

Análisis de clonalidad en el linfoma cerebral primario mediante PCR

Mercedes García Villanueva, Almudena Santón Roldán, Natalia Camarasa Lillo, Paloma Martín Acosta, Carmen Bellas Menéndez

Servicio de Anatomía Patológica. Hospital Ramón y Cajal. Universidad de Alcalá. Madrid.

RESUMEN

Introducción: Establecer la diferencia entre poblaciones linfocitarias monoclonales y reactivas puede ser de gran ayuda en el diagnóstico del linfoma cerebral primario (LCP), especialmente en pequeñas muestras obtenidas por biopsia estereotáxica. El objetivo de este estudio ha sido evaluar la frecuencia de reordenamientos clonales del gen de la cadena pesada de las inmunoglobulinas (IgH) en el LCP. **Métodos:** Se han estudiado 24 LCP, 16 en pacientes inmunocompetentes y 8 asociados a SIDA. Mediante el método de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se analizó el gen IgH utilizando ADN extraído de tejido fijado en formol e incluido en parafina. Para ello se amplificaron las regiones CDR II y CDR III de dicho gen mediante cebadores consenso para las regiones V_H (Fr2 y Fr3, respectivamente) y J_H (LJH y VLJH). **Resultados:** El análisis molecular confirmó la existencia de clones de células B en un importante número de casos de LCP. Al usar ambas combinaciones de cebadores (Fr2 y Fr3) se detectaron reordenamientos clonales del gen IgH en 19 de los 24 casos (79%), observándose en 5 de éstos un patrón biclonal debido a la presencia de dos bandas discretas con Fr3. La frecuencia de detección de clonalidad fue similar en los dos grupos de pacientes. **Conclusiones:** Nuestras observaciones apoyan que el estudio de la clonalidad del gen IgH mediante PCR en biopsias incluidas en parafina es de utilidad en el diagnóstico del LCP.

Palabras clave: Linfoma cerebral primario, reordenamiento de genes de IgH, reacción en cadena de polimerasa.

ABSTRACT

Introduction: To determine differences between monoclonal and reactive lymphoid populations may be a great help in the diagnosis of primary brain lymphoma (PBL).

The aim of this study was to evaluate the frequency of clonal immunoglobulin heavy chain (IgH) gene rearrangements in PBL. **Methods:** Twenty-four PBL were studied, 16 of them from immunocompetent patients and another 8 from AIDS patients. DNA was extracted from formalin-fixed, paraffin-embedded tissue. IgH gene rearrangements were analyzed using the polymerase chain reaction method (PCR) by amplifying CDRII and CDRIII regions using consensus primers directed to framework regions VH (Fr2 and Fr3 respectively) and JH (LJH and VLJH). **Results:** Molecular analysis confirmed the existence of B-cell clones in an important number of cases of PBL. Using both primer combinations (Fr2 and Fr3) we detected clonal IgH gene rearrangements in 19 of the 24 cases (79%), and 5 of these cases showed a biclonal pattern due to the presence of two discrete bands with Fr3. The frequency of detection of clonality was similar in both groups of patients. **Conclusions:** Our data confirm that PCR analysis of IgH rearrangements in paraffin-embedded biopsies is useful in the diagnosis of PBL.

Keywords: Primary brain lymphoma, IgH gene rearrangement, polymerase chain reaction.

INTRODUCCIÓN

La incidencia del linfoma cerebral primario (LCP) ha aumentado en los últimos años, tanto en pacientes inmunocompetentes como inmunodeprimidos, representando del 2% al 6% de todas las neoplasias intracraneales (1). Este incremento ha sido particularmente notable en los pacientes con SIDA, en los que la incidencia del LCP era varios miles de veces mayor a la de la población general (2). El tratamiento antirretroviral, sin embargo, ha disminuido de forma importante la incidencia del LCP en este grupo de pacientes (3), lo que podría estar relacionado con la posible acción patogénica del virus de Epstein-Barr, el cual está presente en prácticamente el 100% de los LPC en SIDA, y la necesidad para su desarrollo de un importante deterioro del sistema inmunitario (1,4-5).

En cuanto a su morfología, los LPC son linfomas no Hodgkin difusos, generalmente de células grandes (alto grado de malignidad) y por lo general de estirpe B (6). Smith y cols. (7) confirmaron el origen B clonal del LCP tras el análisis del gen de la cadena pesada de las inmunoglobulinas mediante Southern Blotting, mostrando que todos los casos estudiados correspondían a poblaciones monoclonales de células B.

