

Patología molecular

Aplicaciones de la técnica PCR al diagnóstico de enfermedad linfoproliferativa

P. Algara, R. Villuendas, P. Martínez y M.A. Piris

Departamentos de Genética y Anatomía Patológica, Complejo Hospitalario de Toledo, Toledo.

INTRODUCCIÓN

Las neoplasias linfoides son un grupo heterogéneo de enfermedades que ocurren como resultado de la transformación neoplásica de linfocitos B o T, que frecuentemente reflejan diferentes estadios de diferenciación. La discriminación entre un proceso reactivo y neoplásico, así como la determinación de la estirpe celular B o T (en procesos linfoproliferativos), son relevantes desde un punto de vista clínico. Dicha discriminación es posible por estudios de clonalidad, pudiendo ser establecida por diferentes vías:

- Inmunohistoquímica, mediante la restricción de cadenas ligeras de las inmunoglobulinas (Ig) (en neoplasias de células B).
- Citogenética, demostrando alteraciones cromosómicas recurrentes (por ejemplo translocaciones).
- Genética molecular, mediante el análisis de reordenamientos génicos clonales de células B o T o estudio de alteraciones cromosómicas.

Los estudios inmunofenotípicos han supuesto una profunda modificación de la patología, aumentando el conocimiento de aspectos inmunológicos y biológicos

básicos de las neoplasias y facilitando enormemente el diagnóstico y clasificación de las enfermedades linfoproliferativas. Además, el estudio inmunohistoquímico no sólo permite distinguir entre procesos reactivos y neoplásicos, sino también clasificar los distintos tipos de neoplasias linfoides (1). Sin embargo, existen situaciones en las cuales los marcadores inmunofenotípicos presentan una serie de limitaciones importantes desde el punto de vista diagnóstico.

La citogenética es una técnica muy valiosa para la búsqueda de marcadores cromosómicos, pero presenta las desventajas de la necesidad de disponer de material fresco, una baja sensibilidad y no poder detectar alteraciones génicas.

En las situaciones en que no se puede establecer la clonalidad inmunofenotípicamente es donde tiene su mayor indicación el análisis molecular. La aplicación mayor de los métodos moleculares en el estudio de enfermedades linfoproliferativas ha sido el análisis de la clonalidad de las células B y/o T (2-4). La primera técnica utilizada en el estudio de clonalidad de los genes IgH y TCR fue la de *Southern blot*. Su alta especificidad y utilidad ha sido ampliamente documentada, demostrando tener un importante valor, adjunto a los métodos clásicos (5-8); pero su uso diagnóstico en hematopato-

Tabla 1. Comparación entre las técnicas de Southern blot y PCR.

	Southern blot	PCR
Sensibilidad	10% a 5%	5% a 0,1%
Tiempo	Largo (>7 días)	Corto (~24 h)
Tejidos	Fresco o congelado	Fijado en formol y embebido en parafina
Calidad de DNA	Alto peso molecular	Parcialmente degradado
Cantidad de DNA	Elevada	Baja
Isótopos	Sí	No
Coste	Alto	Bajo

logía ha estado condicionado por sus grandes limitaciones técnicas como método de aplicación rutinario (Tabla 1). Estas limitaciones técnicas son paliadas en gran medida por la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). La adaptación de esta técnica al estudio de la presencia de clonalidad de células B y T en lesiones linfoides (9, 10) ha reemplazado a la técnica de Southern blot como método de uso rutinario, a pesar de las limitaciones que presenta la PCR aplicada a dicho estudio.

REORDENAMIENTOS DE IGH Y TCR

Uno de los rasgos fundamentales de las células linfoides es su capacidad para reconocer y distinguir específica-

mente antígenos extraños. La especificidad en el reconocimiento antigénico por estas células es llevado a cabo por los receptores antigénicos (Ig y TCR) que se expresan en la superficie celular. La diversidad deriva principalmente de reordenamientos somáticos específicos para cada linfocito (reordenamientos clon-específicos). La configuración germinal de los genes de las Ig y TCR consiste en segmentos discontinuos de DNA que contienen regiones codificantes de las regiones Variable (V), de Diversidad (D), de Unión (J) y Constante (C), todas ellas en un número variable para cada gen (11, 12). Esta configuración germinal se reordena de forma obligatoria para dar lugar a los diferentes receptores antigénicos. En cada reordenamiento, diferente y específico en cada linfocito, están involucradas una región V, una región D y otra J. La secuencia reordenada es de tamaño y secuencia variable, debido a la incorporación de nucleótidos al azar ("regiones N") (13), dando lugar a una secuencia hipervariable denominada CDRIII (región determinante de complementariedad).

El análisis de clonalidad mediante PCR se basa en la amplificación simultánea de todos los reordenamientos presentes en la muestra (clonales y policlonales). La detección de estos reordenamientos para el gen *IgH* está basada en:

- El uso de cebadores consenso complementarios a las secuencias más conservadas (FR) de las regiones V y J del gen *IgH*. Estos cebadores presentan un 80% de homología con las regiones V y una secuencia común a las seis regiones J, respectivamente (Fig. 1).

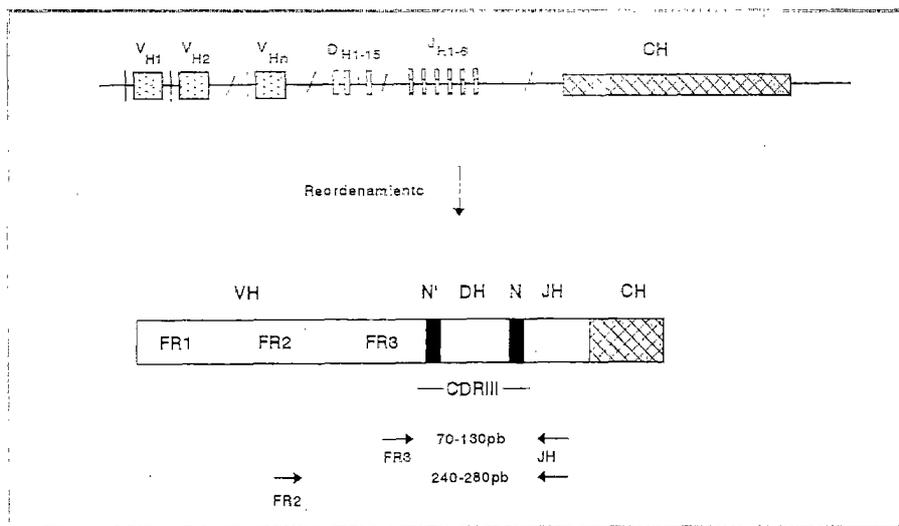


Figura 1. Estructura del gen *IgH* y localización de los cebadores para amplificar los reordenamientos del gen.

