinds, 1989) y c-myc (Ronen, 1991). Esto está relacionado con la posición y el tipo de mutación. En un análisis de 280 mutaciones descritas (Hollstein, 1991) se demostró que el espectro mutacional (distribución) es diferente para cada tipo tumoral: colon, mama y pulmón. Se piensa que esto sería consecuencia de distintos orígenes de las mutaciones: distintos agentes carcinógenos, diferentes capacidades de reparación del ADN, distintos grados de metilación del ADN, etc, actuarían en los diversos tipos celulares.

Actualmente se considera al gen p53 como un gen supresor (Levine, 1992), cuya pérdida o mutación contribuye a un crecimiento desregulado. Sin embargo, algunos mutantes se comportan como oncogenes dominantes, en presencia del alelo normal. En estos casos, parecería que algunas mutantes actúan en forma dominante positiva (ganancia de una función) mientras que otras actúan en forma dominante negativa (bloqueando la función de la proteína normal) (Levine, 1991; Michalovitz, 1991).

Dado que ratones transgénicos portadores de alelos mutados del p53 desarrollan linfomas (Lavigneur, 1989) y que el p53 se expresa en altos niveles en desórdenes linfoproliferativos (Prokocimer, 1986), parece probable que este gen esté involucrado en neoplasias hematológicas. En un estudio reciente (Gaidano, 1991), se analizaron diversos tipos de leucemias agudas, crónicas y linfomas

no-Hodgkin. Se observaron mutaciones en el p53 en una proporción de los linfomas de Burkitt (incluyendo líneas celulares) y de las leucemias linfáticas crónicas (principalmente en los estadios tardíos).

OBJETIVOS

Dado que la información existente sobre la biología del SNCL proviene de EEUU, Europa y Africa ecuatorial - donde se han demostrado diferencias epidemiológicas - el objeto de esta Tesis Doctoral es la caracterización molecular del SNCL sudamericano. Los objetivos específicos son:

- 1- Determinar la presencia de la translocación cromosómica 8;14 en pacientes sudamericanos y localizar en forma precisa los puntos de ruptura en los genes involucrados. Utilizar esta caracterización para comprender los mecanismos de desregulación del oncogen c-myc en SNCL, aspecto fundamental de la linfomagénesis.
- 2- Determinar la incidencia del EBV en SNCL sudamericano, su asociación con los diferentes cambios estructurales del c-myc y con el origen geográfico del paciente, a fin de discernir el rol biológico del virus.
- 3- Correlacionar los hallazgos moleculares con datos clínicos y epidemiológicos. Analizar los posibles determinantes geográficos en función de la heterogeneidad del SNCL.
- 4- Investigar otras anomalías genéticas en el SNCL de Sudamérica, tales como mutaciones en el gen supresor p53, y su importancia en la linfomagénesis y/o progresión tumoral.
- 5- Determinar el estadio de diferenciación de las células B en el cual se produciría la translocación 8;14 y su implicancia en la patogénesis del SNCL.

MATERIALES
Y
METODOS

1- PACIENTES:

Se recolectaron biopsias tumorales de 39 pacientes ingresados en el Hospital de Niños "Ricardo Gutiérrez" y Hospital de Pediatría "Prof Dr Juan P Garrahan", ambos en Buenos Aires, Argentina; Hospital AC Camargo, San Pablo, Brasil; CIIH Domingos Boldrini, Campinas, Brasil; Hospital Infantil Luis Calvo Mackenna y Hospital de Niños Roberto del Río, Santiago, Chile. La edad, sexo y principales características clínicas se detallan en la Tabla 1. Las muestras se obtuvieron al momento del diagnóstico y se mantuvieron congeladas (-70 °C) hasta su procesamiento. El diagnóstico de linfomas a células pequeñas no clivadas fue realizado en cada Centro según criterios clínicos, histopatológicos e inmunológicos. No se realizaron estudios citogenéticos.

En algunos estudios, se consideró importante analizar muestras de linfomas de origen africano y norteamericano. Para ello, el Dr Ian T Magrath (National Cancer Institute, EEUU) gentilmente cedió alícuotas de ADN genómico de las mismas.

2- AISLAMIENTO Y PURIFICACION DE ADN A PARTIR DE BIOPSIAS TUMORALES:

El tejido congelado fue disgregado con bisturí y colocado en un tubo con buffer de Proteinasa K (10mM Tris-HCl pH=8, 5mM EDTA pH=8). Se continuó la disgregación de las muestras con un homogenizador de tejidos y finalmente se agregó SDS (0,5%) y Proteinasa K (200 µg/ml). Se incubó durante la noche a 37 °C.

Se realizaron dos extracciones de la fase acuosa con un volumen de fenol y otras 2 con un volumen de cloroformo-alcohol isoamílico 24:1 (Maniatis, 1989). Se precipitó el ADN de alto peso molecular con NaCl hasta una concentración final de 60mM y un volumen de isopropanol 100%. Alternativamente, se agregó acetato de

sodio (0,3M) y dos volúmenes de etanol absoluto (Davis, 1986). El precipitado se lavó con etanol 70%, se secó en vacío y se resuspendió en 200 - 1000 μ l de buffer TE (Tris-HCl 10mM, EDTA 1mM).

Se midió la concentración del ADN en espectrofotómetro de luz UV, a 260 y 280 nm, considerando 1 OD₂₆₀ = 50 μ g/ml. La medición a 280 nm se utilizó para estimar el grado de pureza, pues OD₂₆₀/OD₂₈₀ = 1,8 determina mínima contaminación con proteínas.

3- DIGESTION CON ENZIMAS DE RESTRICION:

Se digirieron 15 - 20 μ g de ADN con 50 - 80 unidades de enzima en un volumen de reacción de 80 μ l, respetando las condiciones salinas de cada enzima y la temperatura. La digestión se realizó durante 6 a 15 hrs.

4- ELECTROFORESIS Y TRANSFERENCIA (SOUTHERN BLOT):

El ADN genómico digerido se fraccionó mediante electroforesis en geles de agarosa 0,8% con bromuro de etidio (0,25 μ g/ml). El buffer que se utilizó fue 1xTAE (40 mM Tris-acetato, 1 mM EDTA) (Maniatis, 1989). Las corridas se realizaron en general, a un campo de 2-5 V/cm a temperatura ambiente. El buffer de siembra 6x contenía 30% glicerol en agua y 0,25% azul de bromofenol. Junto a las muestras se sembró un marcador de tamaño molecular (fragmentos HindIII del fago lambda). Los geles fueron fotografiados a través de un transiluminador de luz ultravioleta de 300 nm, utilizando una cámara Polaroid MP-4 con filtro rojo (RPC4) con película Polaroid 667.

Luego de la corrida electroforética, se realizó una transferencia salina (Maniatis, 1989; Davis 1986). Para ello, se procedió a incubar los geles en HCl 0,25 N, a temperatura ambiente durante 15 min; se enjuagó con agua desionizada y se desnaturalizó el ADN con NaOH 0,5 M, NaCl 1 M durante 30 min (2 incubaciones de 15 min cada una) a temperatura ambiente. Y finalmente se neutralizaron los geles en Tris-HCl 0,5 M, NaCl 1,5 M por 30 min (2 cambios de 15 min cada uno) a temperatura ambiente. Las transferencias se realizaron por capilaridad en 10xSSC (1,5 M cloruro de sodio, 0,15 M citrato de sodio) durante la noche, en forma análoga al procedimiento de Southern (1975), utilizando membranas de nylon Nytran (Schleicher & Schuell) para retener el ADN. Al día siguiente, se lavaron las membranas con 2xSSC durante unos min, se secaron al aire y se hornearon a 80 °C durante 2 hrs para fijar definitivamente el ADN.

La técnica de Southern blot fue utilizada para la identificación de secuencias homólogas a una sonda determinada.

5- HIBRIDIZACION CON SONDAS MOLECULARES RADIOACTIVAS:

Las sondas se marcaron radioactivamente con ^{32}P -dCTP por el método de "Random-Priming" (Feinberg, 1983). Se desnaturalizaron 25 - 50 ng de ADN en agua hirviendo durante 5 min y se incubó en hielo. Se utilizó el kit de Pharmacia, siguiendo las especificaciones del fabricante: se incubó la sonda desnaturalizada en una solución buffer conteniendo dATP, dGTP, dTTP y hexadeoxiribonucleótidos de secuencia al azar con 5 μl de $\alpha^{32}\text{P}$ -dCTP 10 $\mu\text{Ci}/\mu\text{l}$, 3000 Ci/mmol (New England Nuclear). Finalmente se agregaron 5 U de Klenow y se incubó durante 3 a 4 hrs a 37 °C.

La sonda marcada se separó de los nucleótidos no incorporados mediante centrifugación a 600 rpm a través de una columna de Sephadex G50 (Maniatis, 1989) preparada en una jeringa de 1 ml.

La membrana se prehibridizó a 42 °C durante 2 - 4 hrs en una bolsa sellada con una solución que contenía 50% formamida, 5x SSC, 5x Denhardt's (0,1% Ficoll, 0,1% seroalbúmina bovina, 0,1% polivinilpirrolidona), 9% Dextran sulfato, 0,5% SDS, 100 µg/ml de ADN de esperma de salmón sonificado y desnaturalizado (Maniatis, 1989; Davis, 1986). Luego se agregó a la bolsa la sonda desnaturalizada a 100 °C durante 5 min y se incubó durante 12 a 18 horas a 42 °C.

Para eliminar el exceso de sonda y obtener una hibridización específica, se realizaron 2 lavados sucesivos de 15 min con 2xSSC, 0,5% SDS a temperatura ambiente, 2 lavados de 15 min en 1xSSC, 0,5% SDS a 37 °C y luego 1 lavado de 30 min con 0,1xSSC, 1% SDS a 65 °C. Estos pasos fueron monitoreados con un detector Geiger para ir controlando la intensidad de cada lavado.

Se obtuvieron autorradiografías de las membranas utilizando placas autorradiográficas X-OMAT-AR5 (Kodak) y pantallas intensificadoras a -70 °C. El revelado se realizó en un procesador automático. El tiempo de exposición fue variable, entre 1 y 7 días.

Una misma membrana de nylon pudo ser rehibridizada hasta 5 veces. La deshibridización se realizó con 0,1% SDS hirviendo durante unos min.

6- SONDAS DE ADN UTILIZADAS:

Gen c-myc: Como se ilustra en la Figura 7, la sonda del tercer exón corresponde al fragmento ClaI-EcoRI de 1,4 Kb (Dalla-Favera, 1982a). Para el primer exón se utilizaron 2 sondas, el fragmento PvuII-PvuII de 0,7 Kb (Dalla-Favera, 1983, Science) y el segmento SmaI-PvuII de aproximadamente 0,5 Kb obtenido mediante digestión del anterior con SmaI. Para el análisis de la región regulatoria inmediatamente flanqueante al c-myc se prepararon otras sondas más

pequeñas, especificadas en la correspondiente sección de Resultados.

Gen de la cadena pesada de las inmunoglobulinas: Se utilizaron sondas (Figura 8) de la región J_H: fragmentos BamHI-HindIII de 6 Kb (Pellici, 1986) y BglII-BglII de 4 Kb, obtenido por digestión del fragmento anterior con BglII; de la región S_μ: SacII-SacII de 2 Kb y de las regiones constantes C_μ (EcoRI-EcoRI de 1,5 Kb), C_δ₁ (fragmento PstI de 2,1 Kb), C_γ (BamHI-HindIII de 6 Kb) y C_α₂ (fragmento SmaI de 2,8 Kb) (Neri, 1988; Shiramizu, 1991).

Virus de Epstein-Barr: Fue detectado con una sonda de la región repetida terminal (TR) (Raab Traub, 1986) correspondiente al fragmento BamHI-EcoRI de 5,5 Kb.

En todos los casos, los insertos fueron aislados de los plásmidos por digestión con la(s) enzima(s) de restricción correspondientes, separados por electroforesis en geles de agarosa y purificados utilizando el kit "Gene clean" (Bio 101). Las sondas así obtenidas fueron marcadas radioactivamente con α³²P-dCTP.

7- ANALISIS DE LAS MUTACIONES EN EL GEN p53: "SINGLE STRAND CONFORMATION POLYMORPHISM" (SSCP):

SSCP es una técnica muy sensible para detectar mutaciones puntuales en un fragmento de ADN amplificado por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (Orita, 1989a,b). Los cambios en la secuencia se detectan como una movilidad electroforética alterada, en un gel de poliacrilamida no desnaturizante.

Los oligonucleótidos requeridos para la reacción de PCR fueron preparados en un sintetizador de ADN ABI. Las secuencias se diseñaron a partir de la literatura (Buchman, 1988; Gaidano, 1991), de tal forma de incluir los exones 5 al 8 del gen p53.

Oligonucleótidos utilizados:

Exón 5: 5'TTCCTCTTCCTGCAGTACTC 3'
5'ACCCTGGGCAACCAGCCCTGT 3'

Exón 6: 5'ACAGGGCTGGTTGCCAGGGT 3'
5'AGTTGCAAACCAGACCTCAG 3'

Exón 7: 5'GTGTTGTCTCCTAGGTTGGC 3'
5'GTCAGAGGCAAGCAGAGGCT 3'

Exón 8: 5'TATCCTGAGTAGTGGTAATC 3'
5'AAGTGAATCTGAGGCATAAC 3'

Todos corresponden a secuencias intrónicas lindantes de los respectivos exones.

Análisis por SSCP:

Se utilizó la técnica de Orita (1989a,b) con pequeñas modificaciones. La PCR inicial se desarrolló a partir de 500 ng de ADN genómico, como templado, y 20 pmoles de cada oligonucleótido. La mezcla de reacción (20 μ l) contenía además 10 mM Tris-HCl (pH:8,3), 50 mM KCl, 1,5 mM MgCl₂, 0,01% gelatina y 5 μ M de cada dNTP. A cada tubo de reacción se le agregaron 2 μ Ci α -₃₂PdCTP previo al inicio de la amplificación con una unidad de Taq Polimerasa (Perkin Elmer Cetus).

Se realizaron 30 ciclos en un ciclador térmico Perkin Elmer Cetus, con los siguientes parámetros: 30 seg a 94 °C (desnaturalización), 30 seg a 58 °C (exones 5 y 8) ó 62 °C (exones 6 y 7) (apareamiento de los oligonucleótidos) y 1 min a 72 °C (extensión).

El producto de PCR se diluyó (1:25) en 0,1% SDS, 10mM EDTA; se tomó una alícuota y se le agregó un volumen igual de buffer de siembra (95% formamida, 20 mM EDTA, 0,05% azul de bromofenol, 0,05% xylene cyanol). Previo a la electroforesis, se desnaturalizó cada

muestra mediante incubación a 95 °C por 5 min. La corrida se realizó en un gel de poliacrilamida 6% (19:1 acrilamida:bis) en 1x TBE (0,089 M Tris-borato, 0,089 M ácido bórico, 0,002M EDTA) a una potencia constante de 7 W, a temperatura ambiente, durante la noche. En cada gel se sembró una muestra sin desnaturalizar para facilitar la identificación del producto de PCR (ADN doble cadena).

Una vez finalizada la electroforesis se colocó el gel en un secador de geles (Bio Rad). La visualización se realizó por autorradiografía, con un tiempo de exposición variable (2 a 15 hr).

8- DETERMINACION DE LAS MUTACIONES EN EL GEN p53: SECUENCIACION

Para determinar la ubicación y el tipo de mutación se secuenció directamente el producto de PCR de cada exón. Para ello, se amplificó el ADN en las mismas condiciones anteriores pero cada reacción se realizó en 300 μ l y se omitió el agregado de 32 PdCTP. El producto de PCR fue reconocido y fraccionado en geles de agarosa 4% (3% NuSieve y 1% SeaKem) en 1xTAE. Se cortó la banda y se purificó el ADN a través de una resina (Promega).

El método de secuenciación es una modificación del método de Sanger (Maniatis, 1989) y se utilizó el kit Sequenase version 2.0 (USB). Consiste de los siguientes pasos:

- Desnaturalización del templado (aprox. 500 ng) y el oligonucleótido (10-30 ng) por calentamiento a 98 °C por 3 min.
- Hibridización del primer a temperatura ambiente (2 min).
- Extensión y marcación, por incubación a temperatura ambiente durante 2 min luego del agregado de la mezcla de reacción conteniendo 3 unidades de Secuensas, 1 μ l α - 35 SdATP, DTT, pirofosfatasa en un buffer 40 mM Tris-HCl (pH:7,5), 20 mM MgCl₂ y 50 mM NaCl.
- Terminación de la reacción por el agregado de ddITP (para el tubo G), ddATP, ddTTP y ddCTP en cuatro tubos independientes e

incubación a 42 °C durante 5 min.

- Finalmente se paró la reacción con el buffer de siembra (95% formamida, 20 mM EDTA, 0,05% azul de bromofenol y 0,05% cilen cyanol).

Previo a la siembra del gel, se desnaturalizó por calentamiento a 98 °C por 3 min. La corrida se realizó en un gel desnaturalizante (7M urea) de poliacrilamida 6%, a una potencia constante de 50 watts durante 2 hrs aproximadamente. Luego de la corrida se secó el gel en desecador de vacío. Los resultados se revelaron por exposición de una placa radiográfica (Kodak X-OMAT-AR5) durante 1 ó 2 días.

Oligonucléotidos utilizados para secuenciar:

Exón 5: 5'TACTCCCCTGCCCTCA 3'

5'ATCGCTATCTGAGC 3'

Exón 6: 5'GTCTGGCCCCTCCTC 3'

5'CTCAGGCGGCTCAT 3'

Exón 7: 5'GTTGGCTCTGACTGT 3'

5'CTGGAGTCTTCCAGTGT 3'

5'CAAGTGGCTCCTGACCTGG 3'

Exón 8: 5'TGGTAATCTACTGGG 3'

5'CTTAGTGCTCCCTGGGGGC 3'

Las secuencias diseñadas corresponden a los respectivos segmentos exónicos. Cada exón fue secuenciado en ambas direcciones a fin de reconfirmar los resultados.

RESULTADOS

1- ESTRATEGIA PARA LA DETERMINACION DE LOS PUNTOS DE RUPTURA EN LA t(8;14):

El análisis por Southern blot se basa en la demostración de la existencia de reordenamientos de los genes c-myc y μ , utilizando una serie de enzimas de restricción en combinación con diversas sondas (Figs 7 y 8). También es necesario hibridizar secuencialmente las mismas membranas para detectar la comigración de fragmentos reordenados hibridizados con sondas del cromosoma 8 y del cromosoma 14, demostrando así su yuxtaposición.

PUNTOS DE RUPTURA EN EL CROMOSOMA 8:

El ADN se digiere primeramente con BamHI, EcoRI y HindIII, enzimas que generan, cada una, un fragmento que contiene al locus c-myc entero, incluyendo los tres exones y las regiones 5' y 3' flanqueantes (Fig 7). Hibridizando estas membranas con sondas del primer exón y/o del tercer exón, se pueden diferenciar los casos que presentan un alelo truncado (roto "dentro" del c-myc) de aquellos en los cuales el gen se mantiene aparentemente intacto (rotura 5' o 3' lejana). Aquellos linfomas que presentan un punto de ruptura en o cerca de c-myc son analizados con otras enzimas de restricción: PstI, PvuII y SmaI y sondas del primer exón para detectar en qué región del c-myc se halla la rotura. Así surgen las distintas localizaciones de los puntos de ruptura en el cromosoma 8, según cumplan las siguientes condiciones.

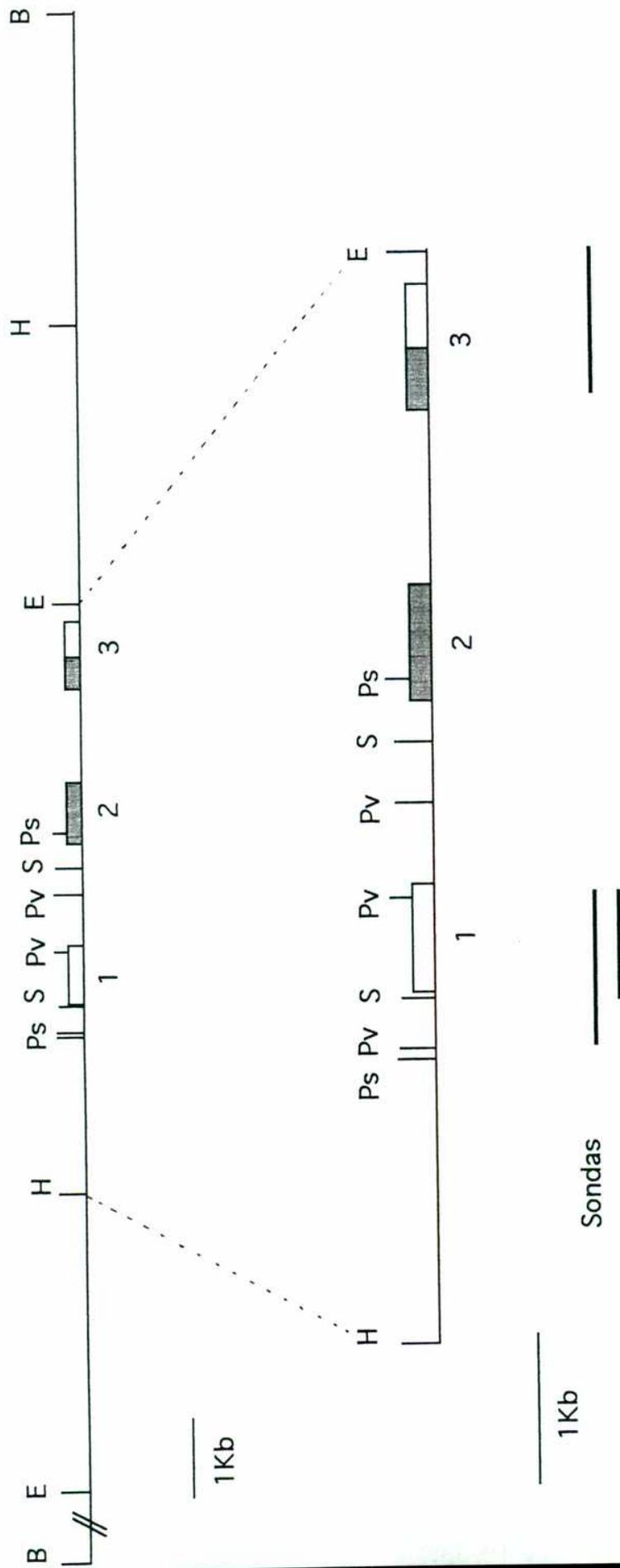


Figura 7: Mapa de restricción del gen c-myc humano. En la parte inferior se indican las sondas utilizadas. B: BamHI; E: EcoRI; H: HindIII; Ps: PstI; Pv: PvuII; S: SmaI.

*** Puntos de ruptura 5' lejanos al c-myc:** aquellos tumores con rotura 5' al sitio HindIII delante del c-myc, que se evidencian por la presencia de una única banda germinal con HindIII, EcoRI y BamHI detectadas con sondas del primer y tercer exón. Obviamente, las digestiones con PstI y SmaI también son germinales. La enzima PvuII permite detectar mutaciones en o cerca del sitio PvuII en el primer exón (muy frecuentes en linfomas endémicos con punto de ruptura 5' lejano). Esta mutación resulta en la producción de una banda reordenada de 1,7 Kb debida a la pérdida del sitio PvuII en el primer exón. Es importante señalar que aquellos tumores con rupturas 3' lejanas (debidas a las translocaciones variantes) también mostrarán este patrón y para distinguirlas se deben detectar reordenamientos en el gen de la cadena pesada de las Igs.

*** Puntos de ruptura inmediatamente flanqueantes al c-myc:** se presentan en aquellos linfomas con un alelo truncado debido a la presencia de una banda reordenada en digestiones con HindIII (y también con EcoRI y BamHI). La sonda del primer y tercer exón detectan el mismo reordenamiento (comigración), indicando la continuidad física entre ambos. Si con PstI y PvuII se obtiene únicamente una banda germinal con la sonda del primer exón, el punto de ruptura se halla en el fragmento HindIII-PstI, 5' al primer exón. Si se obtiene una banda reordenada con PstI, pero no con PvuII ni con SmaI, el punto de ruptura se encuentra en el pequeño segmento PstI-PvuII. De forma similar, si se observan bandas reordenadas con PstI y PvuII (de tamaño diferente a 1,7 Kb) y sólo una banda germinal con SmaI, el punto de ruptura se halla en el fragmento PvuII-SmaI, 5' inmediatamente flanqueante al c-myc.

*** Puntos de ruptura en el primer exón:** en este análisis se consideran a los puntos de ruptura en la región SmaI-PvuII, que abarca casi la totalidad del exón. Se determinan por la presencia de bandas reordenadas en la digestiones con EcoRI, HindIII, PstI, PvuII y SmaI, hibridizadas con una sonda del primer exón.

* Puntos de ruptura en el primer intrón: se considera el fragmento PvuII-PstI, que abarca todo el primer intrón y una pequeña porción del segundo exón. En este caso, en la digestión con HindIII (y también con EcoRI) se observan bandas reordenadas de distinto tamaño con las sondas del primer y tercer exón, o sea, la ausencia de comigración evidencia la separación física de los mismos ya que debido a la translocación dichos exones se encuentran en diferentes cromosomas. Esta observación se confirma con la presencia de una banda reordenada con PstI y SmaI pero no con PvuII cuando se hibridizan con una sonda del primer exón.

