

Universitat Autònoma de Barcelona
Facultat de Medicina
Departament de Ciències Morfològiques



Universitat Autònoma de Barcelona

**" ESTUDI DE CÈL.LULES T REGULADORES
EN LIMFOMES MALT GÀSTRICS:
INFLUÈNCIA EN LA RESPOSTA AL
TRACTAMENT I EN L'EVOLUCIÓ"**

Memòria presentada per

MAR GARCIA GARCIA

per optar al grau de Doctor de la Universitat Autònoma de Barcelona

Aquesta tesi ha estat realitzada sota la direcció dels Drs. Sergi Serrano Figueras i Antonio Salar Silvestre al Departament d'Anatomia Patològica de l'Hospital del Mar

Tesi adscrita al Departament de Ciències Morfològiques de la Facultat de Medicina de la Universitat Autònoma de Barcelona

Vist i plau dels codirectors de tesi:

Dr. Sergi Serrano

Dr. Antonio Salar



Universitat Autònoma de Barcelona

Els sota-signants, SERGI SERRANO, doctor en Medicina, cap de servei d'Anatomia Patològica de l'Hospital del Mar i Catedràtic d'Anatomia Patològica de la Universitat Autònoma de Barcelona; i ANTONIO SALAR, doctor en Medicina, cap de secció de Limfomes del servei d'Hematologia de l'Hospital del Mar,

CERTIFIQUEN:

Que la Tesi Doctoral titulada " Estudi de cèl.lules T reguladores en limfomes MALT gàstrics: influència en la resposta al tractament i en l'evolució", presentada per MAR GARCIA GARCIA, per tal d'accedir al títol de Doctora en Medicina, ha estat realitzada sota la seva direcció, estimant que reuneix els requisits formals i científics adients per la seva preceptiva lectura i defensa públiques.

I per a que així consti, i als efectes oportuns, signem la present certificació a Barcelona, a dia 10 de juny de 2013.

Dr. Sergi Serrano

Dr. Antonio Salar

AGRAÏMENTS

Aquesta és la part que segurament em costarà més d'escriure, i això que ara farà al voltant de 5 anys que vàrem començar amb aquest treball.

Fora del temps que vaig fer les amèriques amb el Professor Medeiros, he crescut aquí. Vaig arribar éssent estudiant, i després he continuat com a resident i ara com a metgessa adjunt. Durant aquests anys, es podrien diferenciar dos aspectes. A nivell personal m'han passat moltes coses, sobretot malalties greus de familiars molt propers, així com la mort dels avis. Vull agrair l'ajuda i el suport prestats en aquest aspecte per part de tothom.

Pel que fa a la part més professional, en primer lloc volia donar les gràcies als meus directors de tesi, el Dr Serrano i el Dr Salar, i a tota la gent que ha col.laborat en major o menor mida en fer aquest treball possible.

Dr Serrano: Li agraeixo la confiança des de temps inmemorials, la paciència i el temps dedicat en transmetre'm el seu coneixement i en com ser una bona professional, en com fer la feina ben feta, i també el suport rebut una vegada vaig haver de començar a signar els meus propis diagnòstics.

Dr Salar: Siempre has buscado tiempo para que esta tesis tuviera un final, y la perseverancia en publicar el trabajo en una buena revista. I tu apoyo en los momentos más pesimistas y tu arte en la racionalización ante algunas situaciones. Muchismas (que es más que mucho) gracias.

Molt importat ha estat la feina aportada també per l'equip del laboratori de biologia molecular, en especial a la Mari, que és la que més ha treballat en aquest projecte i m'ha ajudat en la redacció de la part de materials i mètodes, sempre supervisada per la Bea Bellosillo. Bea, muchas gracias también por tu tiempo, que siempre te ha sobrado para mi, tu amistad, y tu saber hacer en todo tipo de situaciones.

