



# Técnicas de inmunohistoquímica

## VIRUS DE EPSTEIN-BARR: PROTEÍNA LATENTE DE MEMBRANA (LMP1). REVISIÓN DEL ESTUDIO INMUNOHISTOQUÍMICO

A. Panizo

*Unidad de Inmunohistoquímica, Clínica Universitaria, Universidad de Navarra, Pamplona.*

El virus de Epstein-Barr (EBV) es un herpes virus constituido por un genoma de 172 kb. Un factor viral que parece desempeñar un papel destacado en la carcinogénesis es la proteína latente de membrana 1 (LMP1). Estudios *in vitro* han demostrado cómo LMP1 confiere capacidad tumoral e inhibe la diferenciación en cultivos de queratinocitos (1, 2). Sin embargo, el papel de LMP1 en la carcinogénesis viral *in vivo* no está tan claro.

LMP1 es una de las varias proteínas virales expresadas con frecuencia en carcinomas nasofaríngeos, enfermedad de Hodgkin y enfermedad linfoproliferativa asociada al EBV. Más aún, esta proteína viral se ha asociado a la capacidad del EBV de alterar el crecimiento celular (3). *In vitro*, LMP1 es esencial para la transformación de linfocitos B en líneas celulares linfoblastoides mediada por el EBV, e induce muchos de los signos de activación en linfocitos B asociados con la infección por EBV, tales como expresión de CD23, CD11a, CD18, CD58 e ICAM-1 (4). LMP1 posee también efectos transformantes en fibroblastos de líneas celulares, eliminando la inhibición del crecimiento celular por contacto y aumentando la capacidad de las células de crecer sin unirse a un sustrato (1). En ratones transgénicos la expresión de LMP1 en la piel origina hipertrofia epidérmica, y en cultivos de células epiteliales humanas LMP1 inhibe la diferenciación e incrementa la expresión de receptores para el factor de crecimiento epidérmico (EGF) (5). Por tanto, esta proteína viral puede afectar al crecimiento de varios tipos celulares.

LMP1 es una proteína viral localizada en la membrana de la célula infectada y asociada con componentes del citoesqueleto celular, como la vimentina (6). Recientemente se ha demostrado que la porción citoplasmática de LMP1 interactúa con un factor asociado al factor de necrosis tumoral (TRAF-3), originando de esta forma constantemente señales de crecimiento para la célula (7).

Las líneas celulares linfoides inmortalizadas por el EBV expresan nueve proteínas: seis antígenos nucleares (EBNA-1, 2, 3A, 3B, 3C y LP) y tres proteínas de membrana (proteínas latentes de membrana: LMP1, LMP2A y LMP2B). Los antígenos nucleares se transcriben en dirección derecha comenzando desde uno o dos promotores localizados en el fragmento BamHI-C (Cp) o desde un promotor localizado en el fragmento BamHI-W (Wp). Por el contrario, los RNA de LMP se transcriben en dirección izquierda comenzando desde diferentes promotores en la región BamHI-N del genoma del EBV (8).

Para demostrar la asociación del EBV con diferentes neoplasias se debe detectar el virus en las células tumorales y no en las células inflamatorias que rodean al tumor (linfocitos B). Como el EBV está prácticamente omnipresente en los adultos, los estudios serológicos tienen una utilidad muy limitada a la hora de demostrar una asociación específica entre el EBV y la neoplasia. La interpretación de los datos obtenidos de técnicas que emplean un homogeneizado del tejido tumoral es también limitada, ya que puede haber contaminación del tejido tumoral con linfocitos B no tumorales con infección latente por el EBV. Estas técnicas no permiten localizar el genoma viral en un determinado tipo celular (9).

La detección *in situ* de la infección por EBV mediante técnicas de inmunohistoquímica está limitada exclusivamente por la disponibilidad de anticuerpos monoclonales para el uso rutinario sobre material incluido en parafina. Actualmente se han desarrollado diferentes anticuerpos frente a LMP1 (10), EBNA-2 (11) y ZEBRA (12), que son muy útiles para la demostración de la mayor parte de las infecciones por EBV.