PUNTOS DE RUPTURA EN EL CROMOSOMA 14:

Se determinan por un análisis similar, utilizando varias enzimas de restricción: BamHI, EcoRI y HindIII, e hibridizando con diferentes sondas del gen de la cadena pesada de las Igs, señaladas en la Fig 8. Además se analiza el ligamiento (comigración) entre secuencias del gen c-myc y las distintas regiones del cromosoma 14: J_H , $S\mu$, $C\mu$ y eventualmente, $C\delta$, $C\alpha$ y $C\tau$ para detectar aquellas roturas que no se hallen en la región μ . Así, el punto de ruptura en la región $S\mu$ (fragmento HindIII-EcoRI que la contiene) se determina por la presencia de una banda reordenada en la digestión con HindIII e hibridización con la sonda $S\mu$ y/o $C\mu$; la comigración con la banda reordenada del c-myc (si ésta existiera) demuestra que ambas regiones se encuentran en el mismo fragmento HindIII que incluye la translocación. Esto debe confirmarse en digestiones con EcoRI, por la presencia de una banda extra con la sonda $S\mu$ que no comigra con J_H , o en digestiones con BamHI, por la falta de comigración entre J_H y $C\mu$ en un alelo, demostrando que estas regiones no son contiguas.

Las rupturas en J_H se determinan por la presencia de una banda reordenada extra con J_H que no comigra con $S\mu$ en EcoRI, asociado a comigración de J_H con c-myc en digestiones con EcoRI, HindIII y/o BamHI.

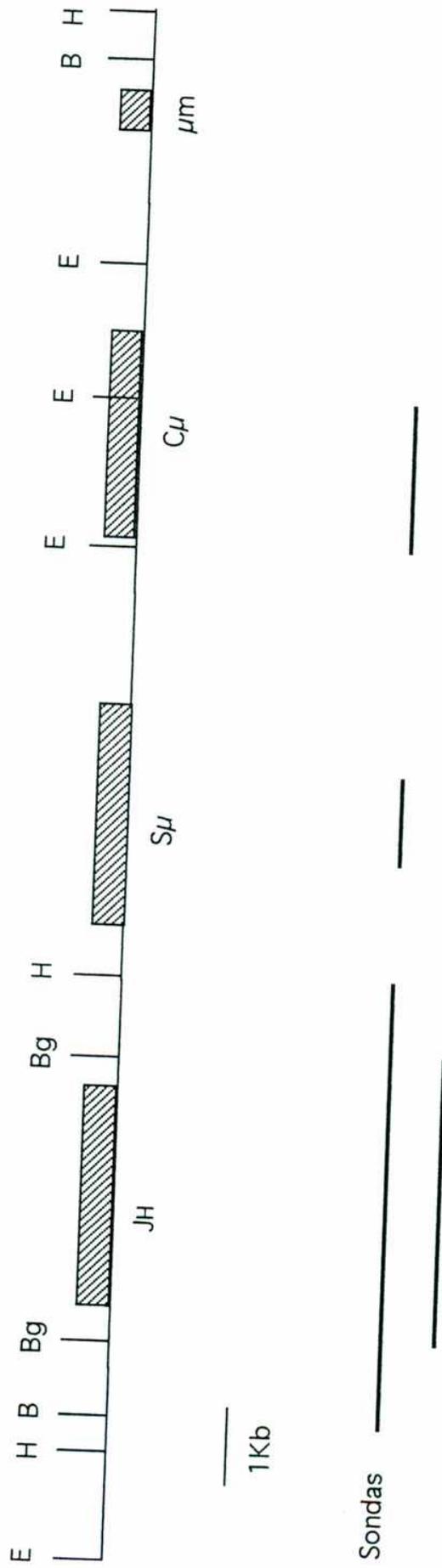


Figura 8: Mapa de restricción del gen de la cadena pesada de las inmunoglobulinas. Las sondas utilizadas se indican en la parte inferior. E: EcoRI, H: HindIII, B: BamHI, Bg: BglII

Los puntos de ruptura fuera de $S\mu$ y fuera de J_H , o sea, cuando se observa comigración entre J_H y $S\mu$ en digestiones con EcoRI o entre J_H y $C\mu$ en digestiones con BamHI, en conjunción con una sola banda germinal con $C\mu$ en la digestión con HindIII, pueden estar en diversas regiones del cromosoma 14: en V_H , D_H , o incluso hacia 3' en otras regiones switch ($S\alpha$ y $S\tau$). Para determinar la localización precisa es necesario utilizar sondas de dichas regiones y demostrar comigración con bandas reordenadas del c-myc.

2- ANALISIS MOLECULAR DE PACIENTES SUDAMERICANOS CON SNCL:

Se analizaron 39 pacientes: 27 de una región de Sudamérica de clima templado (17 de Argentina y 10 de Chile) y 12 de una región sudamericana de clima tropical (Brasil, San Pablo). El origen, edad y sexo de los pacientes, así como la localización tumoral y un resumen de la caracterización molecular de los linfomas se presentan en la Tabla 1. El rango de edades es de 1-28 años y todos los pacientes se presentaron con linfomas a células pequeñas no clivadas abdominales, excepto dos en los cuales el sitio primario fue maxilar.

Dado que Argentina y Chile son climáticamente similares, en este estudio se consideran a los pacientes de estos dos países combinados en un solo grupo.

A pesar de no disponer de información citogénética de los linfomas, en 32 de los 39 casos (82%) el análisis molecular mostró rearrreglos estructurales que han sido previamente asociados a la $t(8;14)$ y 20 de éstos presentan definitivamente una $t(8;14)$ a nivel molecular. Los 7 casos restantes mostraron un alelo c-myc inalterado y un punto de ruptura en el cromosoma 14 que no involucra la región J_H ni la región $S\mu$, por consiguiente, no se puede descartar la posibilidad de una translocación variante.

Tabla 1: Características clínicas y moleculares de los SNCL sudamericanos

CASO	ORIGEN ¹	EDAD/SEXO (años)	LOCALIZACION	EBV	CR 8 ²	CR 14 ³
FNR	Bra	6/m	abdomen	+	5'*	NSμ
CCH	Bra	4/m	abdomen, SNC	+	5'	NSμ
RPF	Bra	11/m	abdomen	+	5'	NSμ
FB	Bra	4/m	maxilar, abdomen	+	5'	NSμ
SRC	Bra	11/m	abdomen, MO	-	5'*	NSμ
DGG	Chi	7/m	abdomen	+	5'*	NSμ
CAB	Chi	5/m	abdomen	+	5'*	NSμ
AE	Chi	5/m	abdomen	-	5'	NSμ
GS	Chi	4/f	abdomen, MO, SNC	-	5'	NSμ
FL	Chi	11/m	abdomen, MO, SNC	-	5'	Sμ
CV	Arg	7/f	abdomen	+	5'*	NSμ, J _B
135	Arg	22/m	abdomen, MO	-	5'	NSμ
RJ	Arg	8/m	abdomen	-	5'	NSμ
VGO	Bra	5/m	abdomen	+	H3-Pst*	Sμ
MP	Bra	4/m	abdomen	+	H3-Pst	Sμ
In	Bra	5/m	abdomen, pleura	-	H3-Pst	NSμ
PM	Chi	7/m	abdomen	+	H3-Pst	NSμ
VA	Arg	4/m	abdomen	+	H3-Pst*	Sμ
SH	Chi	5/m	abdomen	+	Pst-Pvu	NSμ
HA	Chi	3/f	abdomen	-	Pst-Pvu	NSμ
HD	Arg	9/m	abdomen	-	Pst-Pvu	NSμ, J _B
ZJ	Arg	7/m	MO, maxilar	-	Pst-Pvu	Cμ
HQ	Chi	11/m	abdomen, MO	-	Pvu-Sma	NSμ
SG	Arg	3/m	abdomen, ganglios	+	Pvu-Sma	Sμ
MD	Arg	3/m	abdomen	+	Pvu-Sma	Sμ
OJI	Arg	7/m	abdomen	+	Pvu-Sma	Sμ
AF	Arg	6/f	intestino	+	Pvu-Sma	NSμ, Sα
AS	Arg	28/m	estómago, MO	-	Pvu-Sma	NSμ, J _B
JR	Arg	1/m	abdomen	-	Pvu-Sma	NSμ
SCL	Bra	6/f	abdomen	+	Sma-Pvu	Sμ
ME	Bra	5/m	abdomen, MO	-	Sma-Pvu	NSμ
TJ	Arg	13/m	abdomen, MO	+	Sma-Pvu	ND
RJR	Arg	3/m	abdomen, ganglios	-	Sma-Pvu	Sμ
BD	Arg	12/m	abdomen	-	Sma-Pvu	Sμ
AG	Arg	13/f	abdomen	-	Sma-Pvu	NSμ
BE	Bra	9/m	abdomen	-	Pvu-Pst	NSμ, J _B
ND	Bra	5/m	abdomen	-	Pvu-Pst	NSμ, J _B
ROC	Chi	3/f	abdomen	+	Pvu-Pst	Sμ
AA	Arg	8/m	abdomen, ganglios	+	Pvu-Pst	NSμ, Cδ

1: Bra indica un tumor de Brasil, Chi un tumor de Chile y Arg un tumor de Argentina.

2: Localización del punto de ruptura en el cromosoma 8, indicados como fragmentos de restricción. El * indica la presencia de la mutación en el sitio PvuII en el primer exón.

3: Localización de los puntos de ruptura en el cromosoma 14: Sμ (fragmento HindIII-EcoRI que contiene la región Sμ) o NSμ (fuera de esta región), determinándose en los casos posibles: J_B, Cμ, Sα y Cδ. ND: no determinado.

MO: médula ósea. SNC: sistema nervioso central

3- PUNTOS DE RUPTURA EN EL CROMOSOMA 8:

En la Fig 9 se muestran los resultados obtenidos por la técnica de Southern blot de 13 biopsias representativas del grupo estudiado. Se realizaron múltiples hibridizaciones de las membranas correspondientes a las diferentes enzimas de restricción con las sondas del primer exón (PvuII-PvuII y SmaI-PvuII) y del tercer exón (ClaI-EcoRI) (ilustradas en la Fig 7). En cada tumor el patrón completo de bandas reordenadas y/o germinales permitió determinar la localización precisa del punto de ruptura, en una pequeña región del c-myc, para cada caso particular (Tabla 1).

Se observó que la distribución de las rupturas cromosómicas difiere según el origen geográfico del SNCL (Tabla 2).

Tabla 2: Distribución de los puntos de ruptura del cromosoma 8

	>< H	H-Ps	Ps-S	S-Pv	Pv-Ps
Argentina y Chile: 27	8 (30)	2 (7)	11 (41)	4 (15)	2 (7)
Brasil: 12	5 (41)	3 (25)	0	2 (17)	2 (17)
Total: 39	13 (33)	5 (13)	11 (29)	6 (15)	4 (10)

Entre paréntesis se muestran los porcentajes. Las regiones del c-myc son: fuera del fragmento HindIII (>< H); HindIII-PstI (Ps); PstI-SmaI (S); SmaI-PvuII (Pv); PvuII-PstI.

El 41% (11/27) de los tumores de la región templada presenta rupturas en la región 5' inmediatamente adyacente al c-myc, en el fragmento PstI-SmaI. En contraste, ningún tumor de la región tropical muestra un punto de ruptura en esta región y el 67% (8/12) tiene rupturas más hacia 5'.

Figura 9: Análisis del punto de ruptura en el cromosoma 8. Se muestran las autoradiografías de 13 pacientes representativos (Tabla 1) y sangre periférica de un individuo normal (PBL) utilizado como control. Las calles contienen ADN de los siguientes casos (de izquierda a derecha): BE, CCH, SCL, RPF, PBL, VGO, MP, IN, BD, FB, TD, RJ, ND y ME. Los ADN genómicos fueron digeridos con las enzimas de restricción indicadas e hibridizados con sondas del 1er y 3er exón del c-myc. La digestión con EcoRI de los casos BE, CCH, SCL, RPF, VGO, MP, IN y BD fue hibridizada con la sonda 1 myc, mientras que los casos FB, TD, RJ, ND y ME fueron hibridizados con la sonda 3 myc. En el caso de HindIII, la misma membrana fue deshibridizada y rehibridizada. A la derecha se señalan las bandas germinales y su peso molecular en Kb.



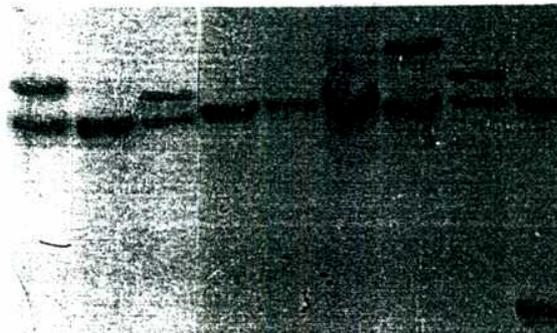
EcoRI / 1 myc



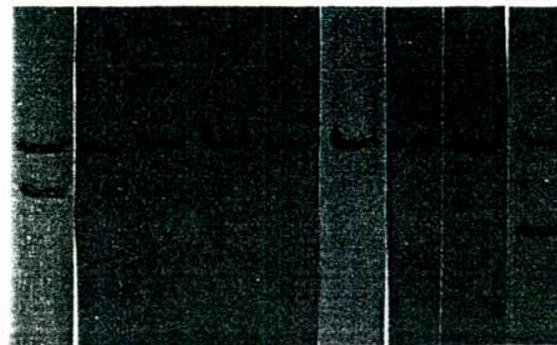
EcoRI / 3 myc



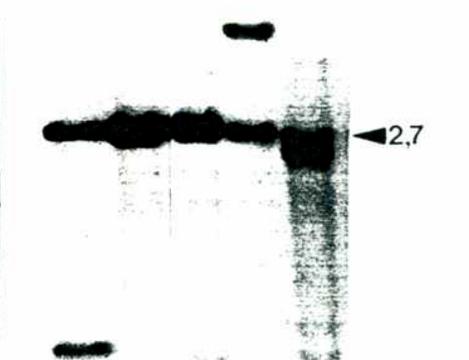
HindIII / 3 myc



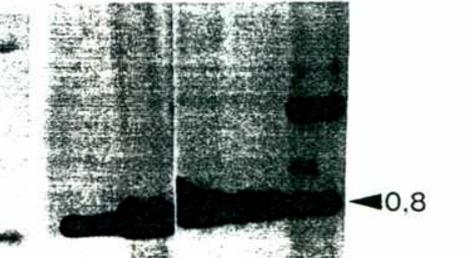
HindIII / 1 myc



PstI / 1 myc



PvuII / 1 myc



SmaI / 1 myc (SmaI-PvuII)



De los 39 linfomas analizados, 13 presentaron puntos de ruptura "fuera" del c-myc (fuera del fragmento HindIII) y 26 presentaron puntos de ruptura "dentro" o cerca del c-myc (en el fragmento HindIII). De los 13 casos en el primer grupo, todos menos uno también presentaron reordenamientos fuera del segmento EcoRI. El único caso que presentó un punto de ruptura en la región 5' lejana, en el fragmento EcoRI-HindIII fue RPF, de Brasil.

Dado que los tumores con puntos de ruptura 5' lejana (típica de los eLB) frecuentemente presentan mutaciones dentro del c-myc, generalmente observadas como la pérdida del sitio PvuII en el extremo 3' del primer exón, se examinó dicho cambio en los linfomas sudamericanos. Curiosamente, sólo 5 de los 13 casos (38%) mostraron mutaciones en el sitio PvuII (Tabla 1). Dos casos adicionales (VA y VGO) presentaron esta mutación asociada a un punto de ruptura en la región HindIII-PstI.

De los 26 casos reordenados en el fragmento HindIII, 16 (62%) tenían puntos de ruptura en la región 5' flanqueante al c-myc (HindIII-SmaI). Por lo tanto, estos linfomas retienen la capacidad de transcribir el mRNA del c-myc desde los promotores P1 o P2.

4- PUNTOS DE RUPTURA EN EL CROMOSOMA 14:

La determinación del punto de ruptura del cromosoma 14 se realizó en 38 de los 39 casos estudiados (Tabla 1). Los reordenamientos fuera de la región $S\mu$ resultaron más frecuentes (27/38, 71%) que las rupturas en $S\mu$ (fragmento HindIII-EcoRI que la contiene) (11/38, 29%). La proporción de linfomas con puntos de ruptura en $S\mu$ es de 31% (8/26) y 25% (3/12) para las regiones templada y tropical, respectivamente.

5- COMBINACION DE LOS PUNTOS DE RUPTURA EN LOS CROMOSOMAS 8 Y 14:

La Fig 10 muestra tres ejemplos del análisis combinado por Southern blot. Las distintas combinaciones de los puntos de ruptura de los cromosomas 8 y 14 pueden clasificarse en cuatro grupos principales, considerando al c-myc reordenado con HindIII (R) o no (NR) y al gen de la cadena pesada de las Igs roto a nivel de la región S μ (S) o fuera de ella (NS). De esta forma, tres de las combinaciones: R/S, R/NS y NR/NS se observaron con una frecuencia semejante cuando se consideran todos los linfomas sudamericanos (Tabla 3). Se observó un sólo caso (FL) con una translocación que yuxtapone a un alelo c-myc no reordenado con la región S μ . En la región templada la combinación prioritaria es R/NS (como en los sLB), mientras que en la región tropical es NR/NS (como en los eLB).

Tabla 3: Combinaciones posibles de los puntos de ruptura en los cromosomas 8 y 14

	R/S	R/NS	NR/S	NR/NS
Argentina y Chile: 26	7 (27)	11 (42)	1 (4)	7 (27)
Brasil: 12	3 (25)	4 (33)	0	5 (42)
Total: 38	10 (26)	15 (39)	1 (3)	12 (32)

Entre paréntesis se muestran los porcentajes.

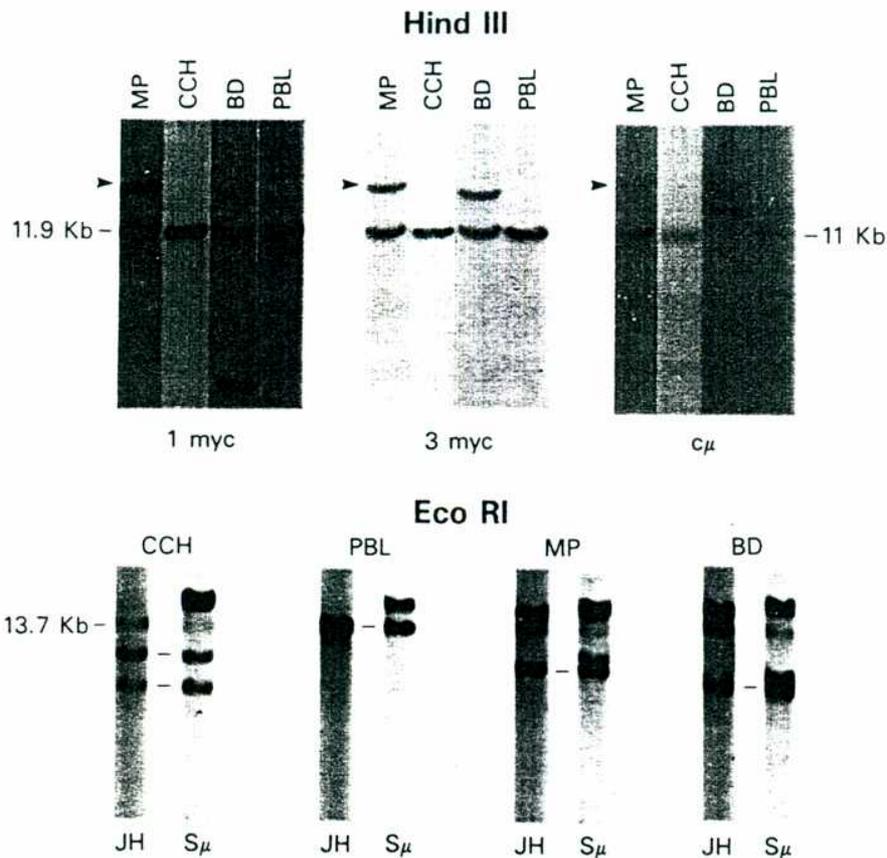


Figura 10: El panel superior muestra tres ejemplos de comigración entre el 1er y el 3er exón del c-myc y la región $C\mu$, en digestiones con HindIII. El panel inferior muestra la comigración $J_H/S\mu$ (guión) en digestiones con EcoRI. El ADN de sangre periférica de un individuo normal (PBL) se utilizó como marcador de la banda germinal. Se indican las bandas germinales en cada caso con su peso molecular. Se preparó una sola membrana con cada enzima que fue deshibridizada y rehibridizada con las sondas indicadas. MP presenta rupturas cromosómicas en la región 5' inmediatamente flanqueante del c-myc y en $S\mu$, determinadas por la comigración 1 myc/3 myc/ $C\mu$ con HindIII (flechas) y la presencia de una banda reordenada $S\mu$ extra con EcoRI. CCH muestra puntos de ruptura 5' lejano al c-myc y no- $S\mu$. BD presenta rupturas en el 1er exón y en $S\mu$ y por lo tanto sólo la banda reordenada del 3er exón comigra con la banda reordenada de $C\mu$ con HindIII y existe una banda $S\mu$ extra con EcoRI.

6- ANALISIS DE LA REGION REGULATORIA 5' INMEDIATAMENTE FLANQUEANTE DEL c-myc: CLUSTER DE PUNTOS DE RUPTURA:

Considerando la alta frecuencia de rupturas en el cromosoma 8 en la región 5' flanqueante del c-myc en linfomas de la región templada de Sudamérica y el hecho de que en ella se encuentran los principales elementos reguladores (positivos y negativos) de la transcripción, se realizó una "microdissección" de la misma en tumores que presentan un punto de ruptura en esta región. Como el objetivo era su análisis estructural detallado, se incluyeron también linfomas africanos y norteamericanos con punto de ruptura semejante.

Se estudiaron 18 linfomas: 8 de Argentina, 8 de EEUU y 2 de Africa equatorial, todos con puntos de ruptura dentro del c-myc, específicamente en el fragmento PstI-SmaI o en el extremo 5' del primer exón (o sea, aquellos casos con rupturas en el primer exón - SmaI-PvuII - en los cuales se observó comigración con el tercer exón en digestiones con HindIII y/o EcoRI).

El fragmento PstI-PvuII de 900 pb fue subdividido utilizando HinfI, RsaI y XhoI (Fig 11). Cada subfragmento fue identificado con sondas específicas: RsaI-SmaI y HinfI-HinfI. Se realizaron una serie de Southern blots, digiriendo el ADN genómico de cada tumor con RsaI, HinfI, SmaI y XhoI; algunos ejemplos se muestran en la Fig 11. El análisis completo permitió determinar el punto de ruptura más detallado dentro del fragmento de 900 pb analizado. Nueve de los 18 linfomas (50%) mostraron una ruptura en el subfragmento RsaI-HinfI de 130 pb, 5' al promotor 1 (Fig 12). Este cluster identificado coincide con la localización de un elemento de regulación positiva para P1 (-300 pb a -150 pb).