En los últimos años, la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR), que tiene la ventaja de ser diez veces más sensible en la detección de reordenamientos clonales que la técnica de Southern Blotting, se ha convertido en el método más usado para los estudios de linaje y clonalidad en las enfermedades linfoproliferativas. La PCR es un excelente método para la demostración de clonalidad B en material extraído de parafina (8), siendo escasos los estudios moleculares del gen IgH en el LCP (9-11). Dicho método puede ser útil en este grupo de tumores cuando se plantea un diagnóstico diferencial entre infiltrados linfocitarios reactivos y neoplásicos, sobre todo en casos de pequeñas biopsias estereotáxicas. El objetivo de nuestro estudio ha sido analizar mediante PCR la frecuencia de clonalidad B en una serie de 24 LCP en pacientes tanto inmunodeprimidos como inmunocompetentes.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se han estudiado 24 casos de LCP, 16 correspondientes a pacientes inmunocompetentes y 8 desarrollados en pacientes con SIDA. Las muestras se obtuvieron por biopsia quirúrgica en 14 casos y por biopsia estereotáxica en los 10 restantes. Veintidós correspondían a linfomas difusos de células grandes B y 2 a linfomas de bajo grado de células B (clasificación OMS) (12).

El tejido fue fijado en formol e incluido en parafina, seleccionándose en cada caso un bloque representativo del tumor. El ADN se extrajo a partir de secciones histológicas de 5(m según el método estándar de Wright y Manos (13). En todos los casos se comprobó previamente la integridad del ADN mediante la amplificación del gen de la β -globina.

El análisis del gen IgH se llevó a cabo siguiendo dos protocolos de PCR semi-acotadas que permiten amplificar las regiones CDRII y CDR III del gen IgH. Para ello se utilizaron cebadores consenso para las regiones V_H (Fr2 y Fr3) y para la región J_H (LJH y VLJH).

En cada ronda de PCR la mezcla de reacción consistía en 10 mM Tris-HCl, 50 mM KCl, 200 μ M dNTPs, 0,5 μ M de cada cebador y 1 unidad de Taq polimerasa en un volumen de 50 μ l. La concentración de MgCl se optimizó para cada reacción del siguiente modo: 9 mM y 4,5 mM para Fr3/JH4; 5 mM y 2 mM para Fr2/JH. La primera ronda de reacciones (Fr3/LJH y Fr2/LJH) se realizó sistemáticamente con 5 μ l y 2 μ l del sobrenadante resultante de la extracción de ADN de cada caso, y la segunda ronda (Fr3/VLJH y Fr2/VLJH) con 1 μ l del producto de la primera amplificación.

Las condiciones de PCR para Fr3/LJH (30 ciclos) y Fr3/VLJH (20 ciclos) fueron las siguientes: 93°C durante 45 segundos, 50°C durante 45 segundos y 72°C durante 110 segundos. Las condiciones de PCR para Fr2/LJH (30 ciclos) y Fr2/VLJH (20 ciclos) fueron: 1 minuto a 94°C, 1 minuto a 55°C y 1 minuto a 72°C.

En todas las reacciones se incluyó un control clonal consistente en ADN extraído de la línea celular Raji, un control policlonal consistente en ADN extraído de una amígdala reactiva y un blanco que contenían todos los componentes de la mezcla de reacción excepto el ADN. Los productos de amplifi-

cación se sometieron a electroforesis en geles de poliacrilamida al 10% (Fr3) y al 5% (Fr2) durante 1 hora a 130 voltios, se tiñeron con bromuro de etidio y se visualizaron bajo luz ultravioleta. Para evitar falsos positivos, se asignó el patrón clonal cuando los resultados de la PCR coincidían en ambas muestras (5 µl y 2 µl del ADN objeto de estudio).

RESULTADOS

La amplificación de la región CDRIII (Fr3/JH) detectó un patrón clonal en 15 de los 24 casos (62,5%) y policlonal en los 9 restantes (37,5%). El 62,25% (10/16) de los tumores con patrón clonal correspondían a pacientes inmunocompetentes y también el 62,25% (5/8) a linfomas asociados a SIDA (fig. 1).