Un altre punt bàsic del treball ha estat l'estudi immunohistoquímic. Gràcies Ariadna per ensenyar-me a tallar blocs de parafina i per acompanyar-me a

urgències el dia que vaig tallar el meu dit enlloc del teixit. I a tu Teresa, moltes gràcies per la teva paciència i ajuda en la posta a punt dels anticossos, i pels teus coneixements que has intentat transmetre'm. Et trobaré a faltar.

També vull agrair a la Marta i a la Blanca la seva col.laboració en la part del treball que té a veure amb l'estudi citogenètic.

Francesc, sort que algú entén això tant complicat de l'estadística. Sense la teva ajuda hagués sigut impossible treure alguna conclusió objectiva de les dades que fos suficientment atractiva per tal de vendre el treball!

D'altra banda, en aquests deu anys de formació i feina, hi ha altres persones que m'han ajudat indirectament a arribar al dia d'avui. De totes elles, no m'agradaria oblidar ningú. Començant per la meva família. Gràcies a tots vosaltres, als que hi sou i als que ja no hi sou però també en sou partíceps.

Als Drs Corominas, Munnè, Barranco, Alameda, Lloreta, Mariñoso, als meus companys i companyes de residència alguns d'ells encara aquí (Mar, Lara, Javi, Núria). Moltes gràcies pel vostre suport i amiatat. Mar, no havia conegut cap altra Mar abans que tu, ara sembla que el nom prolifera. Gràcies per ajudar-me quan t'he deixat i per tot el que hem compartit i compartirem. També donar les gràcies a les noves incorporacions, Belen, Montse, Conxa, als tècnics del laboratori i sobretot als Jordi's. M'heu pres el pèl tantes vegades com heu pogut, tantes potser com també m'heu fet riure.

A les companyes de citologia hematològica, Lourdes, Encarna, Dra Woessner, Leonor, i sobretot a l'Ana, amb la que hem viscut experiències i viatges que encara de tant en tant recordem amb un somriure. Ana, gràcies també pel teu temps i ajuda en el dia a dia, tant personal com laboral.

I al servei d'Hematologia, i membres del grup de recerca. Encara recordo la primera sessió que vaig haver de presentar ara farà 5 anys, en recordo la sensació de pànic però no els casos. Us puc dir que ara estic còmoda i crec

que és perquè sempre m'heu recolzat i ajudat a millorar en la meva feina, i m'heu considerat com una més del vostre equip.

Aquest treball ha estat finançat gràcies a la següent ajuda FIS/Instituto Carlos III/FEDER PS07/0586)

Aquest treball ha generat la següent publicació:

1. García M, Bellosillo B, Sánchez-González B, García-Payarols F, Seoane A, Ferrer AM, Gimeno E, Barranco LE, Torner A, Solé F, Besses C, Serrano S, Salar A. Study of regulatory T-cells in patients with gastric malt lymphoma: influence on treatment response and outcome. PLoS One. 2012;7(12):e51681.

Al Pedro, i a tu, petit, que t'estàs fent una
personeta i que ja tinc ganes de tenir-te

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	1
A. LINFOMA MALT GÁSTRICO	1
1. Introducción	1
2. Estadío clínico y tratamiento	2
3. Patología	6
a. Lesiones precursoras	6
b. Linfoma MALT gástrico	9
b.1. Morfología	9
b.2. Inmunofenotipo	13
b.3. Clonalidad	16
b.4. Citogenética	16
b.4.1. t(11;18)(q21;q21)	16
b.4.2. t(1;14)(p22;q32), t(1;2)(p22;p12)/Ig-BCL10	17
b.5. Enfermedad residual	18
4. Patogenia	19
B. LINFOCITOS T REGULADORES Y SU RELACIÓN CON LA EVOLUCIÓN DE LOS LINFOMAS B	22
1. Introducción	22
2. Desarrollo de células T	22
3. Adquisición de la tolerancia inmune central: proceso de selección positiva y selección negativa	23
4. Tolerancia inmune periférica y linfocitos T reguladores (células Tregs)	24
5. Células Tregs y cáncer	27
6. Células Tregs y linfoma	27
2. HIPÓTESIS DE TRABAJO	30
3. OBJETIVOS	32
4. MATERIAL Y MÉTODOS	33
4.1. MATERIAL	33