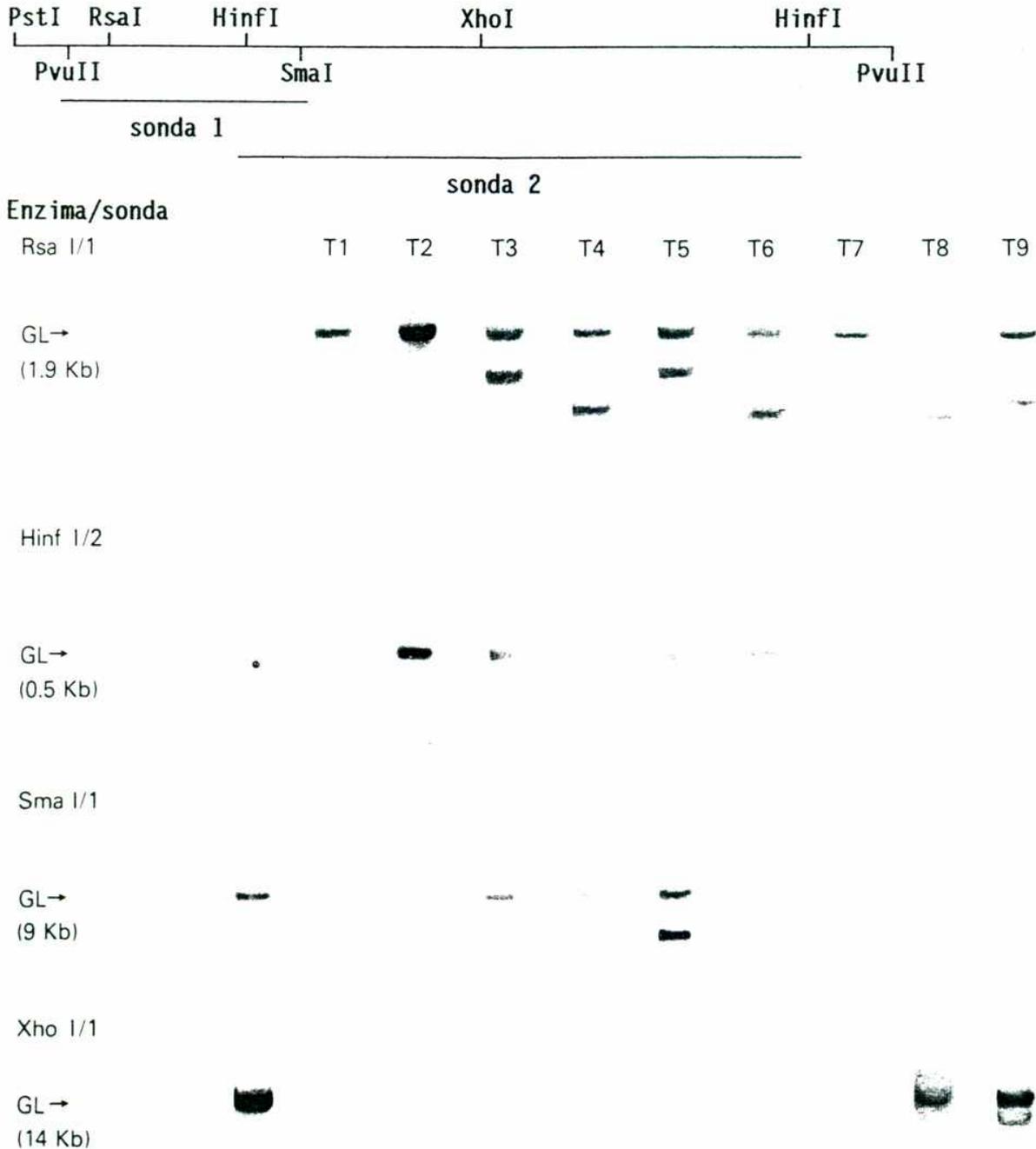


Figura 11: En la parte superior se esquematiza el mapa de restricción del fragmento PstI-PvuII de 900 pb, en la región 5' del c-myc, y las sondas utilizadas para su análisis. En la parte inferior se muestran autoradiografías de 9 SNCL (T1-T9) con punto de ruptura en dicho fragmento y una sangre periférica normal como control (primera línea a la izquierda). Las enzimas de restricción con las cuales se digirieron los ADN genómicos, las sondas y las bandas germinales (GL) con su peso molecular se señalan a la izquierda. En la digestión con SmaI se muestran sólo el control normal, T3, T4 y T5; en la digestión con XhoI se muestran sólo el control normal, T8 y T9.

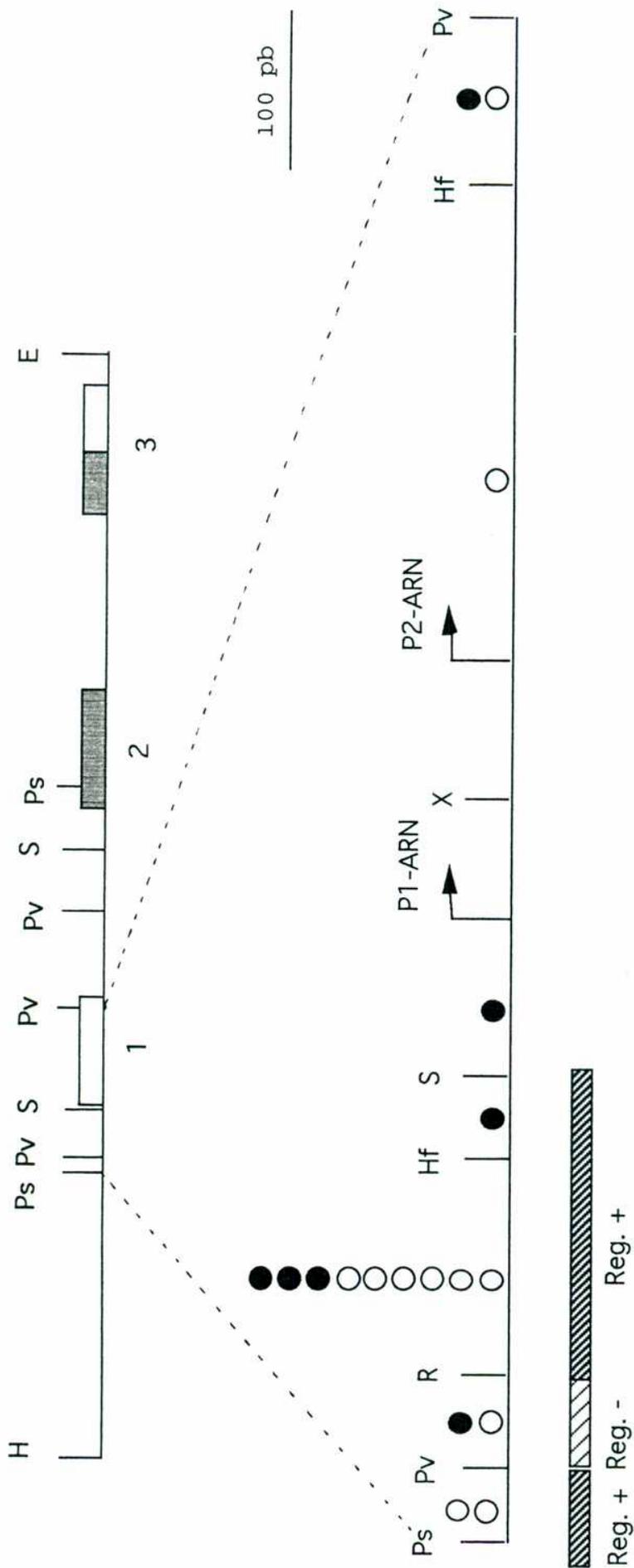


Figura 12: Localización de los puntos de ruptura en la región 5' inmediatamente flanqueante del c-myc. Los círculos blancos representan linfomas EBV - y los círculos negros linfomas EBV +. Las regiones regulatorias positivas (Reg. +) y negativas (Reg. -) están esquemáticamente ilustradas, así como los inicios de la transcripción a partir de los Promotores P1 y P2. H: HindIII, Ps: PstI, Pv: PvuII, S: SmaI, E: EcoRI, R: RsaI, Hf: HinfI, X: XhoI.

7- ASOCIACION CON EL VIRUS DE EPSTEIN-BARR:

La frecuencia de linfomas sudamericanos EBV positivos es del 51%. Considerando el origen geográfico del tumor, los casos de la región tropical presentaron un 58% de asociación con el virus mientras que en los provenientes de la región templada se observó un 48%. Estos valores no difieren significativamente. Los genomas virales presentes en las células tumorales son monoclonales, detectándolos con una sonda viral de las repeticiones terminales en tandem (TR) (Fig 13). Esto demuestra que el virus está asociado con el tumor y no con las células normales presentes en las muestras. Además, es un indicador de que la infección viral ocurrió antes de la expansión clonal del tumor.

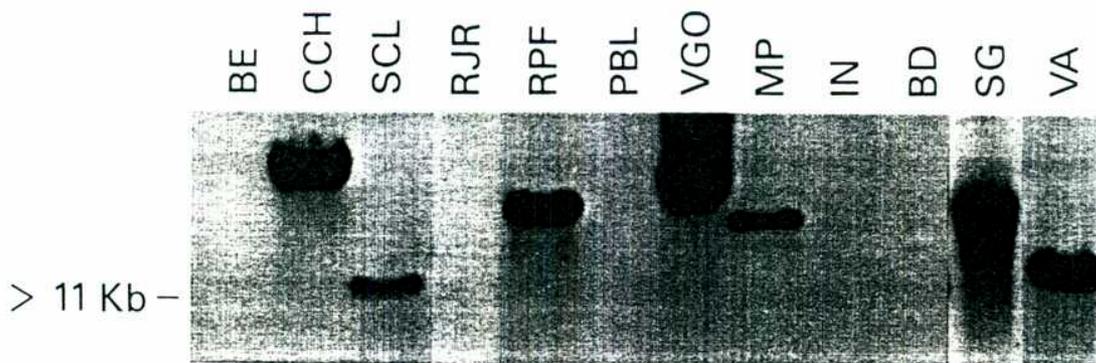


Figura 13: Autorradiografía de una membrana representativa que muestra la monoclonalidad del EBV en SNCL sudamericanos. Los ADN genómicos fueron digeridos con BamHI e hibridizados con la sonda viral de la región terminal. El ADN de sangre periférica de un individuo normal (PBL) se utilizó como control negativo.

Dada la correlación previamente descrita entre la presencia (o ausencia) del EBV en linfomas con determinados puntos de ruptura del cromosoma 8, se comparó la asociación del EBV con los distintos puntos de ruptura de los cromosomas 8 y 14 en los linfomas sudamericanos. Sorprendentemente, no se observó una correlación evidente entre la presencia del EBV y las distintas localizaciones del punto de ruptura en el cromosoma 8. La Fig 14 muestra que existe una distribución equitativa entre los linfomas EBV+ y aquellos EBV- en cada región del c-myc. La Tabla 4 muestra los resultados para el cromosoma 14.

Tabla 4: Asociación del EBV con el punto de ruptura en el cromosoma 14.

	Switch- μ	no Switch- μ	Total
EBV+	8	11	19
EBV-	3	16	19
Total	11	27	38

Analizando estos resultados surgen dos observaciones importantes: 1) La mayoría (73%) de los linfomas con una ruptura en $S\mu$ están asociados con el EBV. 2) Los tumores EBV- portan primordialmente (84%) rupturas fuera de la región $S\mu$.

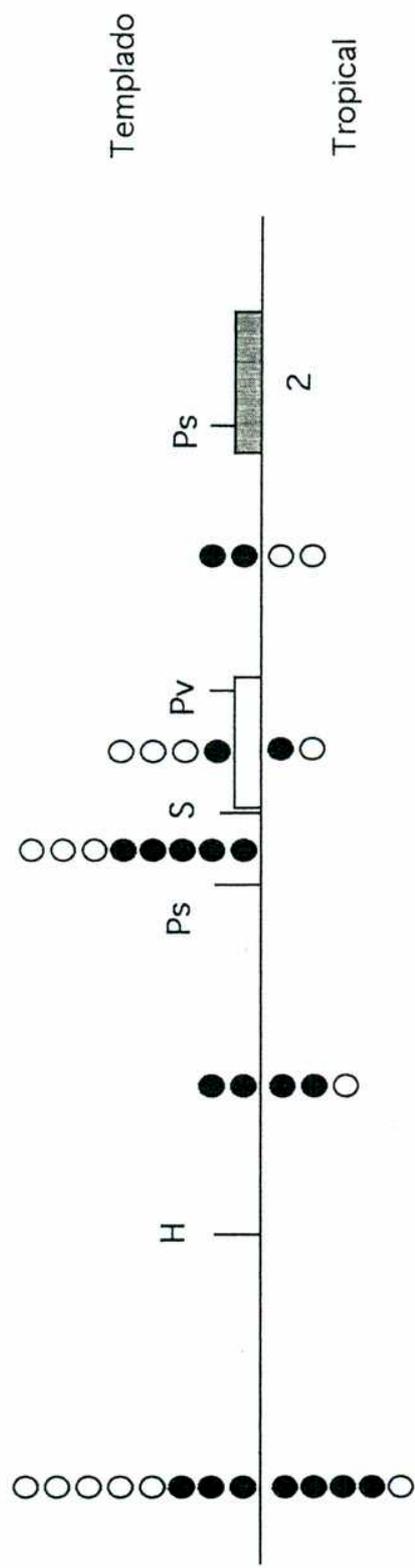


Figura 14: Distribución de los puntos de ruptura en el cromosoma 8 de los linfomas de Burkitt sudamericanos, de acuerdo a su asociación con el virus de Epstein Barr. En la parte superior del mapa se ubican los casos argentinos y chilenos y en la parte inferior, los casos brasileños. Los círculos negros representan tumores EBV + y los círculos vacíos tumores EBV-. Las regiones en el cromosoma 8 son: fuera del fragmento HindIII (H) (generalmente 5"), HindIII-PstI (Ps), PstI-SmaI (S), SmaI-PvuII (Pv), PvuII-PstI.

8- EXISTENCIA DE INFECCION LITICA DEL EBV EN BIOPSIAS DE SNCL:

Siempre se ha postulado que el EBV permanece en forma latente en los linfocitos B y en las neoplasias a células B, como el LB. El ciclo lítico estaba restringido a células epiteliales y a algunos procesos malignos como la leucoplaquia oral vellosa y el carcinoma nasofaríngeo. Sorprendentemente, estudiando las repeticiones terminales en tandem (TR) por Southern blot se detectaron formas replicativas del ADN viral en biopsias de SNCL.

La heterogeneidad de los TRs se identifica por el tamaño de los fragmentos obtenidos luego de una digestión del ADN genómico con BamHI que corta a ambos lados de los mismos (Fig 15). El fragmento BamHI producido por la forma episomal (circular) contiene, además, 7,5Kb de secuencias únicas de ADN. Por lo tanto, el fragmento BamHI más pequeño posible (con un TR = 0,5 Kb) es de 8Kb, y de acuerdo al número de unidades TR incorporadas en la circularización, los fragmentos varían de tamaño con incrementos de 500pb. Los eventos infecciosos independientes pueden visualizarse como bandas de más de 8Kb, cada una correspondiendo a un fragmento fusionado.

Como se mencionó anteriormente, todas las biopsias EBV+ presentaron una única banda (>8Kb), indicando la monoclonalidad del EBV en el LB. Sin embargo, en 2 de los 20 linfomas EBV+ se observó una serie de bandas. Esto se confirmó mediante una doble digestión con BamHI y BglIII, mostrada en la Fig 15. Las bandas más pequeñas son de aproximadamente 4Kb y se incrementan en tamaño por múltiplos de 500pb. Este patrón se observó también en la línea celular P3HRI, que se sabe que produce partículas virales. Por lo tanto, la presencia de múltiples fragmentos, varios de tamaño incompatible con la forma episomal, demuestra la presencia de genomas virales lineares, o sea, ciclo lítico.

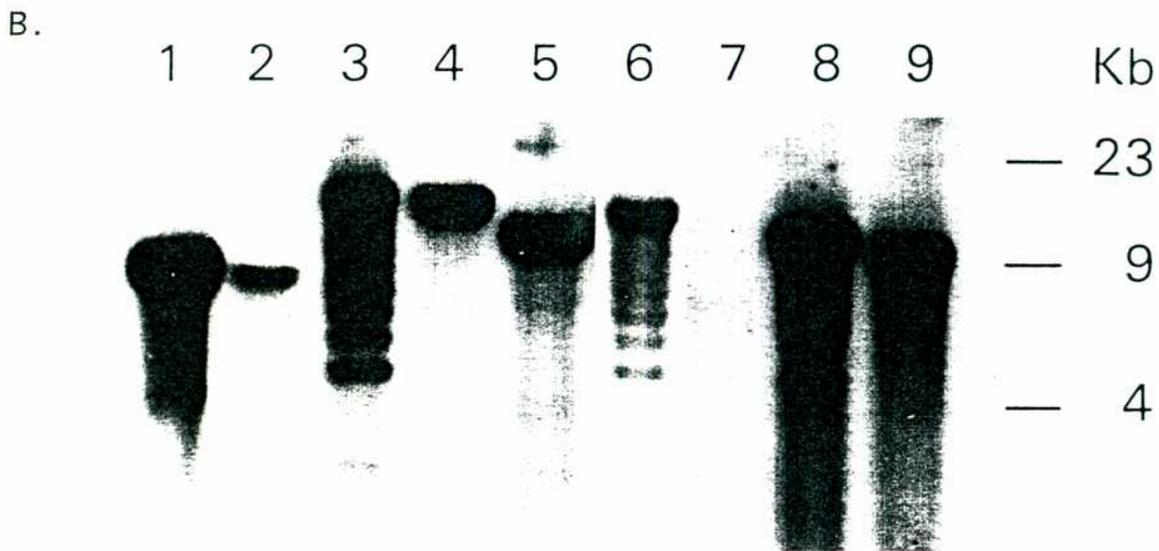
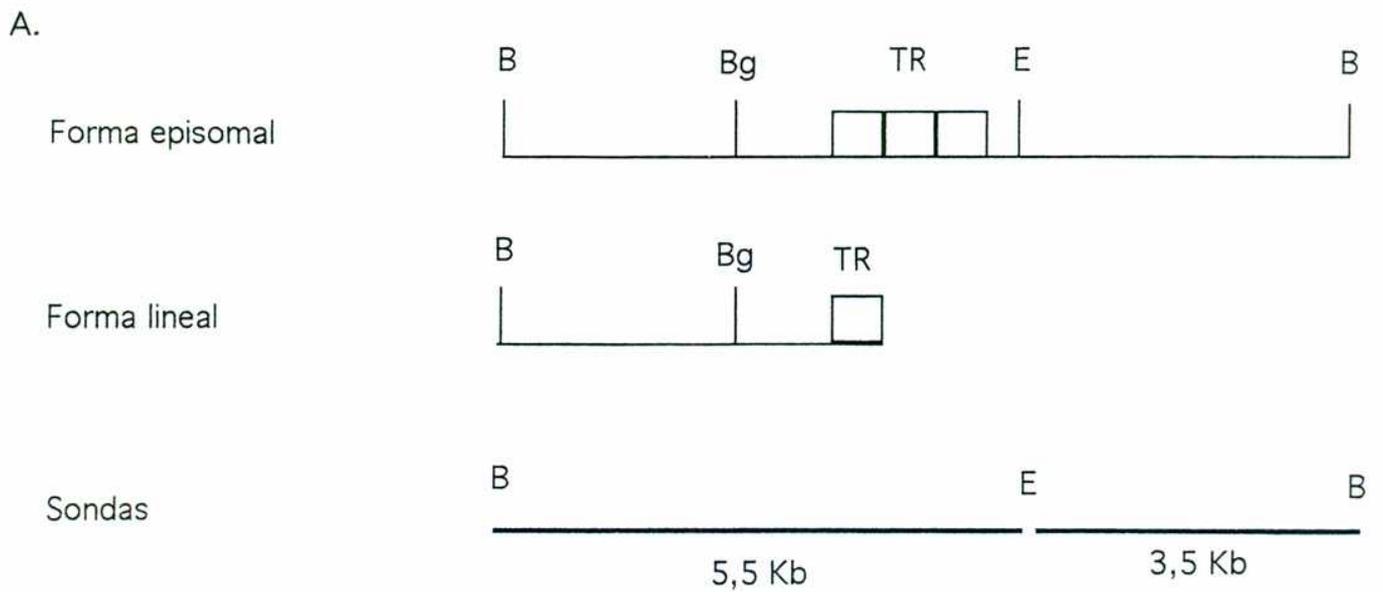


Figura 15: A: Mapa de restricción de la región terminal (TR) del EBV. Se ilustran gráficamente los posibles fragmentos identificables luego de una digestión del ADN viral con BamHI, dependiendo de la estructura (circular o lineal). B: BamHI, Bg: BglII, E: EcoRI

B: Southern blot de biopsias de BL. El ADN fue digerido con BamHI y BglII e hibridizado con la sonda EcoRI-BamHI de 3,5 Kb. Línea 9: ADN de la línea celular P3HRI que se utilizó como control positivo de EBV replicativo. Línea 7: ADN de linfocitos de sangre periférica (control negativo). Líneas 2 y 4: ADN de dos LB EBV+ que muestran sólo la forma episomal. Líneas 1, 3, 5, 6 y 8: ADN de 5 LB que muestran EBV replicativo.

Dado lo novedoso de esta observación, se analizaron biopsias de linfomas asociados a EBV de otras regiones geográficas (Fig 15):

	biopsias analizadas	biopsias con EBV replicativo
LB esporádicos		
Sudamérica	20	2
Norteamérica	9	2
LB endémicos	24	3
LB en pacientes HIV+	2	1
Total	55	8

Por lo tanto, en 14,5% de los LB el EBV cumple un ciclo lítico, probablemente en un porcentaje bajo de sus células.

Como en la línea P3HRI se demostró que la capacidad de producir viriones estaba asociada a un EBV defectivo, por recombinación y delección entre las regiones W y Z del genoma viral, se analizó si ésta era la causa de la existencia de formas replicativas en las biopsias de LB. Por PCR de la región WZ no se observó reordenamiento en ninguno de los casos. Así, virus defectivos no justifican la replicación en estos casos, aunque no se puede descartar que halla otros reordenamientos, diferentes al de P3HRI y por consiguiente no detectados con este ensayo.

9- ANALISIS DEL GEN p53:

Las mutaciones y/o delecciones en el gen supresor p53 representan la alteración genética más frecuente en el cancer. En un reciente estudio de neoplasias hematológicas, se sugiere que éstas serían importantes en la patogénesis del LB. Por lo tanto, se realizó un laborioso análisis del p53 en 27 LB sudamericanos por SSCP ("Single Strand Conformation Polymorphism"), que permite detectar mutaciones puntuales en un fragmento de ADN. La presencia

de cambios genéticos fue confirmada por secuenciación, lo cual permite al mismo tiempo determinar la ubicación precisa de la mutación.

Dado que el 98% de las mutaciones previamente descriptas en los distintos tipos de cancer se encuentran en los exones 5 - 8 del gen, el análisis se limitó a esta región del p53.

La técnica de SSCP reveló una movilidad electroforética alterada en 19 tumores: 7 en el exón 5, 4 en el exón 6, 5 en el exón 7 y 3 en el exón 8 (Fig 16). Al analizar la secuencia de dichas bandas polimórficas, se confirmaron los resultados del SSCP en sólo 13 casos, demostrando la presencia de mutaciones debidas a cambios de una sola base en las regiones codificantes de los respectivos exones (Tabla 5 y Fig 17). Los 6 casos restantes mostraron una banda aberrante idéntica para el exón 5 (Fig 16), cuya secuencia demostró también ser la misma en todos los casos, pero no corresponde al p53. Esta observación insólita hizo que se repitieran las reacciones de secuenciación con otros oligonucleótidos del exón 5 y no se observaron mutaciones.

Tabla 5: Mutaciones en el gen p53 en LB sudamericanos

Caso	Origen	Exón	Codón mutado	Aminoácido
VGO	Brasil	5	141 TGC--TAC	cys--tyr
VA	Argentina	6	213 CGA--CGG	silenciosa
SG	Argentina	6	213 CGA--CGG	silenciosa
BD	Argentina	6	213 CGA--TGA	arg--term. ¹
JR	Argentina	6	220 TAT--CAT	tyr--his
BD	Argentina	7	236 ATG--A G	corrimiento ²
CV	Argentina	7	245 GGC--GAC	gly--asp
SRC	Brasil	7	245 GGC--AGC	gly--ser
OJI	Argentina	7	248 CGG--CTG	arg--leu
In	Brasil	7	248 CGG--CAG	arg--gln
BE	Brasil	8	272 GTG--GAG	val--glu
PM	Chile	8	278 CCT--CAT	pro--his
AG	Argentina	8	282 CGG--TCGG	corrimiento ²

1: codón de terminación 2: corrimiento del marco de lectura

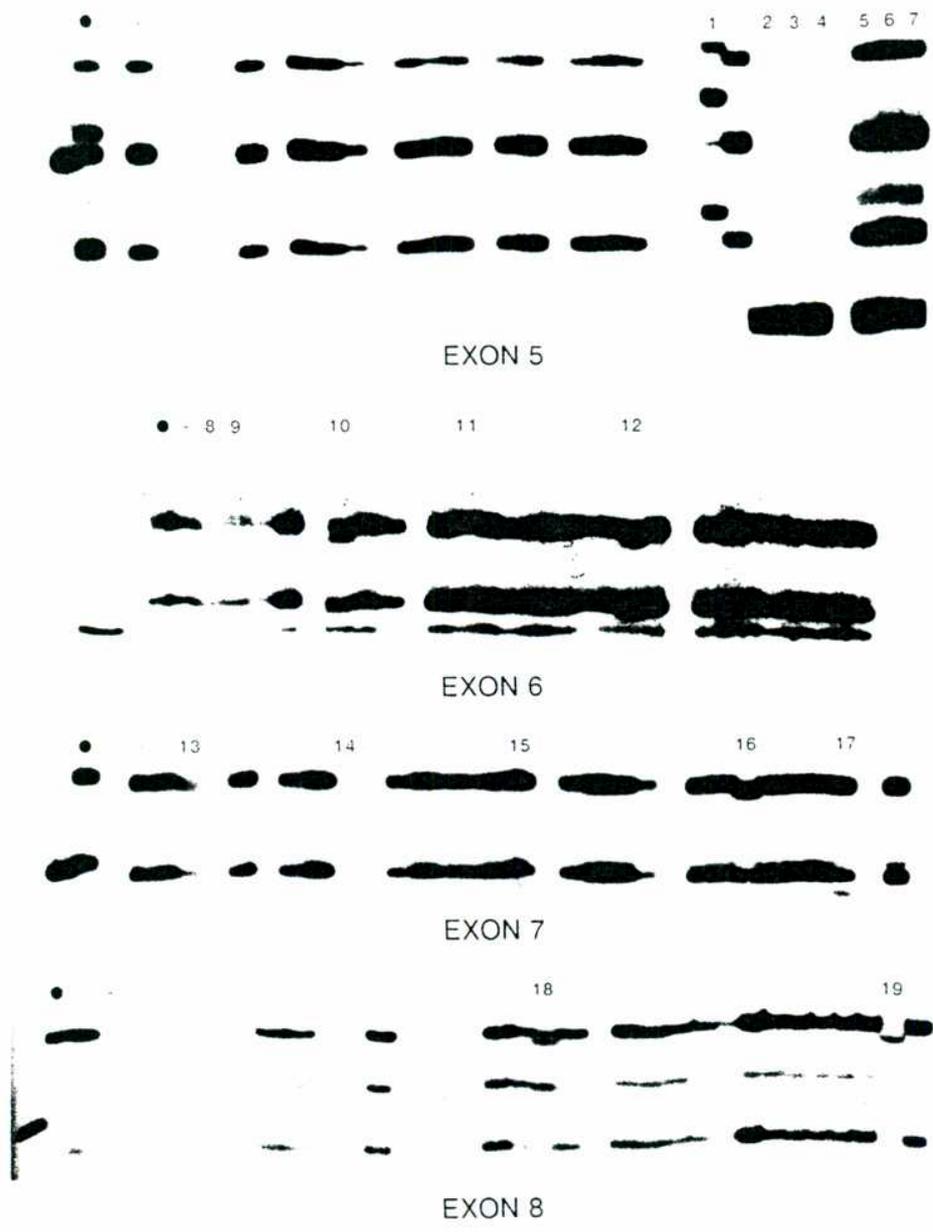


Figura 16: Análisis de las mutaciones del gen p53 en SNCL sudamericanos mediante la técnica de SSCP. El producto de PCR de ADN genómico de los exones 5, 6, 7 y 8 del p53 fue fraccionado por electroforesis en geles de poliacrilamida 6%. Los fragmentos no desnaturalizados (doble cadena) de cada exón se muestran a la izquierda (1ra línea). Los círculos negros señalan los controles positivos (líneas celulares de LB con mutaciones en el p53), específicos para cada exón. + señala el control negativo (línea linfoblastoidea con p53 normal). Los linfomas con un patrón de migración aberrante están numerados. Las muestras 2-7 muestran una banda de migración anormal (más rápida) de tamaño idéntico. La secuenciación de las mismas mostró que no corresponden al gen p53.