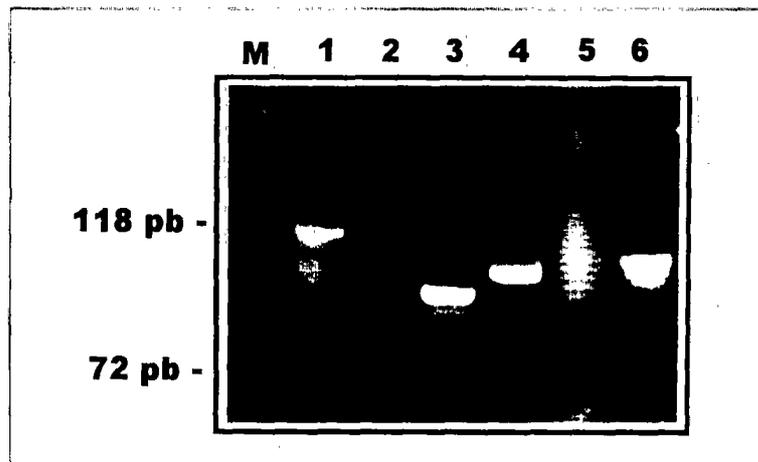


Figura 2. Electroforesis en gel de poliacrilamida, usando cebadores para la región FR3 y JH del gen *IgH*. Calle 6: banda nítida correspondiente a reordenamiento monoclonal en un control positivo. Calle 5: barrido correspondiente a amplificación policlonal. Calles 1-4: muestras problema con reordenamientos en las calles 1, 3 y 4; ausencia del mismo en la calle 2. M: marcador de peso molecular.

- Estos cebadores flanquean los sitios de unión V-D-J, donde se genera gran diversidad de secuencias debido a las regiones N.
- Los reordenamientos V-D-J presentes en una población clonal (banda nítida en electroforesis) pueden discriminarse de los presentes en una población policlonal (barrido o *smear*), gracias a la gran heterogeneidad de tamaño originada en la amplificación de estos últimos (Fig. 2).

Los cebadores más comúnmente utilizados son los que reconocen la región FR3 del segmento VH y el cebador común para la región JH (9, 14, 15). El pequeño tamaño del producto amplificado con estos cebadores (70-120 pb) hace posible su aplicación en DNA parcialmente degradado (16). La utilización de cebadores para la región FR2 y FR1 del segmento VH disminuye el porcentaje de falsos negativos (17, 18). Los cebadores FR1 son menos utilizados debido a que el tamaño del producto amplificado es mayor (300-400 pb), lo que le hace poco útil en material fijado y embebido en parafina. Esta técnica presenta la desventaja de que los cebadores no amplifican todas las secuencias reordenadas (variabilidad germinal, mutaciones somáticas en las zonas de unión del *primer*, presencia de otros reordenamientos), dando lugar a un gran número de falsos negativos (20% a 30%), incluso con el uso combinado de cebadores para las distintas zonas de la región VH.

El fundamento para detectar reordenamientos de los genes *TCR* es el mismo que para el gen *IgH*. El gen más utilizado para el estudio de clonalidad de procesos linfoproliferativos T es el gen *TCR γ* , debido a su simplicidad estructural y a su temprano reordenamiento en la ontogenia (19). A diferencia de *IgH*, los cebadores que se utilizan son exactamente homólogos a las regiones V y J del gen, disminuyendo el índice de falsos negativos (oscila entre 10% y 25%). La amplificación de reordenamientos del gen *TCR γ* se puede realizar utilizando dos mezclas de cebadores (10, 20, 21) (Fig. 3). El tamaño del producto amplificado también es pequeño (120-170 pb), siendo por tanto una técnica útil en rutina diagnóstica.

Otros grupos consiguen aumentar este grado de detección introduciendo diferentes modificaciones técnicas, como el uso de numerosas reacciones de amplificación (22), utilización de geles en condiciones desnaturalizantes (23, 24), introducción de isótopos en la reacción (25) o mediante estudios de protección de RNAsa (26). Sin embargo, todas estas variantes aumentan la complejidad de la técnica, dificultan la interpretación de los resultados y por lo tanto reducen su utilidad en la rutina diagnóstica.

La alta sensibilidad que la técnica PCR presenta en detectar un clon de células malignas (5% a 0,1%) permite que sea utilizada como marcador molecular en el análisis de enfermedad mínima residual (27).

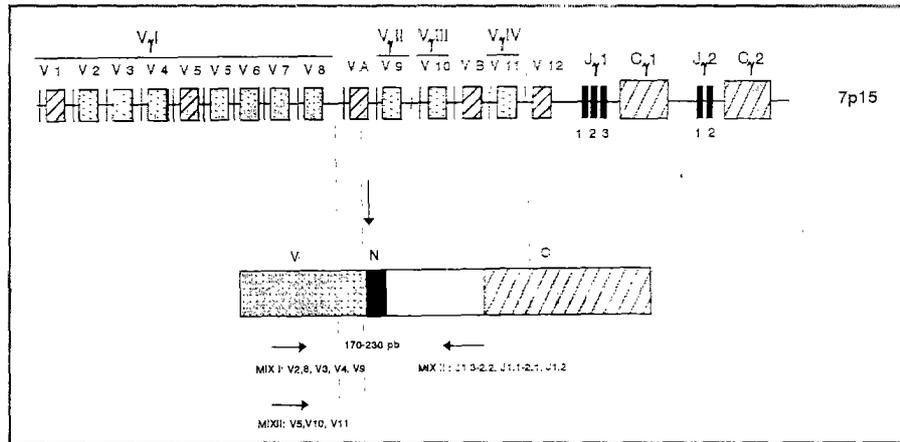


Figura 3. Estructura del gen *TCRγ* y cebadores usados para amplificación de los reordenamientos del gen.

TRANSLOCACIONES CROMOSÓMICAS RECURRENTES

Las translocaciones cromosómicas recurrentes son importantes mecanismos en la patogenia de los linfomas no hodgkinianos. Las más comunes involucran a los elementos reguladores del gen de la cadena pesada de las Ig (*IgH*) en la banda 14q32. El otro cromosoma que interviene en la translocación se une al gen *IgH*, y normalmente contiene un protooncogén que es desregulado y sobreexpresado como consecuencia de la translocación. Estas anomalías cromosómicas se han asociado a tipos específicos histológicos de linfomas no hodgkinianos, sugiriendo un importante papel en el desarrollo de estas

neoplasias (Tabla 2). Estas aberraciones cromosómicas no sólo sirven como marcadores clonales sino que ayudan en la clasificación de los distintos tipos de linfomas.

El análisis de las diferentes alteraciones génicas en linfomas se puede abordar mediante varios estudios (Tabla 3). Todos ellos se pueden detectar mediante la técnica convencional de *Southern blot*, disponiendo de varias enzimas de restricción y sondas frente a los genes, lo que permite identificar los distintos puntos de rotura. La identificación de la secuencia y el agrupamiento de los puntos de rotura de algunas translocaciones han hecho posible su detección mediante la convencional PCR, como ocurre con la t(14;18) y t(11;14). Se eligen cebadores de ambos cromosomas que flanqueen el pun-

Tabla 2. Marcadores genéticos comunes de los linfomas no hodgkinianos.