4.1.1. Diseño del estudio/Esquema de trabajo	33
4.1.2. Población de Estudio	34
4.1.3. Muestras de Estudio	35
4.2. MÉTODOS	36
4.2.1. Obtención de la muestra	36
4.2.2. Procesado de las muestras	36
4.2.2.1. Protocolo de fijación	36
4.2.2.2. Protocolo de inclusión en parafina	37
4.2.2.3. Preparación de los bloques de parafina	37
4.2.2.3.1. Corte de los bloques de parafina para el diagnóstico histológico e inmunohistoquímico	38
4.2.3. Evaluación de las biopsias gástricas	38
4.2.4. Técnica inmunohistoquímica	39
4.2.4.1. Desenmascaramiento antigénico	39
4.2.4.2. Inhibición de la peroxidasa endógena e incubación del anticuerpo primario	40
4.2.4.3. Sistema de visualización	40
4.2.5. Estudios Moleculares	41
4.2.5.1. Extracción de DNA de las muestras parafinadas	41
4.2.5.2. Extracción de DNA de las muestras congeladas	42
4.2.5.3. Lectura DNA en el Nanodrop ND-1000	43
4.2.5.4. Extracción de RNA de las muestras congeladas	44
4.2.5.5. Técnica de la retrotranscripción (obtención de cDNA a partir de RNA)	45
4.2.5.6. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	46
4.2.5.6.1. PCR Control de calidad del DNA obtenido	48
4.2.5.7. Análisis de la translocación t(11;18) por RT-PCR	50
4.2.5.8. Análisis de las regiones FR1, FR2, FR3 y reordenamientos incompletos de los genes que codifican para la cadena pesada de las inmunoglobulinas (reordenamientos DH-JH)	52
4.2.5.9. Listado de los primers utilizados	53
4.2.5.10. Electroforesis en gel de agarosa	55
4.2.5.11. Análisis de los fragmentos	56

4.2.5.12. Estudio de alteraciones citogenéticas al diagnóstico mediante técnicas de hibridación in situ fluorescente sobre tejido parafinado	57
4.2.5.13. Sondas de FISH utilizadas en el estudio	60
4.2.5.13.1. Vysis LSI API2/MALT1 t(11;18)(q21;q21) Dual Color, Dual Fusion Translocation Probe	60
4.2.5.13.2. Sonda BCL10 DNA Probe, Fluorochrome-Conjugated (Dako)	61
4.2.6. Recogida y análisis de datos	61
5. RESULTADOS	63
A. Patrón de distribución de células T y B en gastritis crónica, linfoma MALT gástrico y linfoma difuso de célula grande B (LDCBG) gástrico transformado de MALT	63
B. Evaluación de la respuesta a la terapia	64
C. Cinética de las células tumorales CD20+ y de las células intratumorales FOXP3+ y CD3+ durante el seguimiento	66
6. DISCUSIÓN	71
7. CONCLUSIONES	78
8. BIBLIOGRAFIA	79
9. ANEXO	83
9.1. García M, Bellosillo B, Sánchez-González B, García-Payarols F, Seoane A, Ferrer AM, Gimeno E, Barranco LE, Torner A, Solé F, Besses C, Serrano S, Salar A. Study of regulatory T-cells in patients with gastric malt lymphoma: influence on treatment response and outcome. PLoS One. 2012;7(12):e51681.	