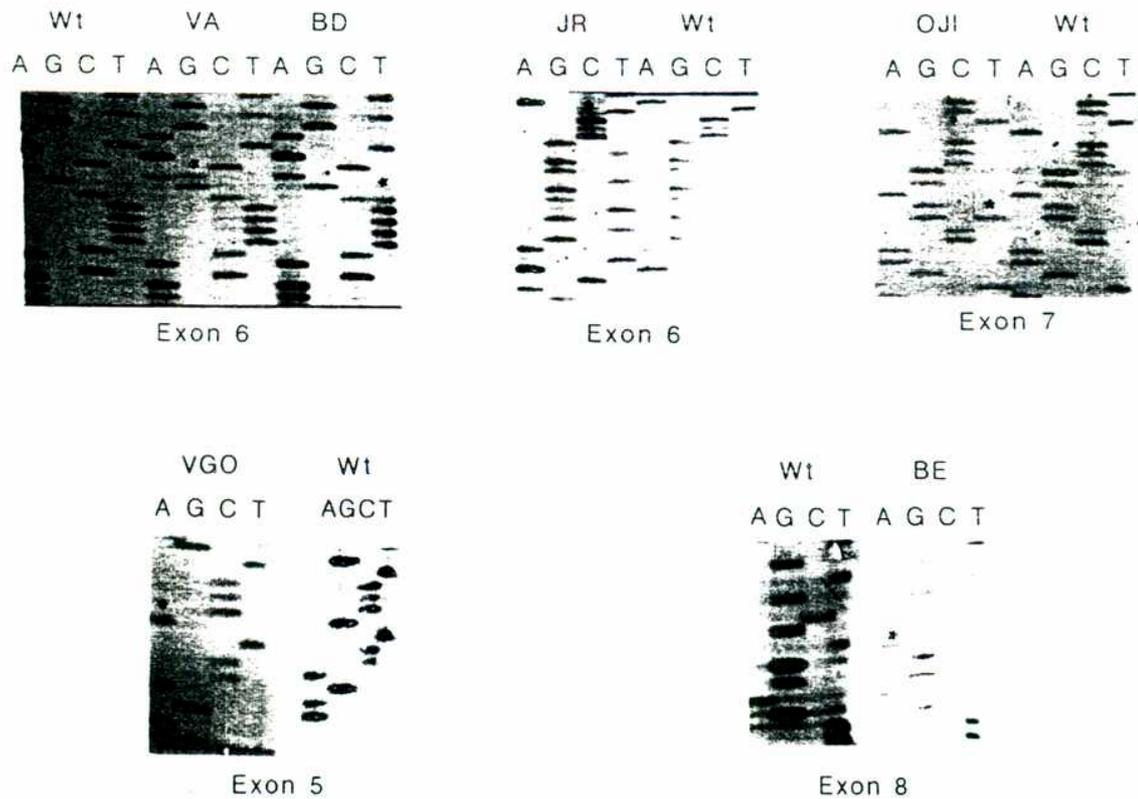


Figura 17: Secuenciación de las mutaciones en el gen p53 observadas por SSCP en SNCL sudamericanos. Wt: secuencia normal. Los * se colocaron por encima de las bandas que representan la mutación.

El tipo de cambio más frecuentemente observado fueron las transiciones (seis), aunque también se observaron tres transversiones, una deleción y una inserción. De las cuatro mutaciones en el exón 6, tres ocurrieron en el codón 213 pero sólo una produjo una substitución del aminoácido. Las otras dos transiciones A--G silenciosas se deben a un polimorfismo en la población (ver más adelante).

Las mutaciones en los exones 7 y 8 son comunes en tumores hereditarios (Síndrome de Li-Fraumeni). En 4 de los 27 linfomas sudamericanos analizados se observaron mutaciones en codones (245 y 248) donde fueron descritas mutaciones constitucionales. Sin embargo, y al igual que en la mayoría de los casos de este panel, en esas cuatro biopsias se halla presente el alelo normal.

Resumiendo, de un total de trece mutaciones puntuales, dos son el resultado de un polimorfismo poblacional, ocho producen un cambio de aminoácido, una resulta en una terminación temprana de la proteína y dos causan un corrimiento del marco de lectura (Tabla 5). La proporción de LB sudamericanos con mutaciones en el gen p53 es del 37% (10/27 tumores; el caso BD porta dos mutaciones).

Como se demostraron diferencias moleculares en los subtipos de LB, se recopilaron todos los datos disponibles sobre mutaciones del p53 en LB, tanto en biopsias como en líneas celulares (más de 70 casos de distintas regiones geográficas). Se analizó dicha información con respecto a los puntos de ruptura de los cromosomas 8 y 14 y a la presencia del EBV. La presencia de un p53 mutado en LB parece ser independiente del origen geográfico del tumor, de la localización de los puntos de ruptura y de la asociación con el EBV.

Los estudios del p53 en tumores sólidos demostraron que el espectro mutacional (distribución de las mutaciones en el gen) es tumor-específico. Por lo tanto, para determinar el patrón de mutaciones característico del LB, se utilizó la información recopilada y se realizó el gráfico de la Fig 18 para determinar la frecuencia de participación de cada codón. Los datos muestran que el 53% de las mutaciones están agrupadas en una pequeña región de 33 aminoácidos (213 al 248). Sorprendentemente, el codón 213 aparece mutado tan frecuentemente como el codón 248, el codón 273 raramente está involucrado en LB. Esto demuestra diferencias con el espectro previamente descrito para cancer de colon, pulmón y mama.

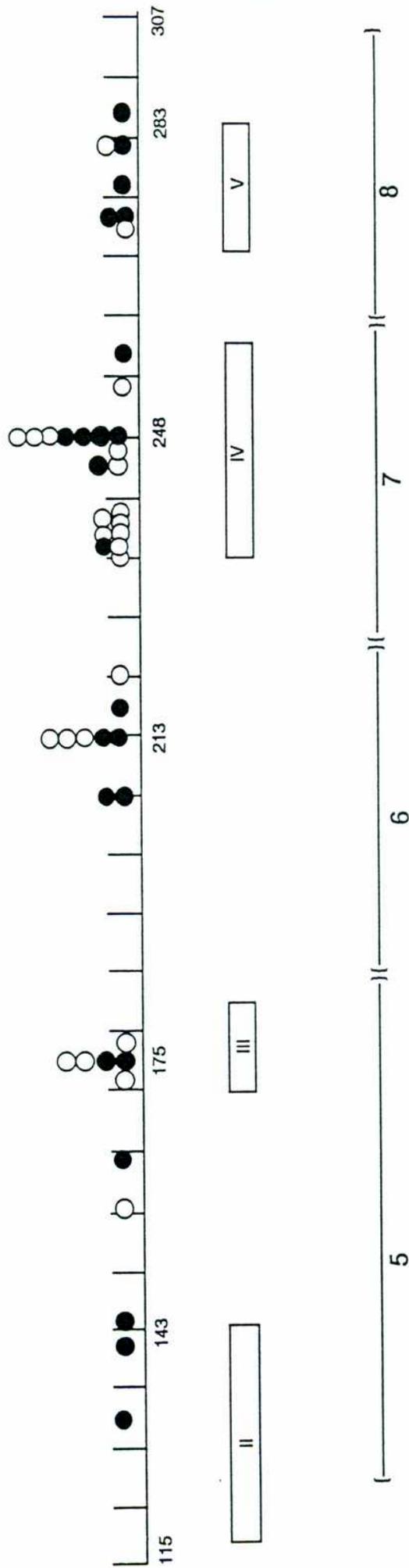


Figura 18: Representación gráfica de las mutaciones en el gen p53 (codones 115 al 307) observadas en SNCL en este trabajo y en otros (Gaidano, 1991 y Farrell, 1991). Los círculos negros representan linfomas EBV+ y los círculos vacíos, linfomas EBV-. II, III, IV y V indican los dominios conservados. Se muestra también la extensión de los exones 5-8.

Con el fin de analizar la importancia clínica de las mutaciones en el gen p53, se correlacionó este aspecto molecular con la evolución clínica de 22 pacientes. Quince presentaban el gen normal y 7 mostraron mutaciones. Del grupo con p53 normal, 10 estaban vivos (a Febrero de 1993), libres de enfermedad, con una sobrevida libre de eventos mediana de 33 meses (rango de 3-62). Los otros 5 pacientes murieron antes del mes, por causas relacionadas con el tratamiento, excepto 1 que murió con enfermedad progresiva. Por el contrario, 5 de los 7 pacientes con mutaciones recayeron y 4 de ellos murieron por progresión en menos de 6 meses. La sobrevida libre de eventos mediana de los restantes 3 pacientes (vivos) fue de 30 meses (rango 26-30). Los datos se resumen en la Tabla 6.

Tabla 6: Comparación del grupo de pacientes con p53 normal y aquellos con p53 mutado

	p53 normal	p53 mutado
Recaídos	1	5
Fallecidos	5	4
por la enfermedad	1	4
por causas 2rias	4	0
VLE	10	3
SLE mediana	33 meses	30 meses

VLE: vivos libres de enfermedad. SLE: sobrevida libre de eventos

10- DESCRIPCION DEL POLIMORFISMO NEUTRO EN EL EXON 6 DEL GEN p53:

En el análisis de las posibles mutaciones del gen p53 en LB sudamericanos se observaron dos casos con la misma mutación neutra en el codón 213 (exón 6). Simultáneamente, Gaidano y cols. describieron que 1,78% de linfomas norteamericanos y africanos presentaban una mutación silenciosa en dicho codón. Con el fin de determinar si la transición A--G en la tercera posición del codón

213 representa un polimorfismo, se analizó el ADN de población normal (individuos no relacionados) de Sudamérica, EEUU y Africa.

Para determinar la variación en la secuencia (CGA--CGG), se amplificó por PCR el exón 6 y el producto fue digerido con TaqI, pues el cambio elimina el sitio de restricción. Así pueden identificarse dos alelos: A1 genera un fragmento de 140 pb y uno de 40 pb y A2 genera un solo fragmento de 180 pb (Fig 19).

Las frecuencias alélicas obtenidas son las siguientes:

Población	# individuos	A1	A2
Sudamericana	50	90%	10%
Estadounidense	30	97%	3%
Africana	23	100%	-

Esto demuestra la existencia de un dimorfismo en el codón 213 del exón 6 del p53, con distinta frecuencia en las distintas poblaciones étnicas.

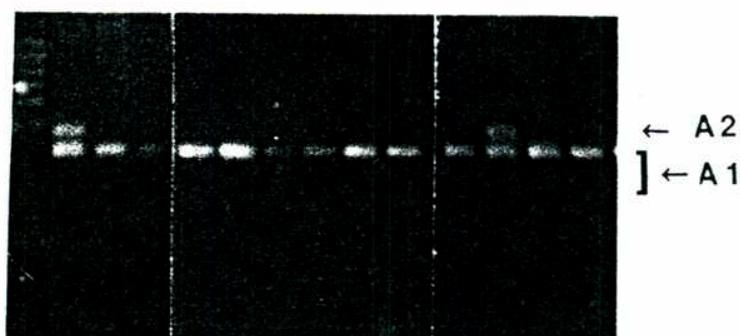


Figura 19: Fotografía de un gel de agarosa 4% (3% NuSieve, 1% SeaKem) teñido con bromuro de etidio que muestra la digestión con TaqI del producto de PCR del exón 6 del p53. Se identifican 2 alelos: A1 (representado por una banda de 140 pb y una de 40 pb) y A2 (banda de 180 pb). 1ra línea de la izquierda: marcador de peso molecular. Los ADN genómicos se obtuvieron de sangre periférica de individuos sudamericanos (argentinos, chilenos y brasileños).

11- DETERMINACION DEL ESTADIO DE DIFERENCIACION CELULAR DONDE OCURRE LA TRANSLOCACION t(8;14):

Los reordenamientos de los genes de las inmunoglobulinas ocurren en distintos estadios de la diferenciación de los linfocitos B en un orden jerárquico estricto. Esto permite analizar cuándo ocurre la translocación en LB.

Teniendo en cuenta que el primer evento es la reunión de un segmento D_H con un J_H y que ocurre simultáneamente en ambos alelos, se analizó por Southern blot la región J_H para determinar la configuración D-J_H. Se utilizaron las enzimas de restricción EcoRI, HindIII y BglII y las siguientes sondas: BamHI-HindIII, BglII-BglII y SacI-SacI (correspondiente a S_μ) (ilustradas en la Fig 8).

Se estudiaron 56 LB: 20 sudamericanos, 20 norteamericanos y 16 africanos, cuyos puntos de ruptura fueron previamente determinados. En cada linfoma se determinó la presencia de la banda germinal y el número de bandas reordenadas. Este análisis permitió además reconfirmar los resultados previos acerca del punto de ruptura del cromosoma 14 e incluso, en algunos casos, determinar una localización más precisa para las rupturas fuera de la región S_μ.

- Interpretación de las bandas germinales:

En la interpretación era importante distinguir las bandas germinales presentes en las células tumorales de las generadas por células normales (no B) posiblemente presentes en las muestras. Esto resultó relativamente sencillo considerando: 1) Es probable que en las biopsias halla suficientes células normales como para contribuir a una señal, de intensidad variable pero presente en todas las digestiones con las distintas enzimas (Fig 20A). 2) En células B normales deben observarse dos bandas reordenadas (Fig 20B). 3) Como virtualmente todos los LB sintetizan Ig y portan una t(8;14), se espera observar al menos dos bandas reordenadas, una de las cuales proviene del alelo reordenado productivamente (Fig 20C,D). Por lo tanto, la existencia de una sola banda reordenada en una o más digestiones es una evidencia de que la región D-J_H en el otro alelo, presumiblemente el translocado, está en configuración germinal. Por consiguiente se analizó tanto el número de bandas reordenadas como la presencia de la banda germinal. En este contexto, la intensidad de la banda germinal con respecto a la(s) reordenada(s) también es importante. Las bandas germinales muy débiles muy probablemente se deban a células normales contaminantes, mientras que las bandas germinales reales (del tumor) deben ser tan intensas como la(s) reordenada(s).

- Las células B humanas productoras de Ig poseen reordenamientos DJ_H en ambos alelos:

Dado que la información de la literatura del reordenamiento DJ_H simultáneo se realizó en células murinas, se confirmó este fenómeno en células humanas. Se analizaron 19 líneas celulares B maduras (15 líneas linfoblastoideas y 4 líneas de leucemia linfocítica crónica). Todas mostraron dos bandas reordenadas en las digestiones con EcoRI y HindIII hibridizadas con la sonda J_H de 6Kb (Fig 21).

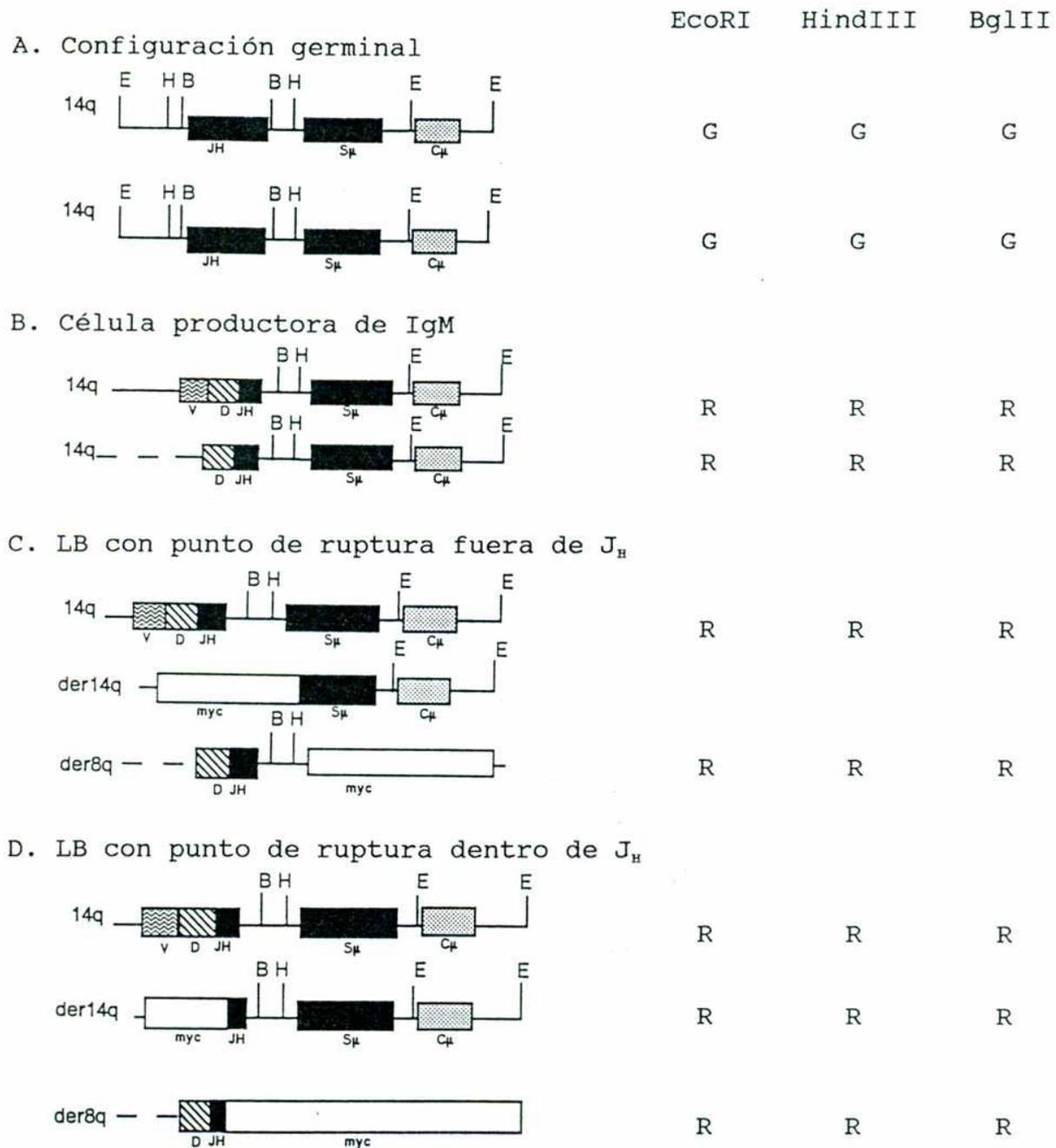


Figura 20: Esquema de la configuración de varios alelos normales o derivados del locus IgH (no en escala) en diversos tipos celulares. El patrón esperado (teórico) de bandas que hibridizan con la sonda de la región J_H cuando se realizan digestiones de ADN genómico con las enzimas EcoRI (E), HindIII (H) y BglII (B) se muestra a la derecha. G: germinal. R: reordenada. La línea quebrada en B (14q), C (der8q) y D (der 8q) indica que la región V puede o no estar reordenada junto al complejo DJ_H.

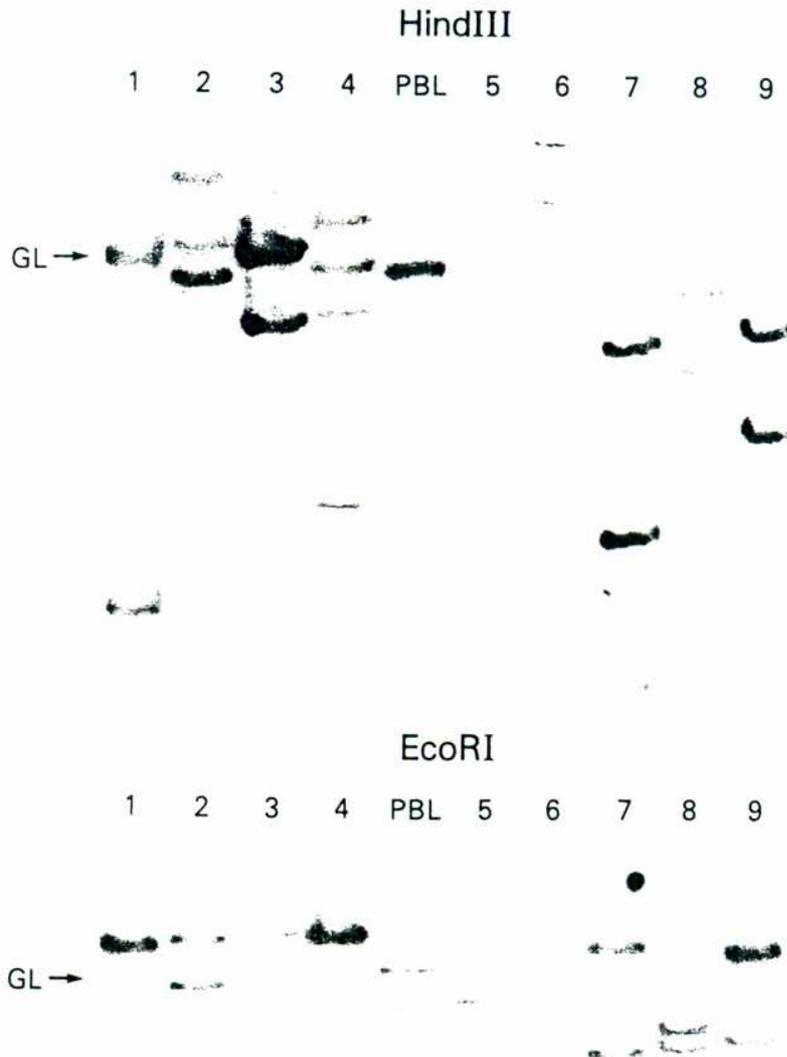


Figura 21: Autorradiografías de los reordenamientos del gen de la cadena pesada de las Igs observados en líneas celulares linfoblastoideas. El ADN genómico de 9 líneas (1-9) y de sangre periférica (PBL) se digirió con HindIII o EcoRI y las membranas se hibridaron con una sonda de la región J_H (BamHI-HindIII). El clon 4 ha estado en cultivo por menos de 3 meses después de la transformación con EBV y muestra claramente varios subclones reordenados de la región J_H . En ninguna de las líneas celulares se observa un alelo en configuración germinal. Las bandas germinales (GL) presentes en el ADN control (PBL) tienen 6,5 y 13,7 Kb en las digestiones con HindIII y EcoRI, respectivamente.

- Las células de Burkitt frecuentemente presentan un segmento D-J_κ no reordenado en un alelo:

En 9 tumores se observó una banda germinal y una reordenada en las digestiones con EcoRI (Tabla 7 y Fig 22: casos AF y ZJ). Dicha banda germinal es de intensidad igual o mayor que la banda reordenada. La presencia de una región D-J_κ germinal fue confirmada con HindIII (Tabla 7 y Fig 22: casos 19705 y 3914). En 5 de estos tumores se realizó también una digestión con BglII (Fig 22: caso SRC) que confirmó el patrón germinal/un reordenamiento en 4 de ellos. Uno de esos 9 linfomas (3974, Tabla 7) mostró una banda reordenada extra que probablemente se deba a una mutación que crea un sitio BglII adicional. Sorprendentemente, un LB africano (3908), confirmado por histología y monoclonalidad del EBV, presentó solamente una banda germinal con las tres enzimas.