Linfoma	Translocación	Gen	Función	Ref.
Inmunocitoma/linfoma linfoplasmocitoide	t(9;14) (p13;q32)	<i>pax 5</i>	Gen <i>homeobox</i>	Lida, 1996 (28)
Linfoma folicular	t(14;18) (q32;q21)	<i>bcl-2</i>	Inhibe apoptosis	Tsujimoto, 1985 (29)
Linfoma de las células del manto	t(11;14) (q13;q32)	<i>bcl-1</i>	Regula fase G1/S	Tsujimoto, 1984 (30)
Burkitt	t(8;14) (q24;q32) t(2;8) (p11;q24) t(8;22) (q24;q11)	<i>c-myc</i>	Factor de transcripción	Dalla-Favera, 1982 (31)
Linfoma difuso B de células grandes	t(3;14) (q27;q32) t(3;22) (q27;q11) t(2;3) (p12;q27)	<i>bcl-6</i>	Factor de transcripción	Ye, 1993 (32)
Linfoma anaplásico de célula grande	t(2;5) (p23;q35)	<i>alk</i>	Tirosincinasa	Morris, 1994 (33)

Tabla 3. Técnicas utilizadas en el estudio de alteraciones génicas en linfomas.

Gen	IHQ	PCR y/o LD-PCR	Souther blot	Otras
Ig	Restricción de cadenas ligeras	PCR: monoclonalidad IgH, Ck	Monoclonalidad IgH, Ck, Cl	RT-PCR, LDI-PCR, ISH-RNA
TCR	Restricción de región variable	PCR: monoclonalidad gamma, beta, delta	Monoclonalidad gamma, beta, delta	RT-PCR
<i>Bcl-1</i>	Expresión de ciclina D1	PCR: t(11;14) (MTC) LD-PCR: t(11;14)	t(11;14)	Citogenética, Northern blot, fibras de DNA, FISH, LDI-PCR
<i>Bcl-2</i>	Expresión	PCR:t(14;18) (mbr, mcr) LD-PCR: t(14;18)	t(14;18)	Citogenética, FISH, LDI-PCR
<i>Bcl-6</i>	Expresión	LD-PCR: t(3;14), t(2;3), t(3;22)	Reordenamientos 3q27	Citogenética, LDI-PCR, FISH
<i>c-myc</i>	Expresión	LD-PCR: t(8;14)	Reordenamientos 8q24	Citogenética, LDI-PCR, FISH
<i>alk</i>	Expresión	LD-PCR: t(2;5)	Reordenamientos 5q35	Citogenética, RT-PCR, FISH
<i>pax5</i>			Reordenamientos 9p13	Citogenética, Northern blot, FISH

IHQ: inmunohistoquímica; PCR: reacción en cadena de la polimerasa; Ig: inmunoglobulina; LD-PCR: PCR de fragmentos grandes; RT-PCR: transcripción inversa-PCR; LDI-PCR: PCR inversa de fragmentos largos; ISH: hibridación *in situ*; FISH: hibridación *in situ* con fluorescencia.

to de fusión (Fig. 4), produciéndose amplificación cuando en la muestra existe translocación, que se visualiza en electroforesis el aparecer una banda nítida. El uso reciente de la PCR para amplificar fragmentos de tamaño elevado [Long-distance PCR (LD-PCR)] hace posible la

detección de la mayoría de las translocaciones, aunque sus puntos de rotura estén dispersos (34).

Existen otras translocaciones, como por ejemplo la t(2,5), en que como consecuencia del proceso se produce un RNAm híbrido (gen funcionalmente quimérico).

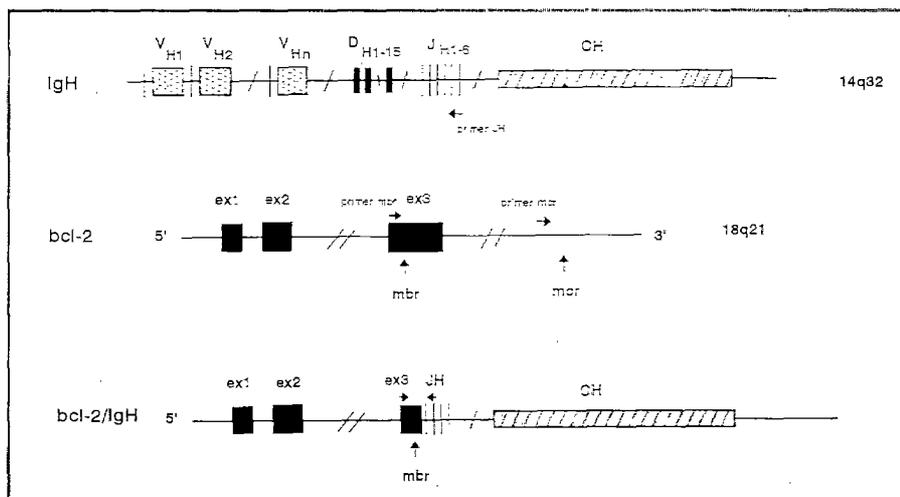


Figura 4. Estructura de los genes *bcl-2* e *IgH*. Localización de los puntos de rotura de la translocación y cebadores de los genes.

La detección de esta translocación se realiza además mediante la técnica RT-PCR, siendo el RNAm la diana de estudio. Igualmente se utilizan cebadores complementarios a los genes involucrados en la translocación.

Oncogén *bcl-2*

La translocación t(14;18)(q32;q21) ha sido considerada clásicamente como la aberración cromosómica más común en las enfermedades linfoides. Aproximadamente el 70% a 80% de los linfomas foliculares y el 20% a 30% de los linfomas B difusos de célula grande presentan esta translocación (35, 36). En ella están involucrados el oncogén *bcl-2*, situado en el cromosoma 18, y el gen *IgH*, en el cromosoma 14. Como resultado de esta translocación, el gen *bcl-2* se yuxtapone con el gen *IgH*, provocando la sobreexpresión de *bcl-2* inducida por los potenciadores (*enhancers*) del gen de la cadena pesada de las IgH (29). Este oncogén tiene como función bloquear la apoptosis y su sobreexpresión; es, probablemente, un paso en el proceso de linfomagénesis, alargando la vida media de las células neoplásicas. En estos genes los puntos de rotura están agrupados; así, en el gen *bcl-2* ocurre en dos regiones: en la región mayor [*major breakpoint region* (mbr), donde ocurren el 50% a 70% de las translocaciones], y la región menor [*minor cluster region* (mcr)], donde ocurren el 20% a 40% de las roturas cromosómicas (35, 37, 38). La técnica PCR es útil para analizar reordenamientos IgH/*bcl-2*, utilizando un cebador para la región J del gen *IgH* y un cebador complementario que flanquea cada una de las zonas de rotura del gen *bcl-2* (Fig. 4).

La detección de la t(14;18) ha sido utilizada para el diagnóstico de linfomas foliculares (38-40) y para la diferenciación con otros linfomas con un patrón de crecimiento folicular (41). Así, se ha empleado para identificar células con t(14;18) en muestras de sangre periférica de médula ósea y ganglio, que eran morfológicamente normales (39, 42, 43). Sin embargo, además la t(14;18) ha sido detectada en hiperplasias linfoides (44) y en sangre periférica de individuos sanos (45). Por tanto, la detección de la translocación t(14;18) no siempre indica malignidad, por lo que un resultado positivo debe ser correlacionado con la morfología e inmunofenotipo. Debido a la gran sensibilidad de la técnica PCR en la detección de la translocación (10^{-4} - 10^{-5} células), la

hace susceptible para identificar enfermedad residual (46, 47).