1. INTRODUCCIÓN

A. LINFOMA MALT GÁSTRICO

1. Introducción

El linfoma de la zona marginal de tipo MALT (mucosa associated lymphoid tissue) es un tipo de linfoma B no Hodgkin de localización extraganglionar. Así, la principal afectación tumoral reside en un territorio extraganglionar relacionado con el tejido linfoide asociado a mucosas. En este contexto la afectación ganglionar es nula o bien secundaria¹.

El término de linfoma MALT fue originalmente propuesto por Isaacson y Wright en 1983 para designar a un conjunto de linfomas derivados del tejido linfoide asociado a mucosas de origen intestinal². Posteriormente, el uso de este término se extendió a otros linfomas B de célula pequeña de origen extraganglionar cuya histología recapitulaba las placas de Peyer.

Estos linfomas inicialmente fueron clasificados como una variante extranodal del linfoma marginal (clasificación REAL), mientras que desde la clasificación de la Organización Mundial de la Salud (OMS) de 2001 son considerados como una entidad aparte^{3,4}.

El linfoma de la zona marginal de tipo MALT representa alrededor el 7-8% de linfomas B no Hodgkin y más de la mitad de los linfomas gástricos primarios¹. Con menor frecuencia, este tipo de linfoma se origina también en piel, glándula salival, pulmón, tiroides, hígado y anejos oculares, entre otras muchas localizaciones.

La mayoría de los casos aparece en individuos adultos con una edad media de 61 años, con un ligero predominio en mujeres. Generalmente están asociados a una estimulación crónica previa del sistema inmune, ya sea por un proceso infeccioso crónico o por un proceso autoinmune según la localización (tabla 1.1). En cuanto al linfoma MALT gástrico, parece haber una incidencia mayor en el nordeste de Italia probablemente relacionado con una alta prevalencia de gastritis crónica asociada a infección por *Helicobacter pylori* (HP) en esta zona. Un subtipo especial de linfoma MALT intestinal, conocido como enfermedad inmunoproliferativa del

intestino delgado (IPSID), ocurre también en esta región, en una parte del subcontinente indio y en la zona de El Cabo, en Sudáfrica.

Infecciones
<i>Helicobacter pylori</i> en el linfoma gástrico
<i>Borrelia burgdorferi</i> en linfoma cutáneo
<i>Clamidia psittaci</i> en linfoma ocular
Bacterianas (<i>Campilobacter jejuni</i>) y parasitarias diversas en la enfermedad inmunoproliferativa del intestino delgado
<i>Achromobacter (Alcaligenes) xyloSIDans</i> en linfoma pulmonar
Patologías autoinmunes
<i>Síndrome de Sjögren</i> en linfomas de glándulas salivales y de pulmón
<i>Tiroiditis de Hashimoto</i> en linfomas de tiroides

Tabla 1.1. Patología condicionante en los linfomas extraganglionares primarios de tipo MALT según la localización.

En cuanto a la presentación clínica, ésta es inespecífica. Las manifestaciones clínicas más frecuentes del linfoma MALT gástrico son las propias de una dispepsia o síntomas sugestivos de enfermedad ulcerosa péptica. Son menos frecuentes la pérdida de peso y los vómitos, así como anemia o sangrado gastrointestinal. Los hallazgos endoscópicos más frecuentes son la presencia de úlceras y lesiones eritematosas o inflamatorias, siendo infrecuentes las lesiones tumorales (menos del 15%). El antro es la localización preferente (40%), seguida del cuerpo gástrico (12%) y el fundus (11%), y es multifocal en hasta un tercio de los casos. Se demuestra la presencia de HP en más del 90% de pacientes.

2. Estadío clínico y tratamiento

Aunque los linfomas MALT tengan buen pronóstico y un curso clínico indolente con una supervivencia a los 10 años del 90% (con excepción de los casos que se transforman en

linfoma difuso de células grandes (LDCBG) en los que la supervivencia se reduce a la mitad), se observa afectación diseminada al diagnóstico en un 30% de los MALT gástricos y de hasta un 50% en linfomas MALT no gástricos^{31,32}. Por este motivo, se cree que en todos los pacientes con linfoma MALT se debería proceder a un estudio de extensión más exhaustivo (incluir estudios de imagen de glándulas salivares y lacrimales, estudio de ORL, fibrogastroscoopia y colonoscopia con múltiples biopsias)³³. En el caso del linfoma MALT gástrico, los pacientes son sometidos a una biopsia de médula ósea, que se encuentra afectada entre el 0 y el 15% de los casos según las series.