En los 46 casos con más de una banda reordenada en la digestión con EcoRI, el análisis con HindIII reveló una única banda reordenada y una banda germinal en 15 tumores (Tabla 7 y Fig 22: 3792 y 3919). Doce de ellos fueron posteriormente estudiados con BglII y 9 tenían una sola banda reordenada y una banda germinal (Fig 22: 2209) (los 3 restantes fueron considerados no informativos) (Tabla 7). Por lo tanto, esos 9 linfomas fueron interpretados como portando la región D-J_κ en configuración germinal en el alelo translocado y un punto de ruptura dentro del fragmento EcoRI (concordando con información previa) pero fuera del HindIII (y por supuesto, fuera de BglII), explicando la banda reordenada adicional con EcoRI. Estos casos representan buenos ejemplos para distinguir el alelo germinal en el tumor de células normales contaminantes. En la primera situación, una banda germinal intensa se observa con BglII y HindIII pero no con EcoRI. Por el contrario, en la segunda circunstancia, una banda germinal débil proveniente de células normales se observa con todas las enzimas. Esta interpretación fue además confirmada por la ausencia de una banda germinal con EcoRI en JD38 (Tabla 7), que por ser una línea celular, no posee células normales (Fig 23).

En los 31 linfomas restantes, se observaron al menos 2 bandas reordenadas tanto con EcoRI como con HindIII (Fig 22: RJ, ND y ME). En 4 de ellos el análisis con BglII demostró una sola banda reordenada (Tabla 7: JR, BE, CCH, AG). Esto indica una configuración germinal de la región D-J_H y un punto de ruptura fuera del fragmento BglII pero dentro del HindIII. En 10 casos con ruptura en la región S μ , o sea que la translocación no produce una banda reordenada, la presencia de 2 bandas reordenadas con EcoRI y HindIII (y confirmadas con BglII en 2 casos) sugiere que el reordenamiento DJ_H fisiológico ocurrió en ambos alelos (Tabla 7). En 20 linfomas restantes fue imposible determinar el estado configuracional de la región D-J_H de cada alelo porque en las tres digestiones se observaron por lo menos 2 bandas reordenadas y en ninguno se pudo confirmar una ruptura en S μ . Estos casos pueden poseer puntos de ruptura en el fragmento BglII, con lo cual el alelo germinal estaría enmascarado, y/o pueden haber sufrido un reordenamiento fisiológico en ambos alelos.

En conclusión, en 26 de los 36 casos informativos (72%) el análisis por Southern blot evidenció la presencia de una región D-J_H en configuración germinal. En todos los linfomas se demostró que las secuencias S μ comigran con secuencias J_H en al menos uno de los alelos (asumido como productivo). En consecuencia, se puede concluir que el alelo translocado es el que contiene el segmento D-J_H germinal. La figura 23 muestra, como ejemplo representativo, un detallado análisis de la línea celular JD38. Además, la otra posibilidad (muy poco probable) de que el alelo translocado sea también el productivo, se excluye en 32 de los 35 tumores por la demostración de un punto de ruptura que interrumpiría el marco de lectura abierto VDJ_H-C μ .

Tabla 9: Análisis por Southern blot de la región J_H¹

Caso	Origen ²	EBV	EcoRI	HindIII	BglII	CR14 ³	DJ ⁴
AF	SA	+	G/R	G/R		S α	GL
ZJ	SA	-	G/R	G/R		C μ	GL
AA	SA	+	G/R	G/R		C δ	GL
JUS	NA	-	G/R	G/R		C μ - μ_m	GL
SRC	SA	-	G/R	G/R	G/R	><E	GL
19705	NA	-	G/R	G/R	G/R	><E	GL
3974	NA	+	G/R	G/R	G/R/R	C μ	GL
3914	AF	+	G/R	G/R	R/G	><E	GL
3751	AF	+	G/R	G/R	G/R	><E	GL
3908	AF	+	G	G	G	ND	GL
In	SA	-	R/G/R	R/G	G/R	5' E-H	GL
FNR	SA	+	G/R/R	G/R	G/R	5' E-H	GL
FB	SA	+	R/G/R/R	R/G	G/R	5' E-H	GL
VGO	SA	+	R/G/R	G/R	R/G	S μ	GL
JD38 ^c	NA	-	R/R	G/R	G/R	S μ	GL
3792	AF	+	G/R/R	G/R	G/R	5' E-H	GL
3919	AF	+	G/R/R	G/R	G/R	5' E-H	GL
2209	AF	+	G/R/R/R	G/R	G/R	5' E-H	GL
3876	AF	+	G/R/R	G/R	R/G	5' E-H	GL
SEN	NA	+	G/R/R	R/G		5' E-H	GL
2211	AF	+	R/G/R	G/R		5' E-H	GL
2210	AF	+	R/G/R	R/G		S μ	GL
HD	SA	-	R/G/R	R/G	G/R/R	JH	IC
4033	NA	-	G/R/R	G/R	R/R/G	NS	IC
2214	AF	+	G/R/R	G/R	R/G/R/R	NS	IC
JR	SA	-	R/G/R	R/G/R	G/R	Bg-H	GL
BE	SA	-	G/R/R	R/G/R	R/G	Bg-E	GL
CCH	SA	+	G/R/R	G/R/R	G/R	H-Bg	GL
AG	SA	-	R/R/R	R/R	R/G	Bg-E	GL
DS179 ^c	NA	-	R/R	R/R	R/R	S μ	R
18436	AF	+	R/G/R	G/R/R	G/R/R	S μ	R
SCL	SA	+	G/R/R	G/R/R		S μ	R
MP	SA	+	R/G/R	G/R/R		S μ	R
CA46 ^c	SA	-	R/R	R/R		S α	R
SET	NA	+	R/R	R/R		S μ	R
JLP119 ^c	NA	-	R/R	R/R/R		S μ	R
Ramos ^c	NA	-	R/R	R/R		S μ	R
ST486 ^c	NA	-	R/R	R/R		S μ	R
2217	AF	+	R/R	R/R		S μ	R

Caso	Origen ²	EBV	EcoRI	HindIII	BglII	CR14 ³	DJ ⁴
CV*	SA	+	R/G/R/R	R/G/R/R	R/R	JH	IC
RJ	SA	-	R/R	R/R	R/R	JH	IC
ND	SA	-	G/R/R	R/G/R	R/R/G	JH	IC
ME	SA	-	R/R	R/R	R/R	NS	IC
DW6 ^c	NA	+	R/R	R/R	R/R	JH	IC
DIF	NA	+	R/G/R	R/G/R	R/R/G	JH	IC
3931	NA	-	R/R	R/R/R	R/R	NS	IC
3985	NA	-	G/R/R	G/R/R	R/G/R	JH	IC
4024	NA	-	G/R/R	G/R/R	G/R/R	JH	IC
POL*	NA	+	G/R/R	R/G/R/R	R/R	NS	IC
YANA*	NA	-	R/R	R/G/R/R	R/G/R	JH	IC
3909	AF	+	G	G/R/R	R/R/G	NS	IC
3867	AF	+	R/R	R/R	R/R	NS	IC
Ag876 ^c	AF	+	R/R	R/R	R/R/R/R	JH	IC
P3HRI ^c	AF	+	R/R	R/R	R/R	JH	IC
SHO	NA	+	G/R/R	G/R/R		NS	IC
3983	NA	-	G/R/R	G/R/R		NS	IC

¹Las hibridizaciones se realizaron con sondas J_H: fragmento de 6Kb BamHI-HindIII en las digestiones con HindIII y EcoRI y fragmento de 4Kb BglII-BglII para las digestiones con BglII.

G: banda germinal; R: banda reordenada.

²Origen del tumor: SA: Sudamérica; NA: Norteamérica; AF: Africa Ecuatorial.

³CR14: punto de ruptura del cromosoma 14. La localización se define dentro de fragmentos de restricción. B: BamHI; Bg: BglII; H: HindIII; E: EcoRI. Sa: región switch α ; C μ : región constante μ ; C δ : región constante delta; ><E: fuera del fragmento EcoRI; S μ : fragmento EcoRI-HindIII; JH: fragmento BamHI-HindIII; NS: no-S μ .

⁴GL: un alelo posee D-J_H germinal; R: ambos alelos están reordenados en la región D-J_H; IC: configuración D-J_H inconclusiva.

^c Línea celular

* Las bandas germinales en cualquiera de las digestiones son muy débiles (incluso casi indetectables en algún caso), claramente producidas por células normales presentes en las biopsias.

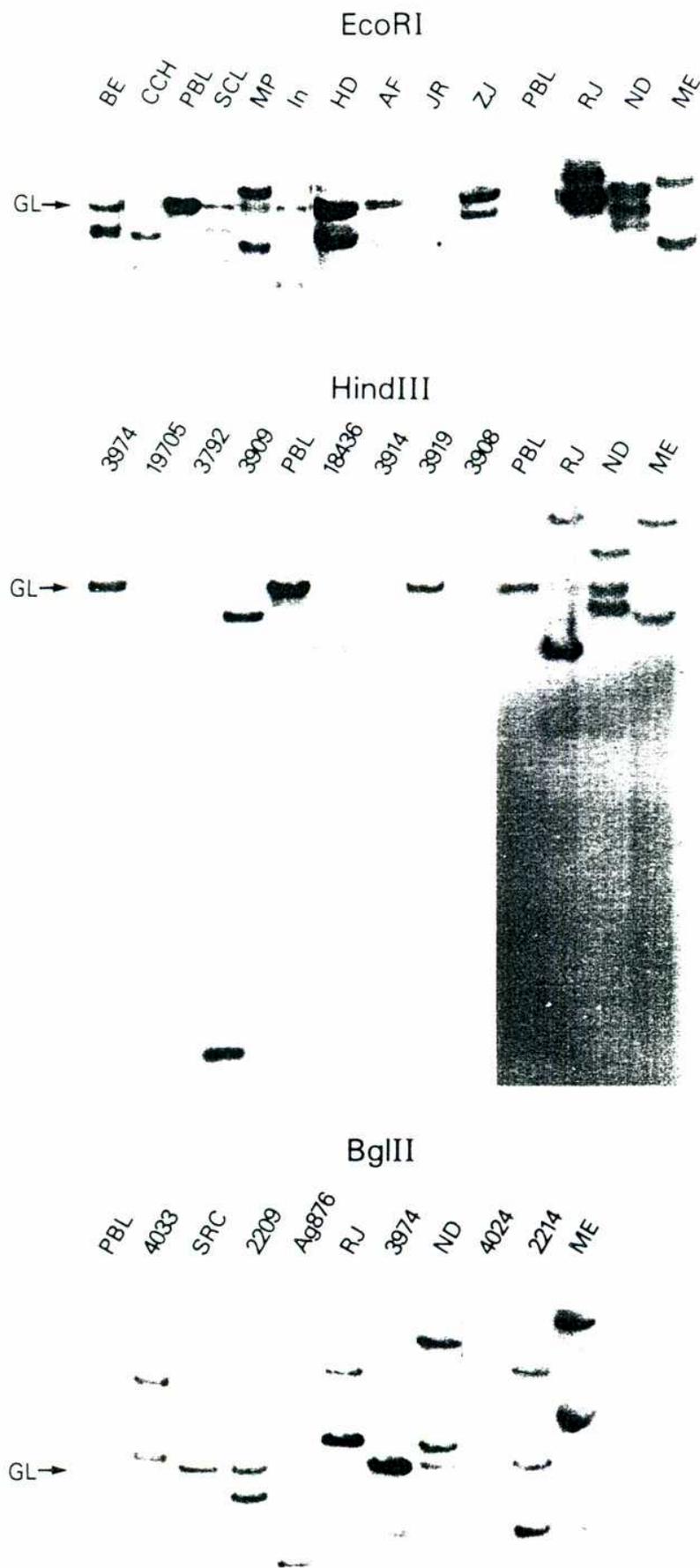


Figura 22: Autorradiografías de los reordenamientos del gen de la cadena pesada de las Igs observados en el LB (ejemplos representativos de la Tabla 7). PBL: ADN de sangre periférica. El ADN genómico de cada muestra fue digerido con EcoRI, HindIII y BglII y las membranas fueron hibridizadas con la sonda JH (BamHI-HindIII) en los dos paneles superiores, y con la sonda JH (BglII-BglII) en el panel inferior. Los casos AF y ZJ son ejemplos de tumores que muestran una sola banda reordenada con EcoRI. Estos casos presentan también un solo reordenamiento con HindIII, semejante a los casos 19705 y 3914 de la figura. SRC, en el panel inferior, es un tumor que como otros cuatro más (Tabla 7), presenta una única banda reordenada con BglII. Los casos 3792 y 3919, en el panel del medio, representan tumores con dos bandas reordenadas con EcoRI pero una sola con HindIII. Las muestras ND, ME y RJ son ejemplos de linfomas con dos reordenamientos en las tres digestiones.

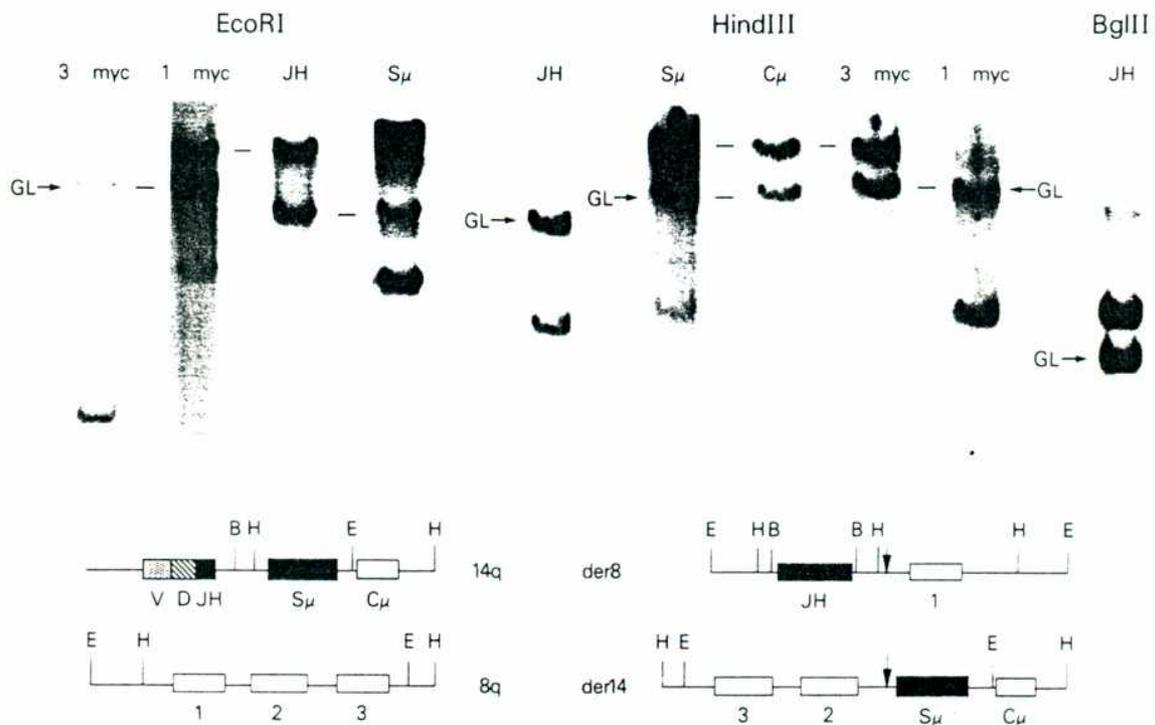


Figura 23: La parte superior muestra los resultados de un detallado análisis del c-myc y del gen IgH en la línea celular de LB JD38. Las enzimas de restricción y las sondas utilizadas están indicadas. Las bandas germinales (GL) se señalan con una flecha. La hibridización con la sonda J_H (BglIII-BglIII) muestra una sola banda reordenada con HindIII y BglIII. El otro alelo se haya en configuración germinal. Las rehibridizaciones de la membrana EcoRI con las sondas del 1er y 3er exón del c-myc y con la sonda S_μ, demuestra la comigración (guión) de bandas reordenadas 1 myc/J_H y J_H/S_μ (sugiriendo que representa al alelo productivo). La banda reordenada del 3er exón no comigra con la banda reordenada S_μ restante, pero sí se observó comigración de ésta última con una sonda del 2do exón (no mostrado), sugiriendo la creación de un sitio EcoRI en el 2do intrón del alelo translocado. sto se confirma por la comigración de bandas reordenadas (guiones) S_μ/C_μ/3 myc en la digestión con HindIII.

La parte inferior es una reconstrucción esquemática de los cromosomas normales y derivados de la t(8;14) en JD38. E:EcoRI, H: HindIII, B: BglIII. Las flechas señalan los puntos de ruptura.

DISCUSSION

1- CARACTERIZACION MOLECULAR DE LA t(8;14) EN SNCL SUDAMERICANOS: DIFERENCIAS CON RESPECTO A LINFOMAS DE OTRAS REGIONES DEL MUNDO

Previamente se había descripto que en SNCL existe una asociación entre el punto de ruptura del cromosoma 8 y el origen geográfico del tumor (Pellici, 1986; Barriga, 1988; Shiramizu, 1991). Una proporción significativamente alta de linfomas de Africa ecuatorial (específicamente Ghana, donde es una enfermedad endémica) presentan rupturas fuera del fragmento HindIII que contiene al oncogen c-myc (Fig 7). En contraste, la mayoría de los linfomas norteamericanos (esporádicos) muestran puntos de ruptura dentro de dicho fragmento de restricción, interrumpiendo al c-myc.

Esto, sumado a las diferencias clínicas y epidemiológicas observadas entre los dos subtipos: endémico y esporádico (Magrath, 1986), sugiere que dichas entidades son patogenéticamente diferentes, quizás con respecto al tipo de célula B donde ocurre la translocación.

Se podría pensar que las diferencias clínicas y moleculares descriptas se deben a diferencias raciales entre ambas poblaciones de pacientes. Sin embargo, esto no sería cierto. Aunque el factor étnico no puede descartarse completamente, la baja incidencia de SNCL en la población negra norteamericana y en otras poblaciones africanas contrasta dramáticamente con la alta incidencia del tumor en Africa ecuatorial (Magrath, 1990, 1991). Por lo tanto, parecería que el medio ambiente es el principal determinante de la incidencia y del subtipo molecular de SNCL.

Considerando estas observaciones se decidió estudiar a los SNCL de Sudamérica y analizar si presentan el patrón molecular esporádico, endémico o un patrón propio. Además, los países estudiados: Argentina, Chile y Brasil son particularmente interesantes porque abarcan tanto clima templado como tropical, reproduciendo las condiciones climáticas en las cuales se han

encontrado el eLB y el sLB. Pero difieren en otros aspectos importantes, como el socioeconómico y el étnico, con respecto a EEUU y a Africa. Además, las dos regiones sudamericanas son más homogéneas entre sí en cuanto a estilo y condiciones de vida que EEUU comparado con Africa.

Se examinaron las características moleculares de la t(8;14) en 39 linfomas: 17 pacientes argentinos, 10 pacientes chilenos y 12 pacientes brasileños (Tabla 1). Los resultados obtenidos para la localización del punto de ruptura del cromosoma 8 (Fig 9) favorecen la hipótesis anteriormente mencionada, pues el subtipo molecular preponderante en Sudamérica es diferente del africano y, sorprendentemente, también del norteamericano.

Incluso dentro de Sudamérica, se observan algunas diferencias en la localización de los puntos de ruptura en el c-myc (Tabla 2). El 48% de los linfomas de la región templada (Argentina y Chile) presenta rupturas en la región HindIII-SmaI, 5' adyacente al c-myc, mientras que la mayoría (41%) de los casos brasileños (tropicales) muestra el rearrreglo fuera del fragmento HindIII (5' lejanos).

A continuación se considerarán a todos los linfomas sudamericanos en conjunto para su comparación con los linfomas esporádicos de EEUU y con los africanos.

Mientras que el 60% (18/30) de los sLB tienen puntos de ruptura en el primer exón/intrón del c-myc (Shiramizu, 1991), sólo el 26% (10/39) de los tumores de Sudamérica presenta rupturas similares. Por otra parte, 16 de los 39 linfomas (41%) analizados en este estudio muestran puntos de ruptura en la región 5' flanqueante del c-myc y sólo el 28% de los sLB tienen roturas en esta región. Las rupturas en dicha región (HindIII-SmaI) son todavía menos frecuentes en los eLB (9%) (Shiramizu, 1991). El histograma de la Fig 24 muestra la heterogeneidad de los puntos de ruptura en las distintas regiones geográficas.

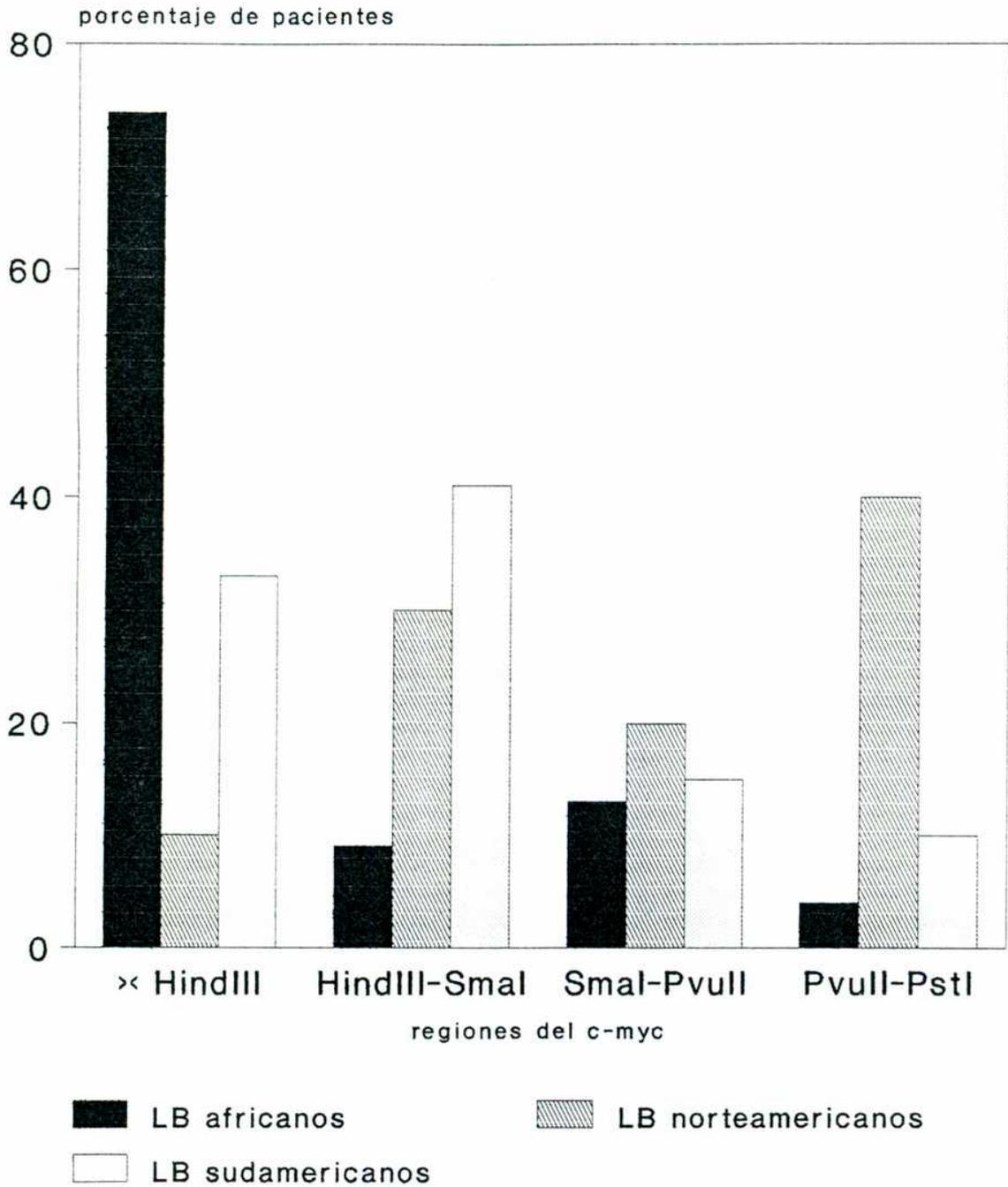


Figura 24: Histograma de frecuencias de puntos de ruptura en el locus c-myc según el origen geográfico. Las regiones del c-myc se delimitan por enzimas de restricción (>>=fuera de).

Estas diferencias tienen implicancias importantes, pues en los tumores con punto de ruptura en el primer exón/intrón del c-myc, los promotores normales P1 y P2 (Battey, 1983) están separados del resto del gen y por consiguiente, no son accesibles como sitios de iniciación de la transcripción. En estas circunstancias, los transcriptos se inician en sitios dentro del primer intrón (ar-Rushdi, 1983). Más aún, en esos tumores, casi todas las regiones regulatorias del c-myc (Hay, 1987) se pierden debido a la translocación. Al menos 60% de los sLB de EEUU pertenecen a esta categoría molecular (Fig 24). En contraste, el presente análisis demuestra que la mayoría de los linfomas de Sudamérica (74%) retienen los promotores normales P1 y P2 (Tabla 2; Fig 24). Así, la tendencia en los linfomas sudamericanos de mantener intacta la unidad transcripcional del c-myc es similar a los eLB, más que a los sLB de EEUU. Pero, a diferencia de los eLB una parte de las regiones 5' regulatorias se pierden. Los LB con punto de ruptura 5' lejano (fuera del fragmento HindIII), y por lo tanto, fuera de la región regulatoria conocida del c-myc (Hay, 1987), fueron observados principalmente en Africa (74%) (Shiramizu, 1991), pero también son relativamente frecuentes en Sudamérica (33%). Esta categoría se observó muy raramente en linfomas de EEUU (9%) (Shiramizu, 1991) (Fig 24).