Trabajos recientes indican que la expresión de *bcl-2* parece ser un claro factor pronóstico, y comentan su resistencia al tratamiento en linfoma B difuso de célula grande (48-50). Sin embargo, diversas publicaciones han fallado en encontrar asociación entre la presencia de reordenamiento *bcl-2*/IgH y pronóstico en pacientes con linfoma folicular y linfoma difuso de células grandes B (48, 49), en discrepancia con hallazgos iniciales de Yunis y cols. (36). Por otro lado, la detección de la translocación en sangre periférica en fase diagnóstica de pacientes con LDCL sí que parece tener relevancia clínica, presagiando un peor pronóstico (51). Recientes resultados de un estudio molecular realizado por el Dr. A. López-Guillermo muestran, no obstante, que distintos puntos de rotura en el gen *bcl-2* se asocian a diferentes probabilidades de supervivencia en el linfoma folicular (López-Guillermo y cols., enviado a publicación).

Oncogén *bcl-1*

La translocación t(11;14)(q13;q32) está presente en el 90% de los linfomas B de células del manto. Como resultado de ella se yuxtapone el gen *bcl-1*, presente en el cromosoma 11, con el segmento J del gen *IgH* (30). Como consecuencia de esta translocación se activa el gen de la ciclina D1 (PRAD-1, *bcl-1*, *CCDN1*), que interviene en el control de la regulación del ciclo celular, en la transición G1/S. Estudios moleculares de la región translocada han encontrado diferentes puntos de rotura en una amplia zona (110-130 kb) del gen *bcl-1*; sin embargo, la mayoría de las roturas (30% a 50%) ocurren en una región del cromosoma 11 conocida como MTC (*major translocation cluster*) (52, 53). Esta agrupación de los puntos de rotura ha hecho posible detectar esta translocación por PCR mediante el uso de dos *primers*, uno complementario a la región J del gen *IgH* y otro para la región MTC del gen *bcl-1* (54-56). El pequeño tamaño de amplificación abre la posibilidad de detectar estas translocaciones en material fijado en formol y embebido en parafina (56).

Aunque la translocación t(11;14) no es enteramente diagnóstica de linfoma del manto (ya que puede verse en la leucemia prolinfocítica y el mieloma) (57), es bastante característica, sobre todo investigada en el contexto clinicopatológico adecuado.

Estudios mediante FISH demuestran la presencia de la t(11;14) en la casi totalidad de los linfomas del manto que tienen sobreexpresada la proteína ciclina D1 (58), sugiriendo que la translocación es un evento crítico en la patogenia de los linfomas de células del manto y puede ser un elemento primario para diagnóstico. Como consecuencia de la translocación, estos procesos linfoides presentan sobreexpresión del RNAm (59), que se corrobora con la expresión de ciclina D1 en inmunohistoquímica. Así, recientemente el uso práctico de la detección de t(11;14) se ha visto desplazado por la posibilidad de demostración de sobreexpresión de la proteína ciclina D1, una ciclina D normalmente no expresada en células linfoides benignas. Ambos análisis no son totalmente superponibles, ya que la expresión focal de ciclina D1 (no la expresión difusa intensa por parte de la mayoría de las células neoplásicas) se puede ver en diferentes tipos de enfermedades linfoproliferativas.

La amplificación mediante PCR de la translocación bcl-1/IgH puede utilizarse para detectar enfermedad mínima residual y evaluar su significado clínico (60).

BIOPSIAS GÁSTRICAS

El diagnóstico diferencial entre los linfomas B gástricos de bajo grado y los infiltrados linfoides reactivos (gastritis) sobre biopsias endoscópicas suele ser difícil de realizar morfológicamente, debido a las limitaciones producidas por el pequeño tamaño de la muestra, la frecuente ausencia de rasgos citológicos atípicos y la presencia de artefactos. Así, a veces, el límite morfológico entre linfoma e hiperplasia linfoide reactiva no está claro, y puede llevar a equívocos. Los linfomas MALT de bajo grado han sido asociados a *Helicobacter pylori* en un alto porcentaje de casos (61, 62). La presencia de clonalidad es el mayor criterio para el diagnóstico de linfoma, y la interpretación del estudio de restricción de cadenas ligeras por inmunohistoquímica es frecuentemente complicada. Por esta razón, el uso de PCR en este tipo de muestras ha demostrado poder tener un importante valor adjunto en el diagnóstico de linfoma, ayudando a distinguir entre lesiones benignas y neoplásicas (15, 63), así como ha mostrado su utilidad práctica de la detección de monoclonalidad en el diagnóstico, seguimiento y evaluación de la respuesta al tratamiento erradicador de *H. pylori* (64). Fend y cols. (63) muestran

reordenamientos clonales en biopsias de pacientes consideradas negativas con criterios morfológicos, que meses después presentan un diagnóstico histológico de linfoma MALT de bajo grado. Sin embargo, los resultados positivos de la PCR deben ser interpretados en el contexto de la histología debido a la presencia de detección de monoclonalidad en un 11% a 13% de infiltrados linfoides reactivos (gastritis) (65, 66). Estos resultados han derivado de técnicas de alta sensibilidad, capaces de detectar clones B presentes hasta en un 1×10^{-3} células.

Así, en la práctica clínica habitual, aunque puede llegarse al diagnóstico de linfoma de célula pequeña en un importante porcentaje de casos mediante el uso de criterios morfológicos e inmunofenotípicos, frecuentemente es necesario el uso de técnicas PCR para IgH que ayuden a resolver estas dificultades en el diagnóstico. En ésta, como en otras circunstancias, hay que integrar la información derivada de estudios moleculares con la obtenida en la exploración clínica, histología e inmunofenotipo.

LINFOMAS T CUTÁNEOS

El diagnóstico de las lesiones cutáneas, malignas y benignas normalmente se realiza con la ayuda de diversos parámetros clínicos y patológicos. La micosis fungoide es la forma más común de linfoma cutáneo de células T. El problema más frecuente en su diagnóstico histopatológico es la distinción entre lesiones tempranas y lesiones benignas que pueden simular micosis fungoide, como las parapsoriasis o reacciones a fármacos (67). Inmunofenotípicamente, las micosis fungoides suelen expresar antígenos de células T, hasta que progresan al estado tumoral, en que algunos antígenos T pueden estar ausentes (68).

Varios estudios demuestran la utilidad de la PCR en el análisis de clonalidad en infiltrados cutáneos de células T, permitiendo distinguir entre estadios iniciales de micosis fungoide y lesiones inflamatorias benignas (21, 69). Además puede usarse como marcador específico para cada tumor, si se pretende realizar monitorización de la enfermedad (70), o en el estudio de diseminación del tumor a otros órganos (Lessin, 1991). Estos mismos estudios, realizados en pacientes con papulosis linfomatoide, han ayudado a establecer que en la mayoría de los casos la papilomatosis linfomatoide puede considerarse como un linfoma T indolente (21).