Los sistemas de estadiaje más comúnmente utilizados en linfomas del tracto gastrointestinal quedan descritos en la tabla 2.1. Éstos han desplazado al sistema de estadiaje de Ann Arbor modificado por Mushoff y utilizado clásicamente en linfomas del tracto gastrointestinal y en el que se diferencian 4 estadios, y cuya equivalencia con los sistemas actuales queda reflejada también en la tabla:

- I_E: el linfoma se halla confinado en la pared del estómago o intestino:
 - o I_{1E}: afectación de mucosa y submucosa
 - o I_{2E}: afectación más allá de submucosa
- II_{1E}: invasión de ganglios linfáticos regionales contiguos al tumor primario
- II_{2E}: invasión de ganglios linfáticos regionales pero no contiguos
- III: invasión ganglionar supra e infradiafragmática
 - o III_S: afectación esplénica
- III_{E+S}: afectación esplénica y ganglionar
- IV: diseminación a médula ósea u otros órganos no linfoides

La ecoendoscopia permite una detallada determinación de la invasión tumoral de la pared gástrica, así como la detección de ganglios perigástricos patológicos⁴⁶, lo que hace que esta técnica sea recomendable en el estudio de invasión local.

Sistema Lugano		Sistema TNM adaptado		Sistema Ann Arbor
Estadio I	Localizado en tracto GI	T1 N0 M0	Mucosa, submucosa	IE
		T2 N0 M0	Muscular propia	IE
		T3 N0 M0	Serosa	IE
Estadio II				
	Extensión abdominal			
II1	Afect. ganglionar local	T1-3 N1 M0	Ganglios perigástricos	IIIE
II2	Afect. ganglionar a distancia	T1-3 N2 M0	Ganglios regionales no perigástricos	IIIE
Estadio IIE				
	Afect. órganos/tejidos adyacentes	T4 N0 M0	Invasión de estructuras adyacentes	IE
Estadio IV				
	Afect. extraganglionar diseminada o ganglionar supradiaphragmática	T1-4 N3 M0	Afect. ganglionar a ambos lados del diafragma	IIIE
		T1-4 N0-3 M1	Metástasis a distancia	IVE

Tabla 2.1. Sistemas de estadiaje para linfomas del tracto gastrointestinal.

En función del estadiaje, en nuestra práctica clínica diaria realizamos las siguientes actitudes terapéuticas, si bien, dada la ausencia de estudios aleatorizados, otros tratamientos son totalmente válidos:

- 1) En linfomas MALT localizados estadio I asociados a *H. pylori*: tratamiento erradicador triple.
- 2) En linfomas MALT localizados estadio II asociados a *H. pylori*: tratamiento erradicador triple y vigilancia estrecha. En caso de respuesta inadecuada se inicia pauta de quimioterapia +/- rituximab (fludarabina endovenosa u oral o clorambucilo, en función de la edad).

3) En linfomas MALT estadios \geq III asociados a *H. pylori*: tratamiento erradicador triple y quimioterapia +/- rituximab (fludarabina endovenosa u oral o clorambucilo, en función de la edad).

4) En linfomas MALT no asociados a *H. pylori* o recaídos/refractarios a tratamiento erradicador: monoquimioterapia +/- rituximab (fludarabina endovenosa u oral o clorambucilo, en función de la edad).

Tanto las pautas de tratamiento erradicador como los factores adversos relacionados con la mala respuesta al tratamiento erradicador pueden consultarse en las tablas que siguen (tabla 2.2. y 2.3).