Estos resultados sugieren que habría tres subtipos moleculares de LB y que es probable que cada una de las principales regiones de ruptura del c-myc (5' lejana, inmediatamente flanqueante y primer exón/intrón, que predominan en Africa, Sudamérica y Norteamérica, respectivamente) resultan en un mecanismo de desregulación del c-myc diferente. Presumiblemente, las condiciones ambientales en cada región geográfica son particularmente determinantes del desarrollo del subtipo molecular de LB que predomina en cada una.

La gran mayoría de los puntos de ruptura en el cromosoma 14 (Tabla 1) se encuentran en el fragmento EcoRI (Fig 8) que contiene la región Joining completa, el enhancer intrónico y la región

Switch- μ , coincidiendo con lo descrito para eLB y sLB (Neri, 1988; Shiramizu, 1991). Además, la distribución de los puntos de ruptura observada en linfomas de Sudamérica es similar a la de los tumores esporádicos: el 30% se produce en la región S μ . El punto de ruptura dentro del gen de la cadena pesada de las Igs tiene una importancia considerable en el mecanismo de desregulación del c-myc (Klein, 1984; Croce, 1985; Magrath, 1990). Las roturas se producen 5' ó 3' del enhancer intrónico de las Igs (Gillies, 1983), de tal forma que esta secuencia regulatoria queda junto al c-myc o en el otro cromosoma derivado. Es altamente probable que los distintos niveles de transcripción del c-myc no sólo se deban al tipo de daño sufrido en sus propias secuencias regulatorias, sino también a diferencias en las regiones heterólogas yuxtapuestas (enhancers del locus Ig). Por lo tanto, es probable que sea la combinación de los puntos de ruptura de los cromosomas 8 y 14 (Fig 10) el factor crucial en la desregulación del c-myc.

Los LB pueden subdividirse según las cuatro combinaciones de rupturas más sencillas, detalladas en la Tabla 8.

Tabla 8: Distribución de las distintas combinaciones de puntos de ruptura en los cromosomas 8 y 14 en distintas regiones geográficas

	R/S μ	R/NS μ	NR/S μ	NR/NS μ
Sudamérica	10 (26)	15 (39)	1 (3)	12 (32)
EEUU*	9 (28)	20 (63)	1 (3)	2 (6)
Africa*	3 (13)	3 (13)	2 (9)	15 (65)

* Tomado de Shiramizu, 1991. Entre paréntesis se muestran los porcentajes.
R: c-myc reordenado dentro del fragmento HindIII; NR: punto de ruptura en el cromosoma 8 fuera del fragmento HindIII que abarca al c-myc. S μ : ruptura en el fragmento HindIII-EcoRI que contiene a la región Switch- μ ; NS μ : punto de ruptura fuera de la región S μ .

Estos resultados demuestran que la t(8;14) que conduce a la yuxtaposición de un alelo c-myc no reordenado con la región S μ del gen de la cadena pesada de las Igs, es muy infrecuente: sólo se observó en 4 de los 93 linfomas (4%) analizados en todo el mundo. Esto puede deberse a limitaciones estructurales concomitantes para la ocurrencia de esta combinación o, alternativamente, a la necesidad de otros cambios genéticos raros que cooperen con esta combinación para proveer a la célula una ventaja de crecimiento (ventaja selectiva). Por lo tanto, los puntos de ruptura en S μ están virtualmente siempre asociados a un alelo del c-myc truncado.

Dos de las otras combinaciones examinadas (R/NS μ y NR/NS μ) ocurren con una alta frecuencia en linfomas de EEUU y de Africa, respectivamente. Sin embargo, en los casos sudamericanos las distintas combinaciones se observan igualmente distribuidas.

La causa de la asociación entre la localización de puntos de ruptura, y particularmente de combinaciones específicas, y las regiones geográficas es desconocida. Parece razonable pensar que factores ambientales, actuando vía el sistema inmune, son los responsables de causar expansiones de poblaciones de células B ligeramente diferentes (presumiblemente con respecto al estadio de diferenciación), cada una más o menos susceptible de desarrollar rupturas cromosómicas en ubicaciones específicas. Se sabe que las proporciones relativas de células B en distintos estadios de diferenciación cambian con la edad y por la influencia de agentes ambientales. Por ejemplo, la malaria aumenta la proporción de células pro-B muy inmaduras en la médula ósea (Osmond, 1990). Una explicación alternativa sería que los diversos tipos de yuxtaposiciones c-myc-Ig deben cooperar con diferentes anomalías genéticas, que estén ambientalmente determinadas, en la conducción del crecimiento desregulado.

Los resultados de este trabajo apoyan fuertemente la hipótesis de que existen varios subtipos moleculares del SNCL y que cada uno

se halla altamente representado en alguna de las regiones geográficas analizadas. Es interesante hacer notar que la alta incidencia de LB en Africa, comparada con las regiones esporádicas, se explica (quizás totalmente) por el número de linfomas con ruptura 5' lejana al c-myc en el cromosoma 8.

2- CLUSTER DE PUNTOS DE RUPTURA EN LA REGION REGULATORIA DEL c-myc

La regulación de la expresión del gen c-myc es muy compleja e involucra elementos reguladores tanto positivos como negativos. Los elementos que actúan en cis, responsables del ajuste fino de la transcripción, están esparcidos en la región 5' del gen (Kelly, 1986; Hay, 1987; Siebenlist, 1988; Zajac-Kaye, 1988).

El análisis detallado de la distribución de los puntos de ruptura en el fragmento PstI-PvuII de 900 pb (Fig 11) reveló que el 50% de los linfomas estudiados presentaba el rearrreglo en el fragmento RsaI-HinfI de 130 pb, 5' a P1. Esta región (-300 pb a -150 pb) contiene secuencias activadoras del promotor P1 (Fig 12).

Probablemente, el cluster de puntos de ruptura no sea una mera coincidencia y tenga un significado funcional, en relación a la ubicación de los elementos reguladores. Por ejemplo, es posible que este cluster represente el límite más externo de rupturas cromosómicas que pueden interrumpir la función del elemento de regulación negativa (localizado inmediatamente hacia 5').

En forma análoga, los linfomas con punto de ruptura en el primer intrón presentan el rearrreglo hacia 3' de las secuencias "mif" (Shad, comunicación personal), posible elemento regulador negativo (Zajac-Kaye, 1988). De esta forma, parece probable que los puntos de ruptura estén ordenados por la localización de los elementos reguladores, dejando un elemento negativo hacia 5' y un elemento positivo hacia 3'.

Aunque no se sabe aún si el cluster aquí descrito tiene importancia funcional, hay algunas evidencias en su favor. Las células normales utilizan preferentemente el promotor P2, mientras que las células de Burkitt, en general, transcriben el gen c-myc tanto desde P1 como desde P2, equitativamente (Leder, 1983; Barriga, 1988). Dado que una línea celular (MC116) con punto de ruptura en el cluster utiliza únicamente P2 (Barriga, 1988), esta región del c-myc sería importante en la utilización de los promotores.

Por otra parte, en plasmocitomas murinos (neoplasia linfóide equivalente al LB ya que porta translocaciones cromosómicas semejantes que yuxtaponen al c-myc con un locus de Ig) se describió un cluster de roturas en el c-myc murino (-500 pb a -350 pb) que causa una disminución de la transcripción desde el promotor P2, incrementando por lo tanto, la relación P1/P2 (Yang, 1985).

En conclusión, los puntos de ruptura en el cromosoma 8 causan alteraciones en las secuencias regulatorias del gen c-myc. La localización precisa de la translocación probablemente tenga un significado funcional, pues determina qué elementos quedan activos y capaces de modular la transcripción. La delección de algunos elementos reguladores y la retención de otros parece ser un factor en la selección de las translocaciones que resultan en la desregulación del c-myc. Este oncogen está involucrado en la cascada de eventos que inmediatamente precede la división celular (Rabbits, 1985; Classon, 1987). En LB está regulado como si fuera un gen de Ig y, por consiguiente, su expresión *inapropiada* (más que expresión incrementada) conduce a la linfomagenesis, que requiere tanta proteína c-myc como la proliferación celular (Magrath, 1990).

3- VIRUS DE EPSTEIN-BARR Y SNCL

El virus de Epstein-Barr (EBV), que fue inicialmente descubierto en una línea celular derivada de un LB africano (Epstein, 1964), se encuentra asociado a esta neoplasia y es probable que juegue un rol importante en su patogénesis (Magrath, 1993). Sin embargo, la asociación del LB con el EBV depende del origen geográfico del tumor: >95% de los eLB contienen genomas virales, mientras que sólo el 20-30% de los sLB de EEUU son EBV+ (Barriga, 1988; Kiwanuka, 1988; Shiramizu, 1991). Por lo tanto, resultó interesante analizar la asociación del virus con los LB sudamericanos (Fig 13; Tabla 1).

Además de las diferencias descritas con respecto a la localización de los puntos de ruptura cromosómicos entre las regiones geográficas estudiadas, la proporción de tumores asociados con el EBV también difiere. Como en el caso de las rupturas cromosómicas, la frecuencia de linfomas sudamericanos EBV+ es intermedia (51%) entre Africa ecuatorial y Norteamérica. Incluso dentro de Sudamérica, parecen vislumbrarse diferencias entre la región tropical y la templada, 58% y 48% LB EBV+, respectivamente. Brasil es más cercano (climáticamente) al ambiente africano, y también parecería ser más semejante en cuanto a la asociación con el virus y a la localización de los puntos de ruptura, aunque el número de casos analizados es pequeño como para establecer conclusiones definitivas. Sería interesante relacionar los patrones moleculares con los diferentes grupos socioeconómicos y raciales dentro de estos países, dado que aunque no existen evidencias concretas que sugieran una predisposición étnica hacia un subtipo molecular particular, esta posibilidad no ha sido definitivamente excluída.

Se había descrito una correlación aparente entre la localización del punto de ruptura en el cromosoma 8 y la presencia (o ausencia) del EBV (Barriga, 1988; Shiramizu, 1991). Los linfomas

que presentan el rearrreglo fuera del fragmento HindIII que contiene al c-myc están casi siempre asociados a EBV, y estos LB son más frecuentes en Africa. Pero, los linfomas que presentan un alelo del c-myc truncado, observados predominantemente en EEUU, están igualmente distribuidos entre aquellos EBV+ y EBV-. Sorprendentemente, en Sudamérica no se observó ninguna correlación entre la presencia del EBV y un punto de ruptura en el cromosoma 8 específico (Fig 14). Es interesante que una proporción más alta de casos con ruptura 5' lejana al c-myc sean EBV negativos en Sudamérica (6/13) (Tabla 1) comparado con Africa (0/17) (Shiramizu, 1991). Esta observación plantea la posibilidad de que existan dos subtipos de LB con punto de ruptura "fuera" del c-myc, distinguibles según la asociación con el EBV. Más aún, los linfomas sudamericanos con punto de ruptura en la pequeña región inmediatamente 5' a los promotores del c-myc (PstI-SmaI) pueden ser EBV+ o EBV- (Tabla 1), contrastando con los sLB norteamericanos, donde los casos con ruptura inmediatamente 5' son invariablemente EBV- (Shiramizu, 1991).

Estas observaciones indican que si existe una correlación del EBV con la localización del punto de ruptura en el cromosoma 8, no es una relación simple. Quizás, la función desempeñada por el virus pueda ser reemplazada por otro factor (aún desconocido), o quizás, la localización precisa del punto de ruptura en el cromosoma 14 sea importante. De hecho, la mayoría de los LB EBV- en Sudamérica (16/19; 84%) (Tabla 4) y en EEUU (13/20; 65%) presentan rupturas fuera de la región $S\mu$, reteniendo probablemente el enhancer intrónico de las Igs. En forma análoga, aquellos linfomas con punto de ruptura en la región $S\mu$, y que por consiguiente el enhancer no es accesible para el c-myc, están generalmente asociados al EBV (8/11; 73%) (Tabla 4).

Los resultados demuestran que existe un gradiente de asociación con el EBV extendiéndose desde Africa, a través de Sudamérica hasta EEUU. Este gradiente también se corresponde con el

nivel socioeconómico y otros factores como la frecuencia de infección en los niños.

Los posibles roles patogénicos del EBV en SNCL incluyen la prolongación de la vida de las potenciales células blanco para la transformación, incrementando por lo tanto la probabilidad de que ocurra una translocación cromosómica. Alternativamente, el virus podría prolongar la vida de una célula que ya porta una translocación y que de otro modo estaría sujeta a apoptosis. De hecho, recientemente se demostró que el EBV puede inhibir el mecanismo apoptótico a través de la inducción del gen *bcl-2* (Henderson, 1991). La tercera posibilidad teórica es que ciertas proteínas virales participen directamente en la desregulación del *c-myc*. Si el virus simplemente altera la sobrevivencia de la célula, no se esperaría observar una correlación con el punto de ruptura en el cromosoma 8. En cambio, un efecto directo sobre la regulación del *c-myc*, podría resultar en dicha correlación. Estas posibilidades no son mutuamente excluyentes.

Cuando se analizó la presencia de genomas virales en las biopsias de LB, determinando la heterogeneidad terminal (región TR) del virus, se observó una sola banda de un tamaño indicativo de la forma episomal (circular) en aquellos LB asociados a EBV (Fig 13). Esto es una clara evidencia de la monoclonalidad del EBV en SNCL. A su vez es consistente con un trabajo que demostró que la proliferación monoclonal de estos linfomas ocurre luego de la infección viral (Neri, 1991). Sin embargo, en el presente análisis también se pudo detectar una serie de fragmentos ("escalera"), que hibridizan con la sonda que incluye la región TR, en 8 de las 55 biopsias de LB estudiadas (Fig 15). La presencia de este patrón se observó en digestiones del ADN genómico con BamHI y con BamHI + BglII. La presencia de múltiples fragmentos lineales, variando de tamaño por incrementos de 500 pb, demuestra la existencia del ciclo viral lítico (Raab-Traub, 1986).

Generalmente se asumió que el EBV permanece latente y que no existe replicación viral en las células linfoides tumorales infectadas. Incluso en la enfermedad de Hodgkin, también asociada al EBV en una proporción de casos (Armstrong, 1992), raramente se detectó ciclo lítico (Pallesen, 1991b). A pesar de esto, algunos trabajos postularon que en algunos tumores podía ocurrir replicación espontánea. Pero la disrupción de la latencia del EBV con inducción de replicación abortiva se describió únicamente en linfomas que se desarrollan en pacientes severamente inmunocomprometidos: pacientes con SIDA (Pallesen, 1991c) o que sufrieron un trasplante de órganos (Locker, 1989). Por lo tanto, la observación de EBV replicativo en el 14,5% de los LB fue inesperada.

En las células latentemente infectadas, el genoma del EBV está sujeto a una metilación extensiva y a una organización nucleosomal (Kintner, 1981). Probablemente, ambos procesos previenen la reactivación lítica. Así, las drogas que reducen la metilación y causan daños en el ADN aumentan la probabilidad de que ocurra replicación lítica (Weigel, 1983). Sin embargo, las biopsias analizadas fueron obtenidas de pacientes al momento del diagnóstico, previo al tratamiento quimioterápico y por lo tanto, la existencia de EBV lítico no puede atribuirse a un efecto de las drogas.

En la leucoplaquia oral vellosa, patología asociada al EBV y en la cual el virus se replica en forma lítica, la producción de viriones se debe a la presencia de un EBV defectivo (Patton, 1990). Lo mismo ocurre en la línea celular derivada de un LB africano P3HRI (particularmente en el subclon 5A) (Miller, 1984). La capacidad de inducir una replicación excesiva mapea en un fragmento de 2700 pb (WZhet) que resulta de la recombinación y delección del ADN entre las regiones BamHI Z y W. Cuando se investigó esta posibilidad, se observó que ninguna de las muestras presentaba el reordenamiento. Por consiguiente, la presencia de virus replicativo en las biopsias de LB no se puede explicar por la existencia de

viriones defectivos, aunque no se descarta la posibilidad de que hayan sufrido una recombinación algo distinta que la previamente descrita (Patton, 1990) que no sea detectable por el método empleado.

Las biopsias obtenidas no eran apropiadas para realizar ensayos con inmunofluorescencia a fin de detectar antígenos virales asociados a replicación, como el EA ("early antigen") y VCA ("viral capsid antigen"). Aunque esto puede deberse a la labilidad de dichas proteínas en las muestras, existe otra explicación alternativa, altamente probable. La imposibilidad de detectar los antígenos tempranos podría deberse a que sólo un pequeño porcentaje de la población celular tumoral contiene formas replicativas del EBV. Como la replicación de viriones está asociada a lisis celular, una alta fracción de células conteniendo viriones sería incompatible con el crecimiento tumoral. También es posible que la rápida destrucción de las células infectadas conduzca a la inhabilidad para detectar células conteniendo antígenos replicativos virales. En cambio, el ADN viral lineal podría persistir como fragmentos citoplasmáticos o, simplemente, ser detectado debido al uso de otras técnicas.

La presencia de dichos antígenos virales replicativos es inferida por la observación de que los pacientes con LB asociados a EBV tienen altos títulos de anticuerpos contra los mismos (anti-EA y anti-VCA) (Magrath, 1975a). Más aún, la elevación de dichos títulos precede, cronológicamente, a la presentación primaria y a la recaída del LB (Henle, 1973; Magrath, 1975b). Aunque esta observación parece contrastar con el requerimiento obligado de latencia del EBV en el desarrollo y mantenimiento del LB, estudios de cinética celular demostraron que la tasa de muerte celular en el LB africano es aproximadamente el 70% de la tasa de renovación de células, explicando la diferencia entre el tiempo de duplicación teórico y real (Iversen, 1972). Probablemente, sólo una pequeña fracción de esta muerte celular se deba a lisis celular inducida

por el EBV.

La observación descrita en este trabajo en conjunción con los datos serológicos de la literatura, sugieren que los LB EBV+ contienen una proporción pequeña y variable de células en las cuales el virus se replica. En la mayoría de los tumores, sin embargo, este proceso estaría por debajo del nivel de detección - quizás por la rápida lisis celular resultante- pero se reflejaría por los títulos aumentados de los antígenos del ciclo replicativo que están asociados con el crecimiento tumoral. A su vez, esto es consistente con observaciones previas donde el título de anticuerpos anti-EA al diagnóstico se correlaciona con el pronóstico del LB africano (Magrath, 1980).

Hay que tener en cuenta que otra alternativa que no se puede excluir es la posibilidad de que, en algunos casos, los títulos aumentados parcialmente reflejen la replicación del EBV en una población celular no neoplásica, como resultado de una inmunidad alterada en los pacientes con tumores.

Finalmente, la presencia de EBV replicativo en LB plantea la posibilidad de desarrollar terapéuticas que incrementen este proceso y así conduzcan a la regresión del tumor, como ocurre naturalmente en el adenocarcinoma de batracios inducidos por el virus de Lucke (Rafferty, 1965).

4- Mutaciones en el gen supresor p53 en SNCL:

Las mutaciones en el gen supresor p53 representan la lesión genética más común en una amplia variedad de tumores (Nigro, 1989; Hollstein, 1991). Dado que la transformación maligna de una célula surge de la acumulación de múltiples lesiones genéticas (Nowell, 1976), se sugiere que el gen p53 puede representar una anomalía genética primaria o adicional en esas neoplasias.

Recientemente se publicó un estudio que demuestra mutaciones en el gen p53 en algunas neoplasias linfoides: LB, leucemia linfoblástica aguda L, y leucemia linfocítica crónica (Gaidano, 1991). Por otra parte, se observaron interacciones regulatorias entre el p53 y el c-myc (Ronen, 1991), sugiriendo una posible participación del p53 en la patogénesis del SNCL. Por lo tanto, resultó interesante analizar la presencia de mutaciones en el gen p53 en los LB sudamericanos (Figs 16 y 17).

La frecuencia de mutaciones observada es del 37% (10/27 tumores; uno de ellos presentó dos mutaciones) (Tabla 5), coincidiendo con el estudio anteriormente mencionado (Gaidano, 1991).

El hecho de haber observado además una mutación silenciosa en el codón 213 (correspondiente al exón 6) en dos tumores (Tabla 5) hizo pensar que podría representar un polimorfismo en el gen p53. Esta idea condujo al análisis de individuos de distintas poblaciones: sudamericana, norteamericana y africana (Fig 19). Se determinó que la mutación CGA--CGG realmente es un polimorfismo y que los dos alelos posibles tienen distintas frecuencias en las distintas poblaciones, aunque uno de ellos (portador del CGA) es mucho más frecuente en los tres grupos estudiados. La frecuencia alélica más alta para el alelo portador del CGG fue encontrada en la población argentina y brasileña (10%), coincidentemente con otro trabajo simultáneo en población italiana (10,8%) (Serra, 1991). Estos datos de poblaciones latinas contrastan con aquellos observados en población anglosajona (3% del alelo CGG) y en población negro-africana (0%).

En los exones 7 y 8, comúnmente asociados a cánceres hereditarios (Srivastava, 1990; Malkin, 1990), se observaron 8 de las 11 mutaciones que causan un cambio en la proteína (Tabla 5). En 4 de los LB sudamericanos se encontraron mutaciones en los codones 245 y 248. En estos codones se han descrito mutaciones congénitas. Lamentablemente, no se pudo disponer de sangre periférica de los

pacientes para analizar si estas mutaciones son realmente constitucionales. En los 4 casos, como en la mayoría de los otros, el alelo normal también estaba presente (Figs 16 y 17). Dado que el material analizado fueron biopsias tumorales, no se puede excluir la posibilidad de que la secuencia normal provenga de células normales en la muestra. Alternativamente, la heterocigosis en estos casos de lesiones "heredables" podría representar un estadio en la progresión hacia la homocigosis y función anormal del p53. La presencia de heterocigosis en las mutaciones no heredables de las biopsias sugiere que algunos de estos cambios genéticos actúan en forma dominante. En conclusión, estos resultados sugieren que el gen p53 puede actuar como un verdadero gen supresor (es decir, las mutaciones en los dos alelos resultan en la pérdida de su función) o como un oncogen dominante (o sea, las mutaciones en un solo alelo resultan en la ganancia de una función).

Teniendo en cuenta las diferencias moleculares existentes entre los subtipos de LB, se analizó toda la información disponible sobre mutaciones en el gen p53 [los datos de este trabajo, de Gaidano, 1991 y de Farrell, 1991] en biopsias y en líneas celulares establecidas de LB (más de 70 casos) con respecto a la localización de puntos de ruptura y asociación con el EBV. La presencia o ausencia del p53 mutado en LB parece ser independiente del origen geográfico del tumor, de la ubicación de las rupturas cromosómicas y de la presencia del virus (Fig 18).

Otro aspecto importante de las mutaciones en el gen p53 es su distribución, generalmente en cuatro dominios altamente conservados (Nigro, 1989; Levine, 1991). En distintos tipos de tumores: colon, mama y pulmón, el espectro mutacional es característico (tumor-específico), lo cual, quizás, identifique diferentes dominios funcionales en los diversos tejidos (Hollstein, 1991). Por lo tanto, se consideró importante determinar el patrón para el LB y compararlo con el de los otros tumores sólidos. Para ello se consideró la información de este trabajo y de otros previos de la

literatura (Gaidano, 1991; Farrell, 1991). Como muestra la Fig 18, el 53% de las mutaciones se encuentran en la región comprendida entre los codones 213 y 248, donde se han observado muy pocas mutaciones en cancer de mama y de pulmón y sólo una pequeña fracción de las mutaciones en colocalomas. En cancer de colon, la mayoría de las mutaciones se encuentran en los codones 175, 248 y 273 (Hollstein, 1991). Es interesante que en LB el codón 213 aparezca mutado con la misma frecuencia que el codón 248. El codón 213 se encuentra dentro de la región del p53 involucrada en la unión a las proteínas del "heat shock" (Jenkins, 1988). En un resumen previo de 280 mutaciones en el p53 se reportó una sola mutación en el codón 213 en un tumor no linfoide (Hollstein, 1991), lo cual difiere significativamente de las 5/47 en LB. Dado que las mutaciones en el codón 213, que representa un dinucleótido CpG, son generalmente transiciones, es posible que su alta frecuencia mutacional en desórdenes hematológicos refleje diferencias tejido-específicas en la metilación de los sitios CpG o diferentes niveles de desaminación espontánea en las células linfoides. Por otro lado, el codón 273 está raramente mutado en LB. Esto sugiere que el espectro mutacional del p53 en LB difiere en algunos aspectos de los observados en tumores de mama, colon y pulmón.

Este patrón de mutaciones define una región del gen p53 particularmente susceptible en LB que podría determinar un dominio funcional relevante en el proceso de linfomagénesis. En este contexto, dentro de las neoplasias hematológicas el p53 se encontró más frecuentemente mutado en tumores que portan translocaciones c-myc-Igs (Gaidano, 1991, Wiman, 1991). Sin embargo, la presencia de dichas mutaciones parecería ser independiente de la existencia del c-myc desregulado, debido a que los plasmacitomas murinos raramente tienen mutaciones en este gen supresor (Gutiérrez, 1992). Sin embargo, el hecho de que el p53 participe en el bloqueo de la diferenciación de las células pre-B (Shaulsky, 1991a,b) sugiere que la presencia de mutaciones en LB y su ausencia en plasmacitomas podría deberse al distinto estadio de diferenciación de las células

transformadas. La razón de la baja frecuencia de mutaciones en otras neoplasias linfoides inmaduras, como la leucemia linfoblástica aguda (Jonveaux, 1991), todavía no se explica.