PRESENCIA DE VIRUS LIGADOS A ENFERMEDAD LINFOPROLIFERATIVA

Virus Epstein-Barr (EBV)

Este virus, del grupo herpes, tradicionalmente ha sido asociado a diferentes tipos de enfermedad linfoproliferativa y ha recibido una gran atención como agente involucrado en la génesis de linfomas (71). Los linfomas donde más frecuentemente se detecta EBV son:

- Linfoma de Burkitt endémico (96%).
- Linfomas B agresivos en inmunodeficientes, sobre todo en linfoma inmunoblástico y en linfomas primarios del sistema nervioso central.
- Linfomas de células *natural-killer* (NK), como el linfoma T/NK de la nariz, donde la presencia de EBV ha sido demostrada en un porcentaje del 95% al 100%.
- Otros linfomas T.
- Enfermedad de Hodgkin, especialmente la forma de celularidad mixta.

Pese a esta ubicua presencia de EBV en diferentes tipos de procesos linfoproliferativos, aún son necesarias pruebas definidas que lo involucren en su génesis.

La demostración de EBV se puede realizar mediante diferentes técnicas. Las tres más difundidas son PCR, hibridación *in situ* (ISH) para EBER e inmunohistoquímica para la proteína latente de membrana (EBV-LMP) (72, 73). Los resultados no son superponibles, y en conjunto hay que recomendar el uso de técnicas de demostración de RNA viral *in situ* (ISH-EBER), tan sensibles como PCR pero con capacidad para demostrar el tipo celular concreto EBV positivo. Su uso combinado permite detectar diferentes patrones de latencia del EBV en diversas enfermedades linfoproliferativas (Tabla 4).

Mediante *Southern blot* para la región terminal, o PCR para las delecciones de la proteína latente de membrana, se puede analizar la presencia clonal de EBV.

Debe recordarse que la presencia de EBV no es un marcador de malignidad, ya que puede verse en diversas condiciones benignas, incluso asociado a la expresión de EBV-LMP y a la delección de LMP.

Virus humano herpes-8 (HHV-8)

La presencia del virus humano asociado a sarcoma de Kaposi (KSHV) es uno de los hallazgos característicos del linfoma B de cavidades corporales (linfoma primario de derrames), un tipo raro de linfoma B de células grandes que se encuentra más frecuentemente en enfermos VIH+, pero que puede verse también en enfermos inmunocompetentes (74). El KSHV es un virus linfotrófico hacia las células B que se encuentra también de forma típica en las células endoteliales y fusiformes del sarcoma de Kaposi. Asimismo su presencia es un frecuente hallazgo en la enfermedad de Castleman, multicéntrica (75). No obstante, también ha sido descrito en linfadenopatía angioinmunoblástica y en linfadenopatías reactivas caracterizadas por hiperplasia gigante de centros germinales e incremento en la vascularización (76). De hecho, se ha sugerido que el sistema linfoide actúa como un reservorio de células con infección latente por HHV-8, que se reactivaría en situaciones de inmunosupresión. Estudios recientes describen la presencia de HHV-8 en las células dendríticas de enfermos con mieloma, donde además han caracterizado la expresión de un gen viral con homología a la IL-6 humana, un inductor de la proliferación de células plasmáticas (77).

Así, la presencia de HHV-8 no es diagnóstica de ninguna enfermedad precisa, aunque es más característica del linfoma asociado a derrames (linfoma de cavidades corporales) y de la forma multicéntrica de la enfermedad de Castleman. Su relevancia en el mieloma es aún objeto de controversia.

La detección de secuencias del HHV-8 en muestras de tejido se realiza normalmente por PCR, pero se puede efectuar también mediante ISH.

Tabla 4. Patrones de latencia en lesiones linfoides asociadas a virus de Epstein-Barr en diversos tipos de linfomas (Weiss, 1996).

Patrón	EBNA-1	EBNA-2-6	LMP-1-3	EBER	Tipo
I	+	-	-	+	Burkitt
II	+	-	+	+	Hodgkin
III	+	+	+	+	Posttrasplante

Tabla 5. Indicaciones diagnósticas de las técnicas de PCR en patología linfoide.

<p>Diagnóstico inicial (IgH, TCRγ, bcl-2, alk, bcl-1)</p> <ul style="list-style-type: none"> Biopsias endoscópicas Estudio de monoclonalidad en linfomas linfoproliferativos de células T Tumores en que la población neoplásica aparece enmascarada por una gran cantidad de células reactivas Tumores con aberraciones en la expresión de marcadores de superficie Linfomas linfoproliferativos en inmunodeficientes Filiación precisa del tipo de linfoma
<p>Enfermedad mínima residual (IgH, TCRγ, TCRδ, bcl-2, bcl-1)</p> <ul style="list-style-type: none"> Leucemia linfoblástica aguda B o T Linfoma folicular Linfoma de células del manto
<p>Factores pronóstico (bcl-2)</p> <ul style="list-style-type: none"> Linfoma folicular Linfoma B difuso de célula grande
<p>Identificación de agentes infecciosos</p> <ul style="list-style-type: none"> Virus de Epstein-Barr: <ul style="list-style-type: none"> Hodgkin Linfomas T Linfomas B en inmunodeficientes Virus humano herpes-8 asociado a sarcoma de Kaposi: <ul style="list-style-type: none"> Linfoma de cavidades corporales Castleman plasmocelular Mieloma

PUNTOS CONTROVERTIDOS

¿Cuál es el valor de un resultado negativo en un estudio de PCR?

Tanto nuestros datos como los descritos por otros autores demuestran que la técnica PCR es altamente fiable en la detección de reordenamientos clonales de lesiones linfoides B o T, aunque la obtención de resultados negativos no siempre sea sinónimo de ausencia de monoclonalidad. El resultado negativo de la PCR para IgH o TCR γ puede deberse a limitaciones propias de la técnica o a alteraciones moleculares sobreañadidas en el tumor. Un resultado negativo tiene un escaso valor, ya que puede verse tanto en condiciones benignas como malignas. Si existe un alto interés clínico puede ser conveniente la realización de *Southern blot*, tras un resultado negativo de un estudio de PCR.

**¿Cuál es el valor de un resultado positivo en un estudio de PCR?
¿Equivale la presencia de un clon a un diagnóstico de malignidad?**

En la respuesta inmunitaria normal se generan clones, que en determinadas situaciones pueden ser detectados