Pautas de tratamiento erradicador frente al <i>Helicobacter pylori</i> (7-10 días)	
Amoxicilina 1000 mg/12 h Claritromicina 500 mg/12 h Inhibidor de la bomba de protones /12 h	Amoxicilina 500 mg/8-12 h Metronidazol 500 mg/8-12 h Inhibidor de la bomba de protones /12 h
Claritromicina 500 mg/12 h Metronidazol 500 mg/12 h Inhibidor de la bomba de protones /12 h	Metronidazol 500 mg/12 h Tetraciclina 500 mg/8 h Bismuto subcitrato 120 mg/8 h Inhibidor de la bomba de protones /12 h

Tabla 2.2. Diferentes pautas de tratamiento erradicador frente al *Helicobacter pylori*.

Factores adversos en la respuesta al tratamiento erradicador
Grado histológico
Índice proliferativo
Ganglios perigástricos
Infiltración capas profundas
Grosor de la pared gástrica > 5 mm
Profundidad de invasión tumoral determinada por ecoendoscopia
Presencia de las translocaciones t (1;14) o t (11;18) y/o expresión nuclear de bcl-10
Ausencia de infección por <i>H. pylori</i>
Enfermedad autoinmune asociada

Tabla 2.3. Factores adversos en la respuesta al tratamiento erradicador.

3. Patología

a. Lesiones precursoras

De forma paradójica, los linfomas MALT raramente se desarrollan sobre un tejido MALT nativo. Normalmente lo hacen sobre un tejido MALT que se ha formado tras un proceso inflamatorio crónico en sitios normalmente desprovistos de este tejido.

El tejido MALT nativo tiene como función principal proteger las mucosas que se encuentran en contacto directo con agentes externos y está integrado por 4 componentes principales:

1. Tejido linfoide organizado representado por las placas de Peyer en íleon terminal, el tejido linfoide del apéndice y por los folículos linfoides aislados distribuidos por la mucosa de intestino delgado, grueso y recto.
2. Células linfoides de la lámina propia del tracto gastrointestinal, fundamentalmente células plasmáticas así como algunos linfocitos T y B.
3. Linfocitos intraepiteliales T CD8+ en toda la longitud del intestino. El porcentaje de estos linfocitos disminuye en sentido distal.
4. Ganglios linfáticos mesentéricos con frecuencia caracterizados por presentar zonas marginales prominentes y zonas paracorticales poco desarrolladas.

Las placas de Peyer están constituidas por agregados nodulares de células linfoides localizados en lámina propia de íleon terminal donde dan lugar a protrusiones en forma de cúpula de la mucosa. Estos agregados se hallan integrados por folículos linfoides secundarios rodeados por una zona del manto y una zona marginal amplia constituida por células de aspecto centrocitoide o monocitoide. Esta zona marginal se extiende hasta contactar con el epitelio, dando lugar focalmente a fenómenos de epidermotropismo.

El epitelio que reviste las placas de Peyer, además de enterocitos con microvellosidades tipo «ribete en cepillo», contiene otras células especializadas denominadas células M por presentar micropliegues en su polo luminal, y que están especializadas en canalizar antígenos desde la luz intestinal hacia el tejido linfoide subyacente. Estos antígenos penetran desde el polo apical

a través de vesículas de endocitosis revestidas por clatrina y son liberados en el polo basal, proceso denominado transcitosis.