Tras la amplificación de la región CDRII (Fr2/JH) se encontró un patrón clonal en 17 de los 24 casos (70,8%), un patrón policlonal en 4 casos (16,6%) y en 3 casos (12,5%) no hubo amplificación. Se observaron reordenamientos clonales en 11 de los 16 casos (68,7%) de los linfomas desarrollados en pacientes inmunocompetentes y en 6 de los 8 casos (75%) de los linfomas asociados a SIDA (fig. 2).

En conjunto, la combinación de los resultados obtenidos de la amplificación de ambas regiones (Fr2 y Fr3) en este grupo de LCP permitió asignar un patrón clonal a 19 de los 24 casos (79%). El 80% (8/10) de las biopsias estereotáxicas mostraron clonalidad B. Los 5 casos restantes fueron policlonales (21%). El porcentaje de clonalidad en los LCP asociados a SIDA fue del 75% (6/8) mientras que en los no asociados fue del 81,25% (13/16). El 77,7% (17/22) de los linfomas de células grandes y el 100% (2/2) de los linfomas de bajo grado fueron clonales.

En 5 de los casos clonales, 4 de ellos en pacientes con SIDA (66,6%), el patrón de reordenamiento obtenido con Fr3/JH mostró la presencia de dos bandas discretas comprendidas dentro del rango de tamaños esperado (80-120 pares de bases).

DISCUSIÓN

Nuestros datos confirman que la mayoría (79%) de los 24 LCP estudiados en esta serie

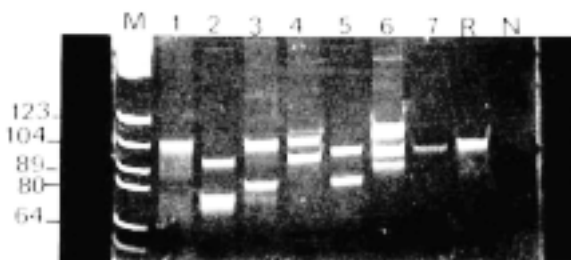


Fig. 1: Gel de poliacrilamida al 10% teñido con bromuro de etidio mostrando los productos de la PCR Fr3/JH. Calle M: marcador de peso molecular, se indican los tamaños de las bandas en pares de bases; calles 1-7: reordenamientos clonales del gen IgH en pacientes con LCP; calle R: control monoclonal correspondiente a la línea celular B Raji; calle N: muestra sin ADN. En las calles 2-5 se observa un patrón biclonal.

son proliferaciones de células B clonales y que el método de la PCR es útil, aún cuando se aplica a ADN extraído de tejido fijado en formol e incluido en parafina. El rango de detección de los reordenamientos del gen IgH ha sido similar en el grupo de LCP con SIDA y en el de pacientes inmunocompetentes.

El porcentaje de reordenamientos clonales del gen IgH detectado en nuestros casos de LCP de células grandes (77,27%) es similar al descrito en los linfomas no Hodgkin de células grandes B nodales utilizando la técnica de PCR (14). Los dos casos de LCP de bajo grado incluidos en nuestra serie también mostraron reordenamientos clonales del gen IgH.

La detección de un patrón policlonal en el 22,7% de los casos (5/22) de LCP de células

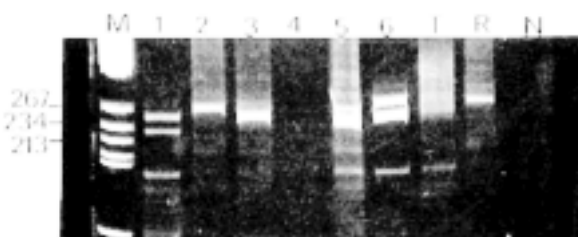


Fig. 2: Gel de poliacrilamida al 5% teñido con bromuro de etidio mostrando los productos de la PCR Fr2/JH. Calle M: marcador de peso molecular, se indican los tamaños de las bandas en pares de bases; calles 1-6: reordenamientos clonales del gen IgH en pacientes con LCP, excepto en la calle 4 en la que no se observan productos de PCR; calle T: control policlonal (ADN extraído de amígdala); calle R: control monoclonal correspondiente a la línea celular B Raji; calle N: muestra sin ADN.

grandes podría relacionarse con la presencia frecuente de hipermutaciones somáticas en los genes V_H que se ha descrito recientemente en este tipo de linfomas (10). Cuando estas mutaciones somáticas ocurren en la zona de unión de los cebadores, los reordenamientos clonales del gen IgH no pueden ser detectados.