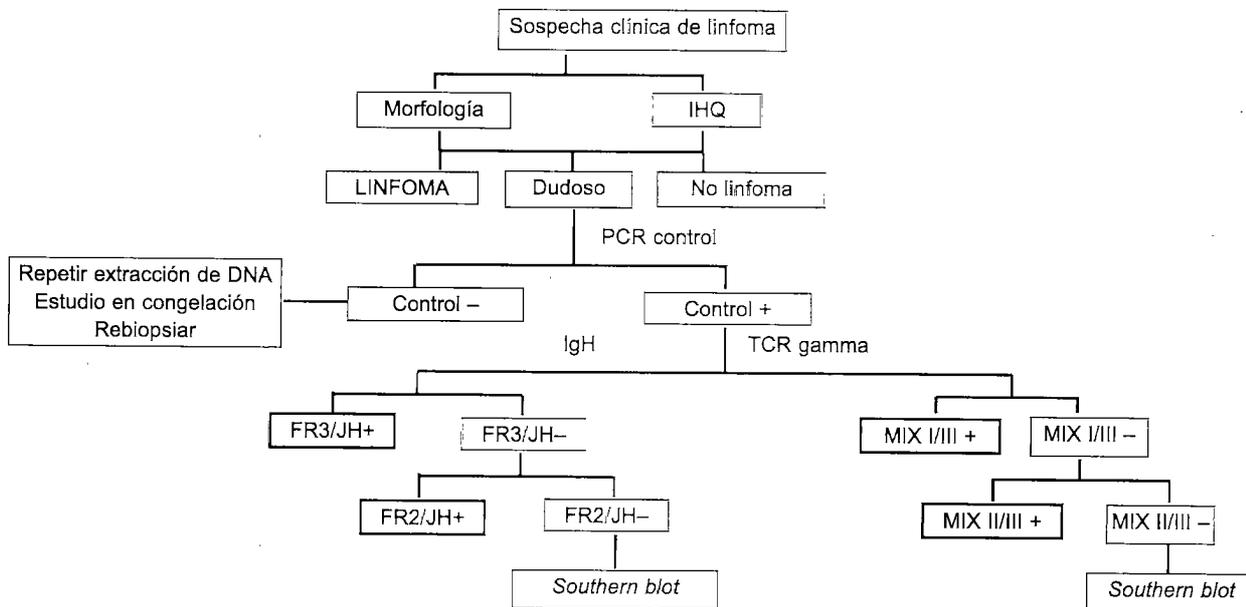


Figura 5. Algoritmo diagnóstico indicando el papel de las técnicas PCR para IgH y TCR γ de rutina. A partir de una sospecha clínica de linfoma no resuelta mediante morfología e inmunohistoquímica se inicia el estudio de PCR con las siguientes fases: análisis de la viabilidad del DNA para amplificación, seguida de estudio para IgH o TCR, en función del contexto clínico e histológico. El estudio (en el caso de un linfoma linfoproliferativo B) se prosigue hasta: a) un resultado positivo con cebadores para la región FR3-JH o FR2-JH; b) un resultado negativo para ambos. En linfomas linfoproliferativos T, el estudio se realiza hasta: a) resultado positivo con cebadores Mix-I/III o Mix-II/III; b) resultado negativo para ambos.

mediante la técnica PCR para IgH o TCR γ . Así pues, un resultado positivo de una técnica PCR no equivale a malignidad, sino que debe interpretarse en el contexto clínico e histológico adecuado.

¿Cómo incluir técnicas moleculares en protocolos diagnósticos?

En la Tabla 5 y en la Fig. 5 se han incluido las indicaciones más comunes para realizar PCR.

BIBLIOGRAFÍA

- Harris NL, Jaffe ES, Stein H y cols. *A revised European-American classification of lymphoid neoplasms: A proposal from the International Lymphoma Study Group*. Blood 1994; 84: 1361.
- Arnold A, Cossman J, Bakhshi A, Jaffe S, Waldmann TA, Korsmeyer SJ. *Immunoglobulin gene rearrangements as unique clonal markers in human lymphoid neoplasms*. N Engl J Med 1983; 309: 1593-1599.
- Cossman J, Zehnbauser B, Garret CT, Smith LJ, Williams M, Jaffe ES, Hanson LO, Love J. *Gene rearrangements in the diagnosis of lymphoma/leukemia. Guidelines for use based on a multiinstitutional study*. Am J Clin Pathol 1991; 95: 347-354.
- Griesser H, Douglas T, Reis MD, Mak TW. *Gene rearrangements and translocations in lymphoproliferative diseases*. Blood 1989; 73: 1402-1415.
- Weiss LM, Spagnolo DV. *Assessment of clonality in lymphoid proliferations*. Am J Pathol 1993; 142: 1679-1682.
- Faroni L, Foldi J, Matutes E, Catovsky D, O'Connor NJ, Baer R, Forster A, Rabbitts TH, Luzzatto L. α , β and γ T cell receptor genes: *Rearrangements correlate with haematological phenotype in T cell leukemias*. Br J Haematol 1987; 67: 307-318.
- Williams ME, Innes DJ, Borowitz MJ, Lovell MA, Swerdlow SH, Hurtubise PE, Brynes RK, Chan W, Byrne G, Whitcomb CC, Thomas C. *Immunoglobulin and T cell receptor gene rearrangements in human lymphoma and leukemia*. Blood 1987; 69: 79-86.
- Aisenberg AC. *Utility of gene rearrangements in lymphoid malignancies*. Annu Rev Med 1993; 44: 75-84.
- Brisco MJ, Tan LW, Orsborn AM, Morley AA. *Development of a highly sensitive assay, based on the polymerase chain reaction, for rare B-lymphocyte clones in a polyclonal population*. Br J Haematol 1990; 75: 163-167.
- Trainor KJ, Brisco MJ, Wan JH, Neoh S, Grist S, Morley AA. *Gene rearrangement in B- and T-lymphoproliferative disease detected by the Polymerase Chain Reaction*. Blood 1991; 78: 192-196.
- Toyonaga B, Mak TW. *Genes of the T-cell antigen receptor in normal and malignant T cells*. Ann Rev Immunol 1987; 5: 585-620.
- Cook GP, Tomlinson IM, Walter G, Riethman H, Carter NP, Buluwela L, Winter G, Rabbitts TH. *A map of the human immunoglobulin V μ locus completed by analysis of the telomeric region of chromosome 14q*. Nature Genetics 1994; 7: 162-168.
- Desiderio SV, Yancopolous GD, Paskind M, Thomas E, Boss MA, Landau N, Alt FW. *Insertion of N regions into heavy-chain genes is correlated with expression of terminal deoxynucleotidyl transferase in B cells*. Nature 1984; 311: 752-755.
- Trainor KJ, Brisco MJ, Story CJ, Morley AA. *Monoclonality in B-lymphoproliferative disorders detected at the DNA level*. Blood 1990; 75: 2220-2222.
- Algara P, Martínez P, Sánchez L y cols. *The detection of B-cell monoclonal populations by polymerase chain reaction: Accuracy of approach and application in gastric endoscopic biopsy specimens*. Hum Pathol 1993; 24: 1184-1188.
- Wan JH, Trainor KJ, Brisco MJ, Morley AA. *Monoclonality in B cell lymphoma detected in paraffin wax embedded sections using the polymerase chain reaction*. J Clin Pathol 1990; 43: 888-890.
- Ramasamy I, Brisco M, Morley A. *Improved PCR method for detecting monoclonal immunoglobulin heavy chain rearrangement in B cell neoplasms*. J Clin Pathol 1992; 45: 770-775.
- Deane M, McCarthy KP, Wiedemann LM, Norton JD. *An improved method for detection of B-lymphoid clonality by polymerase chain reaction*. Leukemia 1991; 5: 726-730.
- Allison JP, Lanier LL. *The T-cell antigen receptor gamma gene: Rearrangement and cell lineages*. Immunol Today 1987; 8: 293-296.
- McCarthy KP, Sloane JP, Kabarowski JHS, Wiedemann LM. *A simplified method of detection of clonal rearrangements of the T-cell receptor chain gene*. Diagn Mol Pathol 1992; 1: 173-179.
- Algara P, Soria C, Martínez P y cols. *Value of PCR detection of TCR gamma gene rearrangement in the diagnosis of cutaneous lymphocytic infiltrates*. Diagn Mol Pathol 1994; 3: 275-282.
- Goudie RB, Karim SN, Mills K, Alcorn M, Lee FD. *A sensitive method of screening for dominant T cell clones by amplification of T cell gamma gene rearrangements with the Polymerase Chain Reaction*. J Pathol 1990; 162: 191-196.
- Bourguin A, Tung R, Galili N, Sklar J. *Rapid, nonradiative detection of clonal T-cell receptor gene rearrangements in lymphoid neoplasms*. Proc Natl Acad Sci USA 1990; 87: 8536-8540.
- Davis TH, Yockey CE, Balk SP. *Detection of clonal immunoglobulin gene rearrangements by polymerase chain reaction amplification and single-strand conformational polymorphism analysis*. Am J Pathol 1993; 142: 1841-1847.
- Reed TJ, Reid A, Wallberg K, O'Leary TJ, Frizzera G. *Determination of B-cell clonality in paraffin-embedded lymph nodes using the polymerase chain reaction*. Diagn Mol Pathol 1993; 2: 42-49.
- Veelken H, Tycko B, Sklar J. *Sensitive detection of clonal antigen receptor gene rearrangements for the diagnosis and monitoring of lymphoid neoplasms by a polymerase chain reaction-mediated ribonuclease protection assay*. Blood 1991; 78: 1318-1326.
- Zwicky CS, Maddocks AB, Andersen N, Gribben G. *Eradication of polymerase chain reaction detectable immunoglobulin gene rearrangement in non-Hodgkin's lymphoma is associated with decreased relapse after autologous bone marrow transplantation*. Blood 1996; 88: 3314-3322.
- Lida S, Rao PH, Nallasivam P y cols. *The t(9;14)(p13;q32) chromosomal translocation associated with lymphoplasmacytoid lymphoma involves the PAX-5 gene*. Blood 1996; 88: 4110-4117.
- Tsujimoto Y, Finger LR, Yunis J, Nowell PC, Croce CM. *Cloning of the chromosome breakpoint of neoplastic B cells with the t(14;18) chromosome translocation*. Science 1984; 226: 1097-1099.
- Tsujimoto Y, Yunis J, Onorato-Showe L, Erikson J, Nowell PC, Croce CM. *Molecular cloning of the chromosomal breakpoint of B-cell lymphomas and leukemias with the t(11;14) chromosome translocation*. Science 1984; 224: 1403.