El proceso de respuesta al antígeno por parte de las placas de Peyer presenta similitudes con el que tiene lugar en los ganglios linfáticos extramesentéricos pero también peculiaridades muy notables. En ambos casos las células linfoides activadas penetran en el centro germinal y dan lugar a células de memoria, que pueden acumularse en la zona marginal y a células precursoras de las células plasmáticas. En el caso de los ganglios extramesentéricos, estos precursores viajarán por vía linfática y luego por vía sanguínea para localizarse en la médula ósea donde se diferenciarán y darán lugar a células plasmáticas. Éstas producirán fundamentalmente IgG y, en menor medida, IgA monomérica (IgA1), que pasarán al plasma y originarán una respuesta sistémica. Por su parte, los precursores de las células plasmáticas generados en las placas de Peyer viajarán por vía linfática a los ganglios mesentéricos y de allí, a través del conducto torácico, al torrente circulatorio para finalmente localizarse en la lámina propia del estómago, intestino delgado e intestino grueso, así como en otras mucosas. Ello es posible debido a que estas células linfoides presentan receptores de localización (homing receptors) que son reconocidos por sus ligandos (adhesinas) situados en las células endoteliales de las vénulas de la lámina propia de las mucosas. Una vez alcanzada la lámina propia de la mucosa estas células linfoides darán lugar a células plasmáticas que fundamentalmente producirán IgA dimérica (IgA2). La IgA dimérica se unirá a receptores para inmunoglobulinas poliméricas situados en la superficie basolateral de los enterocitos, y a través de un proceso de transcitosis, será transportada al polo luminal donde enzimas proteolíticas la separarán del receptor para así pasar a formar parte del glicocalix. El segmento del receptor que queda unido a la IgA2 se denomina componente secretor y añade estabilidad a la IgA dimérica ya de por sí más estable que la monomérica, circunstancia que la hace mucho más resistente a las enzimas proteolíticas de la luz gastrointestinal. La IgA dimérica, que no es transportada a la luz intestinal, pasa al plasma a través de los enterocitos. La IgA2 del plasma es transportada por los hepatocitos hacia los canalículos biliares y, formando parte de la bilis, también alcanza la luz intestinal. Estos mecanismos determinan que toda respuesta inmunológica inducida en el tejido linfóide asociado a la mucosa gastrointestinal quede confinada principalmente dentro de este compartimento del sistema inmune.

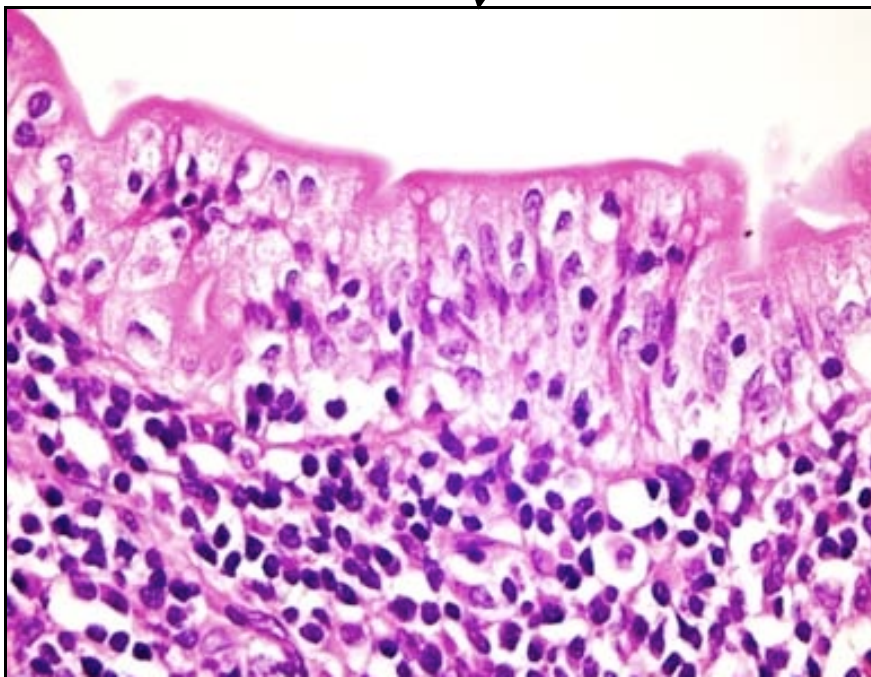