En relación a la importancia clínica, es posible que las mutaciones en el gen p53 constituyan un indicador pronóstico de progresión tumoral, particularmente para LB. Dos observaciones soportan esta posibilidad: a) la frecuencia de mutaciones en biopsias (33-37%) es inferior a la observada en líneas celulares (>70%) (Bhatia, comunicación personal) y b) las líneas celulares de LB fueron derivadas principalmente de tumores en recaída. Para evaluar esta posibilidad, se correlacionó la presencia de mutaciones en el p53 con la evolución clínica de los pacientes. Como se resume en la Tabla 6, sólo uno de los 15 enfermos que mostraron alelos normales del p53 recayó y falleció con enfermedad progresiva. En cambio, 5 de los 7 pacientes con mutaciones recayeron y 4 de ellos fallecieron en menos de 6 meses debido al tumor. Si bien el número de pacientes es bajo, estos resultados confirmarían que el p53 estaría asociado a progresión de la enfermedad en SNCL. Más aún, esta posibilidad también ha sido recientemente propuesta para linfomas no-Hodgkin de adultos (foliculares y difusos) (Ichikawa, 1992).

5- MECANISMO Y ESTADIO DE DIFERENCIACION CELULAR EN EL CUAL OCURRE LA t(8;14)

Previamente se sugirió que las translocaciones cromosómicas en el LB ocurren durante el reordenamiento de los genes de las inmunoglobulinas (reordenamiento VDJ o "switch" de clase) (Croce, 1985; Haluska, 1986, 1987; Magrath, 1990). Pero nunca se consideró que podrían ocurrir ontogénicamente antes, previo a la unión DJ_H. Por lo tanto, todavía se asume (quizás no explícitamente) que la región J_H del gen de la cadena pesada se encuentra siempre reordenada en estos linfomas. Esto se debe no sólo a que la unión

DJ_H ocurre en ambos alelos simultáneamente, sino también a que el punto de ruptura del cromosoma 14 usualmente se encuentra en o cerca de las regiones J_H o S μ (Neri, 1988; Shiramizu, 1991).

Sorprendentemente, este trabajo demuestra que el 72% de los LB informativos presentan el segmento D-J_H en configuración germinal en uno de los alelos. Incluyendo a los 20 linfomas no informativos, se puede asegurar que entre el 46% (26/56) y el 82% (46/56) de los LB presentan el reordenamiento DJ_H monoalélico (Tabla 7 y Fig 22). El hecho de que en muchos tumores se observe una sólo banda reordenada con al menos dos enzimas de restricción (y en muchos casos con tres) provee una fuerte evidencia de la presencia de una región D-J_H germinal en las células tumorales. Más aún, también se observó esta configuración germinal en una línea celular (JD38) (Fig 23) que estuvo en cultivo continuo durante varios años, excluyendo la posibilidad de que células normales contaminantes sean la causa de dicha observación.

Los resultados con respecto a la frecuencia de un segmento D-J_H germinal en LB son marcadamente diferentes de aquellos publicados para otras neoplasias B, como por ejemplo, leucemia pre-B aguda y otros linfomas no-Hodgkin (Griesser, 1989; Felix, 1990). Incluso en la leucemia linfoblástica aguda, donde otras evidencias sugieren que el clon maligno surge en proximidad al reordenamiento de Igs, ambas regiones DJ_H se encuentran casi invariablemente reordenadas (raramente ambas son germinales). Esto confirma una vez más que el mencionado reordenamiento es usualmente bialélico y enfatiza la particularidad del LB. De hecho, incluso en los plasmacitomas murinos el reordenamiento DJ_H es bialélico (Coleclough, 1981).

Esta observación tiene una serie de implicancias. Primeramente, sugiere fuertemente que en la mayoría de los LB la translocación cromosómica ocurre antes de que se produzca el reordenamiento D-J_H en el alelo que participa. Si aceptamos la

noción de que el mencionado reordenamiento en las células B ocurre simultáneamente en ambos alelos y representa el primer paso del proceso, se puede concluir que la $t(8;14)$ en LB generalmente ocurre antes de la iniciación del reordenamiento de los genes de Igs, o sea, en una célula pro-B. Probablemente, la translocación impida que la región D-J_H de ese cromosoma continúe sufriendo rearrreglos subsiguientes. Este es el caso, obviamente, cuando el punto de ruptura se encuentra entre la región D_H y la región J_H, pues estos dos segmentos se localizarán en distintos cromosomas (8q- y 14q+, respectivamente). Algunos tumores (aquellos con ruptura en el fragmento 5'EcoRI-HindIII de la Tabla 7) pertenecen a esta categoría. En aquellos linfomas en los cuales al menos una subregión J_H permanece en el mismo cromosoma que la región D_H, la unión DJ_H sería físicamente posible. Sin embargo, la separación del enhancer intrónico debido a la translocación puede ser suficiente para prevenir el reordenamiento DJ_H. En estas circunstancias, sólo los linfomas con un punto de ruptura 3' al enhancer (o sea, en S μ , C μ u otra región S) tendrían la capacidad de producir reordenamientos DJ_H subsiguientes. Esta interpretación es consistente con la observación realizada de que todos los casos con reordenamientos bialélicos tienen puntos de ruptura en la región S μ (Tabla 7). Sin embargo, algunos linfomas con rupturas en S μ presentaron un alelo en configuración germinal para la región D-J_H. Esto demuestra que es posible (al menos teóricamente) que la $t(8;14)$ ocurra siempre antes del inicio de los reordenamientos, incluso en aquellos linfomas con rupturas en S μ y rearrreglo DJ_H en ambos alelos. Esto es enteramente consistente con la demostración de Altoik (1989) que clones de la línea celular pro-B FLEB 14 tienden a sufrir translocaciones cromosómicas involucrando a la región S μ . Sin embargo, con los resultados obtenidos no se puede excluir la posibilidad de que aquellos linfomas con rupturas en S μ y reordenamientos DJ_H bialélicos representen una subclase de LB, en la cual la translocación $t(8;14)$ ocurre más tardíamente, luego de la unión DJ_H.

Obviamente, la translocación no impide el reordenamiento VDJ_H del alelo del cromosoma 14 normal, demostrado por la observación en todos los casos de (por lo menos) un alelo reordenado y por el hecho de que virtualmente todos los LB expresan Ig - IgM en el 90% (Magrath, 1990).

La teoría postulada de que la t(8;14) ocurre inmediatamente antes del reordenamiento D-J_H tiene también implicancias con respecto a la secuencia de los eventos patogénéticos del LB. Dependiendo del número de divisiones celulares que se desarrollen entre la translocación y la culminación del reordenamiento de los genes de las Igs, existe la posibilidad de que múltiples células hijas reordenen sus genes en forma diferente. Esto se puede aplicar particularmente a las cadenas livianas, que ocurren tardíamente en el orden jerárquico de eventos recombinacionales. Con este razonamiento, se puede cuestionar por qué el LB no es policlonal u oligoclonal para el locus de cadena liviana. Parece poco probable que no halla divisiones celulares entre el estadio pro-B y aquel donde ocurre el reordenamiento de las cadenas livianas (Potter, 1990). Recientemente se postuló que en humanos se producen por día 5×10^{10} linfocitos B a partir de 5×10^6 precursores y todo el proceso involucra 4 divisiones celulares (Osmond, 1991). Una explicación más probable es que se requieran otras anomalías genéticas adicionales para generar un clon maligno, y como tal, el clon tumoral provendría de sólo una célula de la progenie de la célula madre en la cual se produjo la translocación. Existen evidencias de ratones transgénicos enhancer μ -myc que necesitan otras lesiones genéticas para lograr la tumorigenicidad (Cory, 1986).

La misma explicación se puede invocar para explicar la monoclonalidad del virus de Epstein Barr en los LB asociados al mismo. Sin embargo, es aún difícil discernir si la infección viral ocurre antes o después que la translocación. Si ocurre antes, se puede concluir que el EBV y la t(8;14) juntos son insuficientes para la transformación. Es importante señalar que, a pesar de que

clásicamente se postula que el EBV infecta linfocitos B, también se describió la inmortalización de células B comprometidas, con genes de Igs todavía en configuración germinal (Hansson, 1983).

Dado que el sistema de recombinasas es falible (aproximadamente sólo 1/3 de los intentos de reordenamiento son productivos) es intrigante no encontrar LB que no expresen ninguna Ig (o ninguna cadena de Igs). [En este grupo de casos, y en otros tantos de la bibliografía, se encontró un sólo ejemplo de LB (3908), confirmado por histología y presencia de EBV monoclonal pero del cual no existe información citogenética]. Esto sugiere que la producción de Ig es un pre-requisito esencial en la génesis de un linfoma. Normalmente, las células comprometidas a diferenciación en linfocitos B que fallan en la producción de una molécula de Ig funcional son eliminadas, probablemente por apoptosis (Ales-Martínez, 1991). Por consiguiente, es factible que las células con una t(8;14) y reordenamientos abortivos de los genes de Igs, sean también eliminadas de forma similar. La inmunoglobulina de superficie sería importante para prevenir la apoptosis o por la necesidad de expansión clonal antígeno-dependiente del clon portador de la translocación para el surgimiento de un tumor. Curiosamente, unas pocas líneas celulares de LB expresan sólo cadena pesada o sólo cadena liviana, sugiriendo que el clon maligno a veces puede escapar del sistema de eliminación, si produce por lo menos una cadena de Ig. Alternativamente, algunos LB podrían sobrevivir si presentan otra anomalía genética que inhiba el mecanismo apoptótico (esto explicaría el caso del linfoma 3908).

Los resultados presentados no excluyen la posibilidad de que una pequeña fracción de células pro-B sean incapaces de reordenar ambas regiones D-J_H simultáneamente en ambos alelos. Sin embargo, como se demostró en este estudio, la gran mayoría de las líneas linfoblastoideas derivadas por inmortalización de linfocitos de sangre periférica mediante infección del EBV, están compuestas de células B fenotípicamente maduras, secretoras de Igs, en las cuales

no se pudo detectar un alelo presentando el segmento D-J_H en configuración germinal (Fig 21). Esto es cierto también para la mayoría de los clones linfocitarios pro-B o pre-B de hígado fetal (Palacios, 1992). De cualquier forma, si ocasionalmente se fracasa en el reordenamiento bialélico simultáneo, es posible que dichas células sean normalmente destruidas, y persistirían sólo en presencia de un factor inmortalizador, como por ejemplo EBV o la t(8;14). Además, la posibilidad de que ocasionalmente se generen células B con un alelo de cadena pesada de Ig germinal, no explicaría la alta frecuencia observada de segmentos D-J_H germinales en LB, a menos que el LB surja casi exclusivamente de dichas células.

Las células de Burkitt tienen un fenotipo maduro, pero esto no implica que la célula en la cual se produce la translocación tenga el mismo fenotipo. De hecho, parece probable que la translocación no tenga consecuencias hasta que la célula madura al punto en que tiene que pasar a ser una célula en reposo. Entonces, el alelo c-myc normal se silencia y el translocado no, impidiendo así el pasaje a la fase de reposo.

Se puede concluir que generalmente la translocación 8;14 en LB se produce en un estadio muy temprano de la diferenciación B, en una célula pro-B, presumiblemente debido a la conformación abierta de la cromatina en la región D-J_H-S μ durante ese período. La presencia de un punto de ruptura en S μ no indica necesariamente que la translocación ocurrió con posterioridad al reordenamiento VDJ_H. En muchos casos, sino en todos, la translocación se produce en el alelo germinal. La monoclonalidad resultaría del requerimiento de lesiones genéticas adicionales, indicando que la t(8;14) por sí misma es insuficiente (aunque necesaria) para lograr la transformación maligna. Aunque con estos resultados no se puede excluir la participación de las recombinasas en el mecanismo de las translocaciones en LB, parece improbable que resulten de un "error" durante el proceso de recombinación V-D-J_H.

CONCLUSIONES

Los resultados presentados demuestran la heterogeneidad patobiológica del SNCL. Cada región geográfica se caracteriza por un patrón particular de características clínicas, localización de los puntos de ruptura cromosómicos y asociación con el virus de Epstein-Barr. Sin embargo, en las diversas regiones se observa una mezcla de los distintos subtipos, cuya composición estaría determinada por factores ambientales y estilos de vida.

Los SNCL de Sudamérica constituyen un subtipo molecular propio, con puntos de ruptura en el cromosoma 8 en la región regulatoria del oncogen c-myc (5' inmediatamente adyacente). Por lo tanto, se asemeja al sLB en cuanto a que el c-myc está reordenado y pierde gran parte de la regulación propia. Pero, al igual que el eLB, tiende a retener los promotores P1 y P2. La asociación con el EBV es intermedia entre la descrita para el eLB y el sLB; este gradiente de asociación viral se corresponde con el nivel socioeconómico de las distintas poblaciones y, probablemente, con la incidencia y edad de infección. Contrariamente a lo propuesto, no se observó correlación alguna entre el punto de ruptura en el cromosoma 8 y la presencia del EBV. Esto apoya la hipótesis de que el virus cumple un rol en el LB aumentando el número y la sobrevivencia de las células. Por otra parte, la demostración de la existencia de ciclo replicativo en una proporción de los LB sugiere que en los LB EBV+ algunas células sufren infección lítica, lo cual explicaría el título elevado de anticuerpos anti-antígenos tempranos en los pacientes, al diagnóstico y precediendo una recaída.

Como en muchos otros tipos de cáncer, parece probable que la linfomagenesis requiera eventos genéticos adicionales. Un buen candidato es el gen supresor p53: casi el 40% de los LB sudamericanos presentan mutaciones en el mismo. Este cambio genético es independiente del subtipo molecular. Las mutaciones en el gen p53 determinan un espectro mutacional específico en el LB, que podría definir un dominio proteico (aminoácidos 213-248) relevante en los tejidos linfoides.

Para comprender los eventos patogenéticos del SNCL es importante determinar cuándo ocurre la t(8;14). Clásicamente se propuso que ocurre durante los reordenamientos fisiológicos del gen de la cadena pesada de las Igs, por errores de las recombinasas. Sin embargo, en este trabajo se demostró que la translocación 8;14 ocurre en una célula pro-B, previo al comienzo de dichos reordenamientos. Esto conduce a la conclusión de que la t(8;14) es necesaria, pero no suficiente, para la completa malignización de una célula. El requerimiento de otros cambios genéticos (como por ejemplo las mutaciones en el gen p53 y/o la presencia del EBV) explicaría, además, la indudable monoclonalidad del SNCL.

W. D. F. G. G.

J. B. G.

BIBLIOGRAFIA

- Abbas AK, Lichtman AH, Pober JS (1991). Cellular and molecular immunology. WB Saunders Co. Philadelphia. 37-97.
- Alés-Martínez JE, Cuende E, Martínez AC, Parkhouse RME, Pezzi L, Scott DW (1991). Signalling in B cells. Immunol Today 12: 201-205.
- Alt FW, Yancopoulos GD, Blackwell TK, Wood C, Thomas E, Boss M, Coffman B, Rosenberg N, Tonegawa S, Baltimore D (1984). Ordered rearrangements of immunoglobulin heavy chain variable region segments. EMBO J 3: 1209-1219.
- Alt FW, Blackwell TK, Depinho RA, Reith MG, Yancopoulos GD (1986). Regulation of genome rearrangement events during lymphocyte differentiation. Immunol Rev 89: 5-30.
- Alt FW, Blackwell TK, Yancopoulos GD (1987). Development of the primary antibody repertoire. Science 238: 1079-1087.
- Altoik E, Kein G, Zech L, Uno M, Henriksson B, Battat S, Ono Y, Ernberg I (1989). Epstein-Barr virus-transformed pro-B cells are prone to illegitimate recombination between the switch region of the mu chain gene and other chromosomes. Proc Natl Aca Sci USA 86: 6333-6337.
- Armstrong AA, Weiss LM, Gallagher A, Jones DB, Krajewski AS, Angus B, Brown G, Jack AS, Wilkins BS, Onions DE, Jarrett RF (1992). Criteria for the definition of Epstein-Barr virus association in Hodgkin's disease. Leukemia 6: 869-874.
- ar-Rushdi A, Nishikura K, rikson J, Watt R, Rovera G, Croce CM (1983). Differential expression of the translocated and untranslocated c-myc oncogene in Burkitt's lymphoma. Science 222: 390-393.
- Barriga F, Kiwanuka J, Alvarez-Mon M, Shiramizu B, Huber B, Levine P, Magrath IT (1988a). Significance of chromosome 8 breakpoint location in Burkitt's lymphoma: Correlation with geographical origin and association with Epstein-Barr virus. Curr Top Microbiol Immunol 141: 128-137.

- Battey J, Moulding C, Taub R, Murphy W, Stewart T, Potter H, Lenoir G, Leder P (1983). The human c-myc oncogene: Structural consequence of translocation into the IgH locus in Burkitt lymphoma. *Cell* 34: 779-787.
- Benjamin D, Magrath IT, Douglass EC, Corash LM (1983). Derivation of lymphoma cell lines from microscopically normal bone marrow in patients with undifferentiated lymphomas: Evidence of occult bone marrow involvement. *Blood* 61: 1017-1019.
- Benjamin D, Magrath IT, Triche TJ, Schroff RW, Jensen JP, Korsmeyer SJ (1984). Induction of plasmacytoid differentiation by phorbol ester in B-cell lymphoma cell lines bearing 8;14 translocations. *Proc Natl Aca Sci USA* 81: 3547-3551.
- Bentley DL, Groudine M (1986a). Novel promoter upstream of the human c-myc gene and regulation of c-myc expression in B-cell lymphomas. *Mol Cell Biol* 6: 3481-3489.
- Bentley DL, Groudine M (1986b). A block to elongation is largely responsible for decreased transcription of c-myc in differentiated HL60 cells. *Nature* 321: 702-706.
- Berger R, Bernheim A, Weh HJ, Flandrin G, Daniel MT, Brouet JC, Colbert N (1979). A new translocation in Burkitt's tumor cell. *Hum Genet* 53: 111-112.
- Bernheim A, Berger R, Lenoir G (1981). Cytogenetic studies on African Burkitt's lymphoma cell lines; t(8;14), t(2;8) and t(8;22) translocations. *Cancer Genet Cytogenet* 3: 307-315.
- Bishop JM (1987). The molecular genetics of cancer. *Science* 235: 305-311.
- Blackwood EM, Eisenman RN (1991). Max: a helix-loop-helix zipper protein that forms a sequence-specific DNA-binding complex with Myc. *Science* 251: 1211-1217.
- Buchman VL, Chumakov PM, Ninkina NN, Samarina OP, Georgiev GP (1988). A variation in the structure of the protein-coding region of the human p53 gene. *Gene* 70: 245-252.
- Burkitt D (1958). Sarcoma involving jaws in African children. *Br J Surg* 46: 218-225.

- Burkitt D (1962). Determining the climatic limitations of a children's cancer common in Africa. *Br Med J* 2: 1019-1023.
- Classon M, Henriksson M, Sümegi J, Klein G, Hammaskjold ML (1987). Elevated c-myc expression facilitates the replication of SV40 DNA in human lymphoma cells. *Nature* 330: 272-274.
- Coleclough C, Perry PR, Kargalainen K, Weigert M (1981). Aberrant rearrangements contributes significantly to the allelic exclusion of immunoglobulin gene expression. *Nature* 290: 372-378.
- Cory S (1986). Activation of cellular oncogenes in hematopoietic cells by chromosome translocations. *Adv Cancer Res* 47: 189-234.
- Croce CM, Shander M, Martini SJ, Cicurel L, D'Ancona GG, Dolby TW, Koprowski H (1979). Chromosomal location of the genes for human immunoglobulin heavy chains. *Proc Natl Aca Sci USA* 76: 3416-3419.
- Croce CM, Nowell PC (1985). Molecular basis of human B cell neoplasia. *Blood* 65: 1-7.
- Dalla Favera R, Gellmann EP, Martinotti S, Franchini G, Papas TS, Gallo R, Wong-Staal F (1982a). Cloning and characterization of different human sequences related to the oncogene (v-myc) of avian myelocytomatosis virus (MC29). *Proc Natl Aca Sci (USA)* 79: 6497-6501.
- Dalla Favera R, Bregni M, Erickson J, Patterson D, Gallo RC, Croce CM (1982b). Human c-myc oncogene is located on the region of chromosome 8 that is translocated in Burkitt's lymphoma cells. *Proc Natl Aca Sci USA* 79: 7824-7827.
- Dalla Favera R, Martinotti S, Gallo RC, Erickson J, Croce CN (1983). Translocation and rearrangements of the c-myc oncogene locus in human undifferentiated B-cell lymphomas. *Science* 219: 963-967.
- Davis LG, Dibner MD, Battey JF (1986). *Basic methods in molecular biology*. Elsevier Science Publishing Co, Inc. New York, New York.

- Davis M, Malcolm S, Rabbits TH (1984). Chromosome translocations can occur on either side of the c-myc oncogene in Burkitt's lymphoma cells. *Nature* 308: 286-288.
- de Thé G, Day NE, Geser A, Lavoue MF, Ho JH, Simons MJ, Sohler R, Turkei P, Vonka V, Zavadova H (1975). En: *Oncogenesis and herpesviruses. Part II.* IARC Publ, Lyon France. 3-16.
- Denis N, Kitzis A, Kruh J, Dautry F, Corcos D (1991). Stimulation of methotrexate resistance and dihydrofolate reductase gene amplification by c-myc. *Oncogene* 6: 1453-1457.
- Desgranges C, Wolf H, de-Thé G, Shanmugaratnam K, Ilouz R, Cammoun N, Klein G, zur Hausen H (1975). Nasopharyngeal carcinoma X. Presence of EpsteinBarr virus genomes in epithelial cells of tumors from high and medium-risk areas. *Int J Cancer* 16: 7-15.
- Douglass EC, Magrath IT, Lee EC, Whang-Peng J (1980). Cytogenetic studies in non-African Burkitt lymphoma. *Blood* 55: 148-155.
- Dyson PJ, Rabbits TH (1985). Chromatin structure around the c-myc gene in Burkitt lymphomas with upstream and downstream translocation points. *Proc Natl Aca Sci USA* 82: 1984-1988.
- Eick D, Polack A, Kofler E, Lenoir G, Rickinson A, Bornkamm GW (1990). Expression of P₀ and P₃-RNA from the normal and translocated c-myc allele in Burkitt's lymphoma cells. *Oncogene* 5: 1397-1402.
- Epstein MA, Achong BG, Barr YM (1964). Virus particles in cultured lymphoblasts from Burkitt's lymphoma. *Lancet* 1: 702-703.
- Erikson J, Martinis J, Croce CM (1981). Assignment of human genes for lambda immunoglobulin chain to chromosome 22. *Nature* 294: 173-175.
- Erikson J, Nishikura K, ar-Rushdi A, Finan J, Emanuel B, Lenoir G, Nowell PC, Croce CM (1983). Translocation of an immunoglobulin kappa locus to a region 3' of an unrearranged c-myc oncogene enhances c-myc transcription. *Proc Natl Aca Sci USA* 80: 7581-7585.

- Esser C, Radbruch A (1990). Immunoglobulin class switching: molecular and cellular analysis. *Ann Rev Immunol* 8: 717-735.
- Evan GI, Wyllie AH, Gilbert CS, Littlewood TD, Land H, Brooks M, Waters CM, Penn LZ, Hancock DC (1992). Induction of apoptosis in fibroblasts by c-myc protein. *Cell* 69: 119-128.
- Farrell PJ (1989). Epstein-Barr virus genome. En: *Viral Oncology II*. Klein G (Ed). Raven Press, New York. 103-132.
- Farrell PJ, Allan GJ, Shanahan F, Vousden KH, Crook T (1991). p53 is frequently mutated in Burkitt's lymphoma cell lines. *EMBO J* 10: 2879-2887.
- Feinberg A, Vogelstein B (1983). A technique for radiolabelling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Anal Biochem* 132: 6-13.
- Felix CA, Poplack DG, Reaman GH, Steinberg MS, Cole DE, Taylor BJ, Begley GC, Kirsch LR (1990). Characterization of immunoglobulin and T-cell receptor gene patterns in B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia of childhood. *J Clin Oncol* 8: 431-442.
- Gaidano G, Ballerini P, Gong J, Inghirami G, Neri A, Newcomb EW, Magrath IT, Knowles DM, Dalla-Favera R (1991). p53 mutations in human lymphoid malignancies: Association with Burkitt lymphoma and chronic lymphocytic leukemia. *Proc Natl Aca Sci (USA)* 88: 5413-5417.
- Gannon JV, Graves R, Iggo R, Lane D (1990). Activating mutations in p53 produce a common conformational effect. A monoclonal antibody specific for the mutant form. *EMBO J* 9: 1595-1602.
- Gillies SD, Morrison SL, Oi VT, Tonegawa S (1983). A tissue specific transcription enhancer element is located in the major intron of a rearranged immunoglobulin gene. *Cell* 33: 717-728.
- Graf T, Beug H (1978). Avian leukemia viruses: interaction with their target cells in vivo and in vitro. *Biochem Biophys Acta* 516: 269-299.