31. Dalla-Favera R, Bregni M, Erikson J. *Human c-myc oncogene is located on the region of chromosome 8 that is translocated in Burkitt lymphoma cells.* Proc Natl Acad Sci USA 1982; 79: 7824-7827.
32. Ye BH, Lista F, Lo Coco F, Knowles DM, Offot K, Chaganti SK, Dalla-Favera R. *Alterations of a zinc finger encoding gene, bcl-6, in diffuse large cell lymphoma.* Science 1993; 262: 747-749.
33. Morris SW, Kirstein M, Valentine MB, Dittmer KG, Shapiro DN, Saltman DL, Look AT. *Fusion of a kinase gene ALK, to a nuclear protein gene, NPM, in non-Hodgkin's lymphoma.* Science 1994; 263: 1281-1284.
34. Akasaka T, Muramatsu M, Ohno H y cols. *Application of long-distance polymerase chain reaction of detection of junctional sequences created by chromosomal translocation in mature B-cell neoplasms.* Blood 1996; 88: 985-994.
35. Weiss LM, Warnke RA, Sklar J, Cleary ML. *Molecular analysis of the t(14;18) chromosomal translocation in malignant lymphomas.* N Engl J Med 1987; 317: 1185-1189.
36. Yunis JJ, Mayer MG, Arnesen MA, Aeppli DP, Oken MM, Frizzera G. *bcl-2 and other genomic alterations in the prognosis of large cell lymphoma.* N Engl J Med 1989; 320: 1047-1054.
37. Cleary ML, Sklar J. *Nucleotide sequence of a t(14;18) chromosomal breakpoint in follicular lymphoma and demonstration of a breakpoint cluster region near a transcriptionally active locus on chromosome 18.* Proc Natl Acad Sci USA 1985; 82: 7439.
38. Ngan BY, Nourse J, Cleary ML. *Detection of chromosomal translocation t(14;18) within the minor cluster region of bcl-2 by polymerase chain reaction and direct genomic sequencing of the enzymatically amplified DNA in follicular lymphomas.* Blood 1989; 73: 1759-1762.
39. Yuan R, Dowling P, Zucca E, Diggelmann H, Cavalli F. *Detection of bcl-2/JH rearrangement in follicular and diffuse lymphoma: Concordant results of peripheral blood and bone marrow analysis at diagnosis.* Br J Cancer 1993; 67: 922-925.
40. Horsman DE, Gascoyne RD, Coupland RW, Coldman AJ, Adomat SA. *Comparison of cytogenetic analysis, southern blot and polymerase chain reaction for the detection of t(14;18) in follicular lymphoma.* Am J Clin Pathol 1995; 103: 472-478.
41. Issacson PG, Androulakis Papachristou A, Diss TC, Pan L, Wright DH. *Follicular colonization in thyroid lymphoma.* Am J Pathol 1992; 141: 43-52.
42. Stetler Stevenson M, Raffeld M, Cohen P, Cossman J. *Detection of occult follicular lymphoma by specific DNA amplification.* Blood 1988; 72: 1822-1825.
43. Berinstein NL, Reis MD, Ngan BY, Sawka CA, Jamal HH, Kuzniar B. *Detection of occult lymphoma in the peripheral blood and bone marrow of patients with untreated early-stage and advanced-stage follicular lymphoma.* J Clin Oncol 1993; 11: 1344-1352.
44. Limpens J, De Jong D, van Krieken JH y cols. *Bcl-2 in benign lymphoid tissue with follicular hyperplasia.* Oncogene 1991; 6: 2271-2276.
45. Ji W, Qu G, Ye P, Zhang XY, Halabi S, Ehrlich M. *Frequent detection of bcl-2/JH translocation in human blood and organ samples by a quantitative polymerase chain reaction assay.* Cancer Res 1995; 55: 2876-2882.
46. Lee MS, Chang KS, Cabanillas F, Freireich EJ, Trujillo JM, Stass SA. *Detection of minimal residual cells carrying the t(14;18) by DNA sequence amplification.* Science 1987; 237: 175-178.
47. Luthra R, McBride JA, Hai S, Cabanillas F, Pugh WC. *The application of fluorescence-based PCR and PCR-SSCP to monitor the clonal relationship of cells bearing the t(14;18)(q32;q21) in sequential biopsy specimens from patients with the follicle center cell lymphoma.* Diagn Mol Pathol 1997; 6: 71-77.
48. Gascoyne RD, Adomat SA, Krajewski S y cols. *Prognostic significance of bcl-2 protein expression and Bcl-2 gene rearrangement in diffuse aggressive non-Hodgkin's lymphoma.* Blood 1997; 90: 244-251.
49. Martinka M, Corneau T, Foyle A, Anderson D, Greer W. *Prognostic significance of t(14;18) and bcl-2 expression in follicular small cleaved cell lymphoma and diffuse large cell lymphoma.* Clin Invest Med 1997; 20: 364-370.
50. Sánchez E, Chacón I, Plaza MM, Muñoz E, Cruz MA, Martínez B, López L, Martínez-Montero JC, Orradre JL, Sáez AI, García JF, Piris MA. *The clinical outcome in diffuse large B-cell lymphoma is dependent on the relationship between different cell cycle regulator proteins.* J Clin Oncol 1998; en prensa.
51. Zucca E, Bertoni F, Bosshard G y cols. *Clinical significance of bcl-2 (MBR)/JH rearrangement in the peripheral blood of patients with diffuse large B-cell lymphomas.* Ann Oncol 1996; 7: 1023-1027.
52. Tsujimoto Y, Jaffe E, Cossman J, Gorham J, Nowell PC, Croce CM. *Clustering of breakpoints on chromosome 11 in human neoplasms with the t(11;14) chromosome translocation.* Science 1985; 315: 340-343.
53. Williams ME, Swerdlow SH, Meeker TC. *Chromosome t(11;14) breakpoints in centrocytic lymphoma are highly localized at the bcl-1 major translocation cluster.* Leukemia 1993; 7: 1437-1439.
54. Rimokh R, Berger F, Delsol G y cols. *Detection of the chromosomal translocation t(11;14) by polymerase chain reaction in mantle cell lymphomas.* Blood 1994; 83: 1871-1876.
55. Molot RJ, Meeker TC, Wittwer CT y cols. *Antigen expression and polymerase chain reaction amplification of mantle cell lymphoma.* Blood 1994; 83: 1626-1630.
56. Pinyol M, Campo E, Nadal A y cols. *Detection of the bcl-1 rearrangements at the major translocation cluster in frozen and paraffin-embedded tissues of mantle cell lymphomas by polymerase chain reaction.* Am J Clin Pathol 1996; 105: 532-537.
57. Brizard F, Dreyfus B, Guilhot F, Tanzer J, Brizard A. *11q13 rearrangement in B cell chronic lymphocytic leukemia.* Leuk Lymphoma 1997; 25: 539-543.
58. Bigoni R, Negrini M, Veronese ML, Cuneo A, Castoldi GL, Croce CM. *Characterization of t(11;14) translocation in mantle cell lymphoma by fluorescent in situ hybridization.* Oncogene 1996; 13: 797-802.
59. Bosch F, Jares P, Campo E y cols. *PRAD-1/cyclin D1 gene overexpression in chronic lymphoproliferative disorders: A highly specific marker of mantle cell lymphoma.* Blood 1994; 84: 2726-2732.
60. Andersen NS, Donovan JW, Borus JS y cols. *Failure of immunologic purging in mantle cell lymphoma assessed by polymerase chain reaction of minimal residual disease.* Blood 1997; 90: 4212-4221.
61. Sánchez L, Algara P, Villuendas R, Martínez P, Orradre JL, Morente M, Piris MA. *B-cell clonal detection in gastric low-grade lymphomas and regional lymph nodes: An immunohistologic and molecular study.* Am J Gastroenterol 1993; 88: 413-419.
62. Wotherspoon AC, Dogliani C, Diss TC, Pan L, Mpschini A, Boni M, Isaacson P. *Regression of primary low-grade B-cell gastric lymphoma of mucosa-associated lymphoid tissue type after eradication of Helicobacter pylori.* Lancet 1993; 342: 575-577.
63. Fend F, Schwaiger A, Weyrer K, Propst A, Mairinger T, Umlauf T, Judmaier G, Grünwald K. *Early diagnosis of gastric lymphoma:*