Diferentes laboratorios han comercializado anticuerpos frente a la proteína LMP1. Estos anticuerpos son un cóctel de los clones CS1, CS2, CS3 y CS4, que es útil tanto en material congelado como en material fijado en formol o Bouin e incluido en parafina. La dilución recomendada para su utilización es de 1:200. Es necesario realizar técnicas de recuperación antigénica mediante microondas durante 10 minutos en *buffer* citrato 10 mmol/l a pH 6,0 o mediante incubación del tejido con tripsina durante 10 minutos a 37 °C. Las casas comerciales recomiendan como controles positivos los ganglios linfáticos con enfermedad de Hodgkin. Con este anticuerpo vamos a obtener inmunorreactividad granular citoplasmática y de membrana en las células con infección latente por EBV. La fijación del tejido con alcohol (etanol al 95%) elimina la inmunorreactividad para LMP1, por lo que puede dar lugar a su interpretación como falso negativo (13).

Mediante técnicas de inmunohistoquímica con anticuerpos frente a LMP1 se ha descrito presencia del EBV en:

- Linfoma de Burkitt: Los casos de linfoma de Burkitt endémico y no endémico presentan un patrón de infección latente por EBV de tipo I, con expresión restringida a EBNA-1, EBER-1 y EBER-2. Recientemente se ha descrito la presencia de la proteína LMP1 en una serie de linfoma de Burkitt de Brasil (14).
- Enfermedad de Hodgkin: Los diferentes estudios inmunohistoquímicos han percibido inmunorreactividad para LMP1 restringida a células de Hodgkin y células de Reed-Sternberg (15) en un 40% a 80% de los casos, mientras que los linfocitos acompañantes son constantemente negativos. La inmunorreactividad para LMP1 es más frecuente en la enfermedad de Hodgkin tipo celularidad mixta (72%) que en los otros tipos histológicos (16).
- Enfermedad linfoproliferativa postrasplante (17).
- Linfomas no hodgkinianos B no asociados a inmunodeficiencia: En la serie de Hummel (18) se detectó LMP1 en el 26% de los casos, aunque no existía correlación entre el tipo de linfoma y la infección viral, excepto que el porcentaje de LMP1 en leucemias linfoides crónicas (7,7%) y plasmocitomas (6,7%) era considerablemente menor que en otros tipos de linfoma, donde los porcentajes oscilaban entre el 17,9% y el 37,5%. Los linfomas no hodgkinianos B asociados al EBV muestran un patrón de latencia tipo II, con expresión de LMP1 y EBNA-1 y ausencia de inmunorreactividad para EBNA-2.
- Linfomas no hodgkinianos T: Mediante inmunohistoquímica con anticuerpos frente a LMP1 se ha observado inmunorreactividad en el 41% de los casos estudiados (19, 20).
- Carcinoma nasofaríngeo indiferenciado: La mayor parte de estos tumores presentan un patrón de infección latente tipo II, con expresión de LMP1, EBER y EBNA-1 (13, 21).
- Carcinoma linfoepitelioma-like de estómago y pulmón: Solamente existen 7 casos en la literatura en los que se analiza mediante inmunohistoquímica la presencia de LMP1 en el estómago. En ninguno de ellos se observó inmunorreactividad para LMP1 (22, 23). En la literatura no hay información sobre la presencia o ausencia de proteínas virales en los carcinomas linfoepitelioma-like de pulmón, aunque se ha estudiado la presencia del EBV mediante técnicas de hibridación *in situ*.
- Carcinoma linfoepitelioma-like de vejiga: En la literatura hay recogidos 11 casos con estudios moleculares y de inmunohistoquímica. En ninguno de ellos se han podido localizar proteínas o genoma viral. Sin embargo, en un caso que estu-

diamos hemos podido observar presencia de LMP1 (mediante inmunohistoquímica) y RNA viral EBV (mediante hibridación *in situ*).

- Leiomiomas en pacientes inmunodeprimidos: En la serie de 3 casos descrita por Lee y cols. (24) uno de los tumores localizados en retroperitoneo mostró inmunorreactividad para LMP1. Sin embargo, en la mayoría de las series estudiadas se comprueba la presencia del EBV aunque sin expresión de LMP1 (24, 25).