- Griesser M, Tkachuk D, Reis MD, Mak WT (1989). Gene rearrangements and translocations in lymphoproliferative diseases. *Blood* 73: 1402-1415.
- Gutiérrez MI, Bhatia K, Siwarski D, Wolff L, Magrath IT, Mushinski JF, Huppi K (1992). Infrequent p53 mutation in mouse tumors with deregulated myc. *Cancer Res* 52: 1032-1035.
- Haddow (1970). En Burkitt's lymphoma. DP Burkitt, DH Wright (Eds). Livingstone, Edinburgh. 198-209.
- Haluska FG, Finger S, Tsujimoto Y, Croce CM (1986). The t(8;14) chromosomal translocation occurring in B-cell malignancies results from mistakes in VDJ joining. *Nature* 324: 158-161.
- Haluska FG, Tsujimoto Y, Croce CM (1987). The t(8;14) translocation of the Daudi endemic Burkitt's lymphoma occurred during immunoglobulin gene rearrangement and involved the D_H region. *Proc Natl Aca Sci USA* 84: 6835-6839.
- Hamlyn PH, Rabbits TH (1983). Translocation joins c-myc and immunoglobulin gamma 1 genes in a Burkitt lymphoma revealing a third exon in the c-myc oncogene. *Nature* 304: 135-139.
- Hann SR, King MW, Bentley DL, Anderson CW, Eisenman RN (1988). A non-AUG translocational initiation in c-myc exon-1 generates an N-terminally distinct protein whose synthesis is disrupted in Burkitt's lymphomas. *Cell* 52: 185-195.
- Hansson M, Falk K, Ernberg I (1983). Epstein-Barr virus transformation of human pre-B cells. *J Exp Med* 158: 616-622.
- Harris AW, Langdon WY, Alexander WS, Hariharan IK, Rosenbaum H, Vaux D, Webb E, Bernard O, Crawford M, Abud H, Adams H, Adams JM, Cory S (1988). *Curr Top Microbiol Immunol* 141: 82-93.
- Hay N, Bishop JM, Levens D (1987). Regulatory elements that modulate expression of human c-myc. *Genes & Dev* 1: 659-671.
- Hecht F (1984). Autosomal fragile sites and cancer. *Am J Hum Genet* 36: 718-720.
- Henderson S, Rowe M, Gregory G, Croom-Carter D, Wang F, Kieff E, Rickinson A (1991). Induction of bcl-2 expression by EBV latent membrane protein 1 protects infected B cells from programmed cell death. *Cell* 65: 1-20.

- Henglein B, Synovzik H, Groitl P, Bornkamm GW, Hartl P, Lipp M (1989). Three breakpoints of variant t(2;8) translocation in Burkitt's lymphoma cell fall within a region 140 Kb distal from c-myc. *Mol Cell Biol* 9: 2105-2113.
- Henle G, Henle W, Diehl (1968). Relation of Burkitt's tumor associated herpes-type virus to infectious mononucleosis. *Proc Natl Aca Sci USA* 59: 94-101.
- Henle G, Henle W (1967a). Antibodies to Epstein-Barr virus in Burkitt's lymphoma and control groups. *J Natl cancer Inst* 43: 1147-1157.
- Henle W, Diehl V, Kohn G, zur Hausen H, Henle G (1967b). Herpes-type virus and chromosome marker in normal leukocytes after growth with irradiated Burkitt cells. *Science* 157: 1064-1065.
- Henle W, Henle G, Gunven P (1973). Patterns of antibodies to Epstein-Barr virus induced early antigens in Burkitt's lymphoma. Comparison of dying patients with long term survivors. *J Natl Cancer Inst* 50: 1163-1173.
- Henle W, Henle G (1979). Seroepidmiology of the virus. En: *The Epstein Barr virus*. Epstein MA, Achong BG (Eds). Springer-Verlag, New York. 61-78.
- Hinds P, Finlay C, Lvine AJ (1989). Mutation is required to activate the p53 gene for cooperation with the ras oncogene and transformation. *J Virol* 63: 739-746.
- Hinds PW, Finlay CA, Quartin RS, Baker SJ, Fearon ER, Vogelstein B, Levine AJ (1990). Mutant p53 DNA clones from human colon carcinomas cooperate with ras in transfroming primary rat cells: a comparison of the "hot spot" mutant phenotypes. *Cell Growth Differ* 1: 571-580.
- Hollis GF, Mitchell KF, Battey J, Potter H, Taub R, Lenoir GM, Leder P (1984). A variant translocation places the lambda immunoglobulin genes 3' to the c-myc oncogene in Burkitt's lymphoma. *Nature* 307: 752-755.
- Hollstein M, Sidransky D, Vogelstein B, Harris CC (1991). p53 mutations in human cancers. *Science* 253: 49-53.

- Ichikawa A, Hotta T, Takagi N, Tsushita K, Kinoshita T, Nagai H, Murakami Y, Hayashi K, Saito H (1992). Mutations of p53 and their relation to disease progression in B-cell lymphoma. *Blood* 79: 2701-2707.
- Iversen U, Iversen OH, Bluming AZ, Ziegler JL, Kyalwasi S (1972). Cell kinetics of african cases of Burkitt's lymphoma. *Eur J Cancer* 8: 305-308.
- Isobe M, Emanuel BS, Givol D, Oren M, Croce CM (1986). Localization of gene for human p53 tumor antigen to band 17p13. *Nature* 320: 84-85.
- Jenkins JR, Chumakov P, Addison C, Sturzbecher HW, Wade-Evans A (1988). Two distinct regions of the murine p53 primary aminoacid sequence are implicated in stable complex formation with simian virus 40 T antigen. *J Virol* 62: 3903-3906.
- Jones JF, Shurin S, Abramowsky C, Tubbs RR, Sciotto CG, Wahl R, Sands J, Gottman D, Katz BZ, Sklar J (1988). T-cell lymphomas containing Epstein-Barr viral DNA in patients with chronic Epstein-Barr virus infections. *N Engl J Med* 318: 733-741.
- Jonveaux P, Berger R (1991). Infrequent mutations in the p53 gene in primary human T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia* 5: 834-840.
- Kelly K, Siebenlist U (1986). The regulation and expression of c-myc in normal and malignant cells. *Annu Rev Immunol* 4: 317-338.
- Kieff E, Liebowitz D (1990). Epstein Barr virus and its replication. En: *Virology*. 2nd Edition. Fields BN, Knipe DM (Eds). Raven Press Ltd, New York. 1889-1920.
- Kintner CR, Sugden B (1979). The structure of the termini of the DNA of Epstein Barr virus. *Cell* 17: 661-671.
- Kintner C, Sugden B (1981). Conservation and progressive methylation of Epstein-Barr virus DNA sequences in transformed cells. *J Virol* 38: 305-316.
- Kinzler KW, Nilbert MC, Vogelstein B (1991). Identification of a chromosome 5q21 gene that is mutated in colorectal cancer. *Science* 251: 1366-1370.

- Kirchner H, Tosato G, Blaese RM, Broder S, Magrath IT (1979). Polyclonal immunoglobulin secretion by human B lymphocytes exposed to Epstein-Barr virus in vitro. *J Immunol* 122: 1310-1313.
- Kiwanuka J, Shiramizu B, Sandlund T, Barriga F, McManaway M, Novikous L, Huber B, Magrath IT (1988). The contribution of Burkitt's lymphoma cell lines to the understanding of the pathogenesis of Burkitt's lymphoma. *Cancer Rev* 10: 63-91.
- Klein G, Klein E (1984). Oncogene activation and tumor progression. *Carcinogenesis* 5: 429-435.
- Knudson AG (1985). Hereditary cancer, oncogenes and antioncogenes. *Cancer Res* 45: 1437-1443.
- Kurtzberg J, Graham ML (1991). Non-Hodgkin's lymphoma. Biologic classification and implication for therapy. En: *The Pediatric Clinics of North America. Solid tumors in children*. Horowitz M, Pizzo P (Eds). WB Saunders Co, Philadelphia. Vol 38 (2): 443-456.
- Land H, Parada LF, Weinberg RA (1983). Cellular oncogenes and multistep carcinogenesis. *Science* 222: 771-778.
- Landschulz WH, Johnsson PF, McKnight SL (1988). The leucine zipper: a hypothetical structure common to a new class of DNA binding proteins. *Science* 240: 1759-1764.
- Lavigueur A, Maltby V, Mock D, Rossant J, Pawson T, Bernstein A (1989). High incidence of lung, bone and lymphoid tumors in transgenic mice overexpressing mutant alleles of the p53 oncogene. *Mol Cell Biol* 9: 3982-3991.
- Lebeau MM (1986). Chromosomal fragile sites and cancer-specific rearrangements. *Blood* 67: 849-858.
- Leder P, Battey J, Lenoir G, Moulding C, Murphy W, Potter H, Stewart T, Taub R (1983). Translocations among antibody genes in human cancer. *Science* 222: 765-771.
- Lenoir G, Preud'homme JL, Bernheim A, Berger T (1982). Correlation between immunoglobulin light chain expression and variant translocations in Burkitt's lymphoma. *Nature* 298: 474-476.

- Levine PH, Kamaraja LS, Conelly RR, Berard CW, Dorfman RF, Magrath IT, Eston JM (1982). The American Burkitt's lymphoma registry: eight years' experience. *Cancer* 49: 1016-1022.
- Levine AJ, Momand J (1990). Tumor suppressor genes: the p53 and retinoblastoma sensitivity genes and gene products. *Biochimica et Biophysica Acta* 1032: 119-136.
- Levine AJ, Momand J, Finlay C (1991). The p53 tumor suppressor gene. *Nature* 351: 453-456.
- Levine AJ (1992). The p53 tumor-suppressor gene. *N Engl J Med* 326: 1350-1352.
- Lieber MR, Hesse JE, Mizuuchi K, Gellert M (1988). Lymphoid V(D)J recombination: Nucleotide insertion at signal joints as well as coding joints. *Proc Natl Aca Sci USA* 85: 8588-8592.
- Magrath IT, Henle W, Owor R, Olweny C (1975a). Antibodies to Epstein-Barr virus antigens before and after the development of Burkitt's lymphoma in a patient treated for Hodgkin's disease. *N Engl J Med* 292: 621-623.
- Magrath IT, Henle W (1975b). Changes in antibodies to Epstein-Barr virus associated antigens with the development of Burkitt's lymphoma. In: *Oncogenesis and Herpesviruses II*. de-Thé G, Epstein MA, zur Hausen H (Eds.). IARC Scientific Publications, Lyon, France. p 275-281.
- Magrath IT, Lee YJ, Anderson T, Henle W, Zeigler J, Simon R, Schein P (1980). Prognostic factors in Burkitt's lymphoma. Importance of total tumor burden. *Cancer* 45: 1507-1515.
- Magrath IT (1983). Burkitt's lymphoma: Clinical aspects and treatment. En: *Diseases of the lymphatic system: Diagnosis and therapy*. DW Mollander (Ed). Springer-Verlag, New York. 103-139.
- Magrath IT (1986). Burkitt's lymphoma as a human tumor model; new concepts in etiology and pathogenesis. En: *Pediatric Hematology/Oncology Reviews*. C Pochedly (Ed). Praeger, Westport, Connecticut. 1-51.

- Magrath IT (1989). Malignant non-Hodgkin's lymphomas. En: Principles and Practice of Pediatric Oncology. P Pizzo, D Poplack (Eds). JB Lippincott Co, Philadelphia. 415-455.
- Magrath IT (1990). The pathogenesis of Burkitt's lymphoma. Adv Cancer Res 55: 133-270.
- Magrath IT (1991). African Burkitt's lymphoma. History, biology, clinical features and treatment. Am J Ped Hem Oncol 13: 222-246.
- Magrath IT, Jain V, Bhatia K (1993). Epstein Barr virus and Burkitt's lymphoma. En prensa.
- Malcolm S, Barton P, Bentley PL (1981). Assignment of a V kappa locus for immunoglobulin light chain to the short arm of chromosome 2 (2cen to 2p13). Human Gene Mapping Conference VI. White Plains, New York.
- Malkin D, Li FP, Strong LC, Fraumeni JF, Nelson CE, KimDH, Kassel J, Gryka MA, Bischoff FZ, Tainsky MA, Friend SH (1990). Germ line p53 mutations in a familial syndrome of breast cancer, sarcomas and other neoplasms. Science 250: 1233-1238.
- Maniatis T, Fritsch EF, Sambrook J (1989). Molecular cloning: A laboratory manual. 2nd Edition. Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York.
- Manolov G, Manolova Y (1972). Marker band in one chromosome 14 from Burkitt's lymphomas. Nature 237: 33-34.
- Michalovitz D, Halevy O, Oren M (1991). p53 mutations: Gains or losses? J Cell Biochem 45: 22-29.
- Miller G, Rabson M, Heston L (1984). EBV with heterogeneous DNA disrupts latency. J Virol 50: 174-182.
- Miyoshi I, Hiraki S, Kimura I, Miyamoto K, Sato J (1979). 2/8 Translocation in a Japanese Burkitt's lymphoma. Experientia 35: 742-743.
- Neri A, Barriga F, Knowles DM, Magrath IT, Dalla-Favera R (1988). Different regions of the immunoglobulin heavy-chain locus are involved in chromosomal translocations in distinct pathogenetic forms of Burkitt lymphoma. Proc Natl Aca Sci USA 85: 2748-2752.

- Neri A, Barriga F, Inghirami G, Knowles DM, Neequaye J, Magrath IT, Dalla-Favera R (1991). Epstein-Barr virus infection precedes clonal expansion in Burkitt's and acquired immunodeficiency syndrome-associated lymphomas. *Blood* 77: 1092-1095.
- Nigro JM, Baker S, Preisinger A, Jessup JM, Hostetter R, Cleary K, Bigner SH, Davidson N, Baylin S, Devilee P, Glover T, Collins FS, Weston A, Modali R, Harris CC, Vogelstein B (1989). Mutations in the p53 gene occur in diverse human tumour types. *Nature* 342: 705-708.
- Nishikura K, ar-Rushdi A, Erikson J, Watt R, Rovera G, Croce CM (1983). Differential expression of the normal and of the translocated human c-myc oncogene in B cells. *Proc Natl Aca Sci USA* 80: 4822-4826.
- Nowell P (1976). The clonal evolution of tumor cell populations. *Science* 194: 23-28.
- O'Connor G, Davies JNP (1960). Malignant tumors in African children. *J Pediatr* 56: 526-535.
- O'Connor G, Rappaport H, Smith EB (1965). Childhood lymphoma resembling Burkitt's lymphoma in the US. *Cancer* 18: 411-417.
- Orita M, Iwahana H, Kanazawa H, Hayashi K, Sekiya T (1989a). Detection of polymorphisms of human DNA by gel electrophoresis as single strand conformation polymorphisms. *Proc Natl Aca Sci (USA)* 86: 2766-2770.
- Orita M, Suzuki Y, Sekiya T, Hayashi K (1989b). Rapid and sensitive detection of point mutations and DNA polymorphisms using Polymerase Chain Reaction. *Genomics* 5: 874-879.
- Osmond DG, Priddle S, Rico-Vargas S (1990). Proliferation of B cell precursors in bone marrow of pristane-conditioned and malaria infected mice: implications for B cell oncogenesis. *Curr Top Microbiol Immunol* 166: 149-157.
- Osmond DG (1991). Proliferation kinetics and the lifespan of B cells in central and peripheral lymphoid organs. *Curr Opin Immunol* 3: 179-185.

- Palacios R, Samaridis J (1992). Fetal liver pro-B and pre-B lymphocyte clones: Expression of lymphoid-specific genes, surface markers, growth requirements, colonization of the bone marrow and generation of B lymphocyte in vivo and in vitro. *Mol Cell Biol* 12: 518-530.
- Pallesen G, Hamilton-Dutoit SJ, Rowe M, Young LS (1991a). Expression of Epstein Barr virus latent gene products in tumor cells of Hodgkin's disease. *Lancet* 337: 320-322.
- Pallesen G, Sandvej K, Hamilton-Dutoit SJ, Rowe M, Young LS (1991b). Activation of EBV replication in Hodgkin and Reed-Sternberg cells. *Blood* 78: 1162-1165.
- Pallesen G, Hamilton-Dutoit SJ, Rowe M, Lisse I, Ralfkiaer, Sandvej K, Young LS (1991c). Expression of Epstein-Barr virus replicative proteins in AIDS-related non-Hodgkin's lymphoma cells. *J Pathol* 165: 289-299.
- Patton DF, Shirley P, Raab-Traub N, Resnick L, Sixby JW (1990). Defective viral DNA in EBV-associated oral hairy leukoplakia. *J Virol* 64: 397-400.
- Pellici PG, Knowles DM, Magrath IT, Dalla Favera R (1986). Chromosomal breakpoints and structural alterations of the c-myc locus differ in endemic and sporadic forms of Burkitt's lymphoma. *Proc Natl Aca Sci USA* 83: 2984-2988.
- Potter M (1990). Neoplastic development in B-lymphocytes. *Carcinogenesis* 11: 1-13.
- Prokocimer M, Shaklai M, Ben Bassat H, Wolf D, Goldfinger N, Rotter V (1986). Expression of p53 in human leukemia and lymphoma. *Blood* 68: 113-118.
- Purtilo DT (1987). Epstein-Barr virus: The spectrum of its manifestations in human beings. *South Med J* 80: 943-947.
- Raab Traub N, Flynn K (1986). The structure of the termini of the Epstein Barr virus as a marker of clonal proliferation. *Cell* 47: 883-889.

- Rabbits PH, Watson JV, Lamond A, Forster A, Stinson MA, Evan G, Fischer W, Atherton E, Sheppard R, Rabbits TH (1985). Metabolism of c-myc gene products: c-myc mRNA and protein expression in the cell cycle. *EMBO J* 4: 2009-2015.
- Rabbits TH (1991). Translocations, master genes, and differences between the origins of acute and chronic leukemias. *Cell* 67: 641-644.
- Rafferty KA (1965). The cultivation of inclusion-associated viruses from Lucke tumor frogs. *Ann N Y Acad Sci* 126: 3-21.
- Rappaport H, Braylan RC (1975). Changing concepts in the classification of malignant neoplasms of the hemopoietic system. *International Acad of Pathology Monogr* 16: 1-19.
- Ronen D, Rotter V, Reisman D (1991). Expression from the murine p53 promoter is mediated by factor binding to a downstream helix-loop-helix recognition motif. *Proc Natl Aca Sci (USA)* 88: 5413-5417.
- Rosenberg SA, Berard CW, Brown BW, Burke J, Dorfman RF, Glatstein E, Happe RT, Simon R, et al (1982). National Cancer Institute sponsored study of classifications on non-Hodgkin's lymphomas: Summary and description of a working formulation for clinical usage. The non-Hodgkin's lymphomas classification project. *Cancer* 49: 2112-2135.
- Rowe DT, Rowe M, Evan GI, Wallace LE, Farrell PJ, Rickinson AB (1986). Restricted expression of EBV latent genes and T-lymphocyte-detected membrane antigen in Burkitt's lymphomas cells. *EMBO J* 5: 2599-2607.
- Rowe M, Rowe DT, Gregory CD, Young LS, Farrell PJ, Rupani H, Rickinson AB (1987). Differences in B cell phenotype reflect novel patterns of BV latent gene expression in Burkitt's lymphoma cells. *EMBO J* 6: 2743-2751.
- Rowley JD (1984). Consistent chromosomal aberrations and oncogenes in human tumors. An overview. *Cancer Surveys* 3: 355-357.

- Sandberg AA (1990). Lymphoproliferative disorders. En: The chromosomes in human cancer and leukemia. 2nd Edition. Elsevier Science Publishing Co, Inc. New York. p 625-751.
- Serra A, Gaidano GL, Revello D, Guerrasio A, Ballerini P, Dalla-Favera R, Saglio G (1991). A new TaqI polymorphism in the p53 gene. *Nucleic Acid Res* 20: 928.
- Seth A, Alvarez , Gupta S, Davis RJ (1991). A phosphorylation site located in the NH₂-terminal domain of c-Myc increases transactivation of gene expression. *J Biol Chem* 266: 23521-23524.
- Shaulsky G, Goldfinger N, Rotter V (1991a). Alterations in tumor development in vivo mediated by expression of wild type or mutant p53 proteins. *Cancer Res* 51: 5232-5237.
- Shaulsky G, Goldfinger N, Peled A, Rotter V (1991b). Involvement of wild type p53 in pre-B-cell differentiation in vitro. *Proc Natl Aca Sci USA* 88: 8982-8986.
- Shi Y, Glynn JM, Guilbert LJ, Cotter TG, Bissonnette RP, Green DR (1992). Role for c-myc in activation-induced apoptotic cell death in T cell hybridomas. *Science* 257: 212-214.
- Shiramizu B, Barriga F, Neequaye J, Jafri A, Dalla Favera R, Neri A, Gutiérrez MI, Levine P, Magrath IT (1991). Patterns of chromosomal breakpoint locations in Burkitt's lymphoma: Relevance to geography and Epstein Barr virus association. *Blood* 77: 1516-1526.
- Showe L, Ballantine M, Erikson J, Kaji H, Croce CM (1985). Cloning and sequencing of a c-myc oncogene in Burkitt's lymphoma cell line that is translocated to a germline alpha switch region. *Mol Cell Biol* 5: 501-509.
- Siebenlist U, Bressler P, Kelly K (1988). Transcriptional regulation of c-myc. *Mol Cell Biol* 8: 867-873.
- Southern EM (1975). Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J Biol Chem* 98: 503-517.

- Srivastava S, Zou Z, Pirollo K, Blattner W, Chang EH (1990). Germ-line transmission of a mutated p53 gene in a cancer-prone family with Li-Fraumeni syndrome. *Nature* 348: 747-749.
- Szajnert MF, Saule S, Bornkamm GW, Wajcman H, Lenoir GM, Kaplan JC (1987). Clustered somatic mutations in and around first exon of non-rearranged c-myc in Burkitt's lymphoma with t(8;22) translocation. *Nucleic Acid Res* 15: 4553-4564.
- Taub R, Kirsch I, Morton C, Lenoir G, Swan D, Tronick S, Aaronson S, Leder P (1982). Translocation of the c-myc gene into the immunoglobulin heavy chain locus in human Burkitt's lymphoma and murine plasmacytoma cells. *Proc Natl Aca Sci USA* 79: 7837-7841.
- Tonegawa S (1983). Somatic generation of antibody diversity. *Nature* 302: 575-581.
- Tsujimoto Y, Gorhan J, Cossman J, Jaffe E, Croce CM (1985). The t(14;18) chromosome translocation involved in B cell neoplasms results from mistakes in VDJ joining. *Science* 229: 1390-1392.
- Tsujimoto Y, Jaffe E, Cossman J, Gorhan J, Nowell PC, Croce CM (1986). Clustering of breakpoints on chromosome 11 in human B-cell neoplasms with the t(11;14) chromosome translocation. *Nature* 315: 340-343.
- Visvader J, Begley CG (1991). Helix-loop-helix genes translocated in lymphoid leukemia. *TIBS*: 330-333.
- Vogelstein B (1991). Genetic alterations in colorectal tumors. *ADV Oncology* 7: 3-6.
- Watt R, Stanton LW, Marcu KB, Gallo R, Croce CM, Rovera G (1983). Nucleotide sequence of cloned c-DNA of human c-myc oncogene. *Nature* 303: 725-728.
- Weigel R, Miller G (1983). Major EB virus specific cytoplasmic transcripts in a cellular clone of the HR-1 Burkitt lymphoma line during latency and after induction of viral replicative cycle by phorbol esters. *Virology* 125: 287-298.
- Weinberg RA (1991). Tumor suppressor genes. *Science* 254: 1138-1146.

- Wiman KG, Magnusson P, Ramqvist T, Klein G (1991). Mutant p53 detected in a majority of Burkitt's lymphoma cell lines by monoclonal antibody Pab240. *Oncogene* 6: 1633-1639.
- Yancopoulos GD, Alt FW (1986). Regulation of the assembly and expression of variable-region genes. *Ann Rev Immunol* 4: 339-368.
- Yang J, Bauer SR, Mushinski JF, Marcu KB (1985). Chromosome translocations clustered 5' of the murine c-myc gene qualitatively affect promoter usage: implications for the site of normal c-myc regulation. *EMBO J* 4: 1441-1447.
- Yates J, Warren N, Reisman D, Sugden B (1984). A cis acting element from the Epstein Barr viral genome that permits stable replication of recombinant plasmids in latently infected cells. *Proc Natl Aca Sci USA* 81: 3806-3810.
- Yunis JJ (1983). The chromosomal basis of human neoplasias. *Science* 221: 227-236.
- Zajac-Kaye M, Avigan M, Takimoto M, Pittaluga S, Quinn J, Gelmann E, Levens D (1988). Multifactorial regulation of the human c-myc oncogene. *Curr Top Microbiol Immunol* 141: 247-252.
- Zech L, Haglund U, Nilsson K, Klein G (1976). Characteristic chromosomal abnormalities in biopsies and lymphoid-cell lines from patients with Burkitt and non-Burkitt lymphoma. *Int J Cancer* 17: 47-56.