- Gene rearrangement analysis of endoscopic biopsy samples.* Leukemia 1994; 8: 35-39.
64. Savio A, Franzin G, Wotherspoon AC y cols. *Diagnosis and posttreatment follow-up of Helicobacter pylori-positive gastric lymphoma of mucosa-associated lymphoid tissue: Histology, polymerase chain reaction or both?* Blood 1996; 87: 1255-1260.
65. Calvert R, Evans PA, Randerson JA, Jack AS, Morgan GJ, Dixon MF. *The significance of B-cell clonality in gastric lymphoid infiltrates.* J Pathol 1996; 180: 26-32.
66. Hsi ED, Greenson JK, Singleton TP, Siddiqui J, Schnitzer B, Ross CW. *Detection of immunoglobulin heavy chain gene rearrangement by polymerase chain reaction in chronic active gastritis associated with Helicobacter pylori.* Hum Pathol 1996; 27: 290-296.
67. Lindae ML, Abel EA, Hoppe RT, Wood GS. *Poikilodermatous mycosis fungoides and atrophic large-plaque parapsoriasis exhibit similar abnormalities of T-cell antigen expression.* Arch Dermatol 1988; 124: 366-372.
68. Isaacson PG, Norton AJ (Eds.). *Cutaneous lymphoma.* En: Extranodal Lymphomas. Churchill Livingstone, Edinburgh 1994; 131-191.
69. Ashton-Key M, Diss TC, Du MQ, Kirkham N, Wotherspoon A, Isaacson PG. *The value of the polymerase chain reaction in the diagnosis of cutaneous T-cell infiltrates.* Am J Surg Pathol 1997; 21: 743-747.
70. Bottaro M, Berti E, Biondi A, Migone N, Crosti L. *Heteroduplex analysis of T-cell receptor gamma gene rearrangements for diagnosis and monitoring of cutaneous T-cell lymphomas.* Blood 1994; 83: 3271-3278.
71. Weiss LM, Chang KL. *Association of the Epstein-Barr Virus with hematomalymphoid neoplasia.* Adv Anat Pathol 1996; 3: 1-15.
72. Ambinder RF, Mann RB. *Detection and characterization of Epstein-Barr virus in clinical specimens.* Am J Pathol 1994; 145: 239-252.
73. Chang KL, Chen YY, Shibata D, Weiss LM. *In situ hybridization methodology for the detection of EBV EBER-1 RNA in paraffin-embedded tissues, as applied to normal and neoplastic tissues.* Diag Mol Pathol 1992; 1: 246-255.
74. Chang Y, Cesarman E, Pessin MS, Lee F, Culpepper J, Knowles DM, Moore PS. *Identification of herpesvirus-like DNA sequences in AIDS-associated Kaposi's sarcoma.* Science 1994; 266: 1865-1870.
75. Soulier J, Grollet L, Oksenhendler E y cols. *Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus-like DNA sequences in multicentric Castlemann's disease.* Blood 1995; 86: 1276-1280.
76. Luppi M, Barozzi P, Maiorana A y cols. *Human Herpesvirus-8 DNA sequences in human immunodeficiency virus-negative angioimmunoblastic lymphadenopathy and benign and increased vascularity.* Blood 1996; 87: 3903-3909.
77. Rettig MB, Ma HJ, Vescio RA y cols. *Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus infection of bone marrow dendritic cells from multiple myeloma patients.* Science 1997; 276: 1851-1854.