De todas maneras, según algunos trabajos, la técnica de detección de LMP1 mediante inmunohistoquímica es poco sensible ya que identifica exclusivamente aquellas células con gran concentración de LMP1 en su citoplasma (13). Otro trabajo ha comparado los resultados según el tipo de fijación del tejido, concluyendo que la fijación en formol e inclusión en parafina da lugar a frecuentes falsos negativos al compararla con cortes por congelación (26).

## BIBLIOGRAFÍA

1. Wang, D., Liebowitz, D., Kieff, E. *An EBV membrane protein expressed in immortalized lymphocytes transforms established rodent cells*. Cell 1985; 43: 831-840.
2. Li, Q.X., Young, L.S., Niedobitek, G. y cols. *Epstein-Barr virus infection and replication in human epithelial cell system*. Nature 1992; 356: 347-350.
3. Kieff, E. *Epstein-Barr virus: Increasing evidence of a link to carcinoma*. N Engl J Med 1995; 333: 724-726.
4. Wang, F., Gregory, C., Sample, C., Rowe, M., Liebowitz, D., Murray, R., Rickinson, A., Kieff, E. *Epstein-Barr virus latent membrane protein (LMP1) and nuclear proteins 2 and 3C are effectors of phenotypic changes in B lymphocytes: EBNA-2 and LMP1 cooperatively induce CD23*. J Virol 1990; 64: 2309-2318.
5. Miller, W.E., Earp, H.S., Raab Traub, N. *The Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 induces expression of the epidermal growth factor receptor*. J Virol 1995; 69: 4390-4398.
6. Liebowitz, D., Kopan, R., Fuchs, E., Sample, J., Kieff, E. *An Epstein-Barr virus transforming protein associated with vimentin in lymphocytes*. Mol Cell Biol 1987; 7: 2299-2308.
7. Mosialos, G., Birkenbach, M., Yalamanchili, R., VanArsdale, T., Ware, C., Kieff, E. *The Epstein-Barr virus transforming protein LMP1 engages signaling proteins for the tumor necrosis factor receptor family*. Cell 1995; 80: 389-399.
8. Woisetschlaeger, M., Yandava, C.N., Furmanski, L.A., Strominger, J.L., Speck, S.H. *Promoter switching in Epstein-Barr virus during the initial stages of infection of B lymphocytes*. Proc Natl Acad Sci USA 1990; 87: 1725-1729.
9. Iezzoni, J.C., Gaffey, M.J., Weiss, L.M. *The role of Epstein-Barr virus in lymphoepithelioma-like carcinomas*. Am J Clin Pathol 1995; 103: 308-315.
10. Rowe, M., Evans, H.S., Young, L.S., Hennessy, K., Kieff, E., Rickinson, A.B. *Monoclonal antibodies to the latent membrane protein of Epstein-Barr virus reveal heterogeneity of the protein and inducible expression in virus-transformed cells*. J Gen Virol 1987; 68: 1575-1586.
11. Young, L., Alfieri, C., Hennessy, K., Evans, H., O'Hara, C., Anderson, K.C., Ritz, J., Shapiro, R.S., Rickinson, A., Kieff, E. y cols. *Expression of Epstein-Barr virus transformation-associated genes in tissues of patients with EBV lymphoproliferative disease*. N Engl J Med 1989; 321: 1080-1085.
12. Pallesen, G., Sandvej, K., Hamilton Dutoit, S.J., Rowe, M., Young, L.S. *Activation of Epstein-Barr virus replication in Hodgkin and Reed-Sternberg cells*. Blood 1991; 78: 1162-1165.
13. Gulley, M.L., Amin, M.B., Nicholls, J.M., Banks, P.M., Ayala, A.G., Srigley, J.R., Eagan, P.A., Ro, J.Y. *Epstein-Barr virus is detected in undifferentiated nasopharyngeal carcinoma but not in lymphoepithelioma-like carcinoma of the urinary bladder*. Hum Pathol 1995; 26: 1207-1214.
14. Araujo, I., Foss, H.D., Bittencourt, A., Hummel, M., Demel, G., Mendoca, N., Herbst, H., Stein, H. *Burkitt's lymphoma in north-east Brazil: Frequent Epstein-Barr virus infection of tumor cells and expression of EBV encoded latent membrane protein in cases associated with Schistosoma mansoni infection*. Blood 1996; 87: 5279-5286.
15. Hummel, M., Anagnostopoulos, I., Dallenbach, F., Korbjuhn, P., Dimmler, C., Stein, H. *EBV infection patterns in Hodgkin's disease and normal lymphoid tissue: Expression and cellular localization of EBV gene products*. Br J Haematol 1992; 82: 689-694.
16. Kanavaros, P., Sakalidou, A., Tzardi, M., Darivianaki, K., Delides, G., Kazlaris, E., Kalmanti, M. *Frequent detection of Epstein-Barr virus (EBV), EBV transcripts and latent membrane protein-1 (LMP-1) in tumor cells in Hodgkins disease arising in childhood*. Pathol Res Pract 1994; 190: 1026-1030.
17. Knowles, D.M., Cesarman, E., Chadburn, A., Frizzera, G., Chen, J., Rose, E.A., Michler, R.E. *Correlative morphologic and molecular genetic analysis demonstrates three distinct categories of posttransplantation lymphoproliferative disorders*. Blood 1995; 85: 552-565.
18. Hummel, M., Anagnostopoulos, I., Korbjuhn, P., Stein, H. *Epstein-Barr virus in B-cell non-Hodgkin's lymphomas: Unexpected infection patterns and different infection incidence in low- and high-grade types*. J Pathol 1995; 175: 263-271.
19. De Bruin, P.C., Jiwa, N.M., Van der Valk, P., Van der Heerde, P., Gordijn, R., Ossenkoppele, G.J., Walboomers, J.M., Meijer, C.J. *Detection of Epstein-Barr virus nucleic acid sequences and protein in nodal T-cell lymphomas: Relation between latent membrane protein-1 positivity and clinical course*. Histopathology 1993; 23: 509-518.
20. Anagnostopoulos, I., Hummel, M., Stein, H. *Frequent presence of latent Epstein-Barr virus infection in peripheral T cell lymphomas. A review*. Leuk Lymphoma 1995; 19: 1-12.