La presencia de dos bandas clonales, mucho más frecuente en pacientes con SIDA (66,6%) que en los inmunocompetentes (7,6%), podría indicar el reordenamiento de las dos copias del gen IgH. Otra posibilidad, podría ser la existencia de una proliferación linfoide biclonal relacionada con la implicación del VEB en la etiología del LCP, principalmente en los casos asociados al SIDA, tal como han sugerido otros autores (9).

Como conclusión, los hallazgos de nuestro estudio apoyan que la PCR sobre ADN extraído de biopsias incluidas en parafina es un buen método para la demostración de clonalidad B en el LCP. Estos hallazgos demuestran que dicha técnica podría ser de gran utilidad en aquellos casos en los que se plantea un diagnóstico diferencial entre proliferaciones linfocitarias reactivas y neoplásicas, fundamentalmente en pequeñas muestras obtenidas por biopsia estereotáxica.

Agradecimientos

Este trabajo ha sido parcialmente financiado por el proyecto FIS 94/0483.

BIBLIOGRAFÍA

1. Camilleri-Bröet S, Davi F, Feuillard J, et al. AIDS-related primary brain lymphomas: histopathologic and immunohistochemical study of 51 cases. *Human Pathol* 1997; 28 (3): 367-374.
2. Cote TR, Manns A, Hardy CR, et al. Epidemiology of brain lymphoma among people with or without acquired immunodeficiency syndrome. *J Natl Cancer Inst* 1996; 88: 675-679.
3. Ribera JM. Epidemiología, etiología y patogenia de los linfomas en pacientes infectados por el VIH. En: Aran, editor. *Linfomas en pacientes infectados por el virus de la inmunodeficiencia humana*. España: Díaz J, Berenguer J, Miralles P; 2000. p. 35-47.
4. García Villanueva MG, Santón A, Manzanal A, Pascual A, Martínez JC; Bellas C. Primary brain lymphomas in AIDS and immunocompetent patients: immunohistochemical and molecular features and study of the association with Epstein Barr virus. *Neuropathol Appl Neurobiol* 1999; 25 (suppl): 55-56.
5. Mac-Mahon EME, Glass JD, Haywasrd JD, et al. Epstein-barr virus in AIDS-related primary central nervous system lymphoma. *Lancet* 1991; 338: 969-997.
6. Rosai, J, editor. *Tumors of the central nervous system*. Washington: Armed Forces Institute of Pathology; 1994.
7. Smith WJ, Garson JA, Bourne SP, Kemshead JT, Coakham HB. Immunoglobulin gene rearrangement and antigenic profile confirm B cell origin of primary cerebral lymphoma and indicate a mature phenotype. *J Clin Pathol* 1988; 41: 128-132.
8. Diss TC, Pan L, Peng H, Wotherspoon AC, Isaacson PG. Sources of DNA for detecting B cell monoclonality using PCR. *Clin Pathol* 1994; 47: 493-496.
9. Schmith-Graff A, Hummel M, Anagnostopoulos I, Stoltenburg G, Stein H. AIDS-related primary brain lymphoma. Immunophenotypical and molecular genetic characterization of stereotactic biopsies and of autopsy and cerebrospinal fluid samples. *Pathology* 1995; 16 (1): 75-80.
10. Sekita T, Tamaru JI, Kaito K, Katayama T, Kobayashi M, Mikata A. Primary central nervous system lymphomas express Vh genes with intermediate to high somatic mutations. *National Library of Medicine* 2001; 41 (3-4): 377-385.
11. Julien S, Radosavljevic M, Labouret N, Camilleri Broet S, Davi F, Raphael M, et al. AIDS primary central nervous system lymphoma: molecular analysis of the expressed VH genes and possible implications for lymphomagenesis. *J Immunol* 1999; 162 (3): 1551-1558.
12. Harris NL, Jaffe ES, Diebold J et al. The World Health Organization Classification of neoplastic diseases of the hematopoietic and lymphoid tissues. Report of the Clinical Advisory Committee Meeting Airlie House, Virginia, November 1997. *Annals of Oncology* 1999; 10: 1419-1432.
13. Wright DK, Manos MM. Sample preparation from paraffin-embedded tissues. In: *PCR protocols: a guide to methods and applications*. San Diego: Academic press, 1990: 153-158
- 14.- Tamaru J, Hummel M, Zemlin M, Kalvelage B, Stein H. Hodgkin's disease with a B cell Phenotype often shows a VDJ rearrangement and somatic mutations in Vh genes. *Blood* 1994; 84: 708-715.