21. Brooks, L., Yao, Q.Y., Rickinson, A.B., Young, L.S. *Epstein-Barr virus latent gene transcription in nasopharyngeal carcinoma cells: Coexpression of EBNA1, LMPI, and LMP2 transcripts.* J Virol 1992; 66: 2689-2697.
22. Niedobitek, G., Herbst, H., Young, L.S., Rowe, M., Dienemann, D., Germer, C., Stein, H. *Epstein-Barr virus and carcinomas. Expression of the viral genome in an undifferentiated gastric carcinoma.* Diagn Mol Pathol 1992; 1: 103-108.
23. Fukayama, M., Hayashi, Y., Iwasaki, Y., Chong, J., Ooba, T., Takizawa, T., Koike, M., Mizutani, S., Miyaki, M., Hirai, K. *Epstein-Barr virus-associated gastric carcinoma and Epstein-Barr virus infection of the stomach.* Lab Invest 1994; 71: 73-81.
24. Lee, E.S., Locker, J., Nalesnik, M., Reyes, J., Jaffe, R., Alashari, M., Nour, B., Tzakis, A., Dickman, P.S. *The association of Epstein-Barr virus with smooth-muscle tumors occurring after organ transplantation.* N Engl J Med 1995; 332: 19-25.
25. McClain, K.L., Leach, C.T., Jenson, H.B., Joshi, V.V., Pollock, B.H., Parmley, R.T., DiCarlo, F.J., Chadwick, E.G., Murphy, S.B. *Association of Epstein-Barr virus with leiomyosarcomas in young people with AIDS.* N Engl J Med 1995; 332: 12-18.
26. Lu, Q.L., Elia, G., Lucas, S. y cols. *Bcl2 protooncogen expression in Epstein-Barr virus-associated nasopharyngeal carcinoma.* Int J Cancer 1993; 53: 29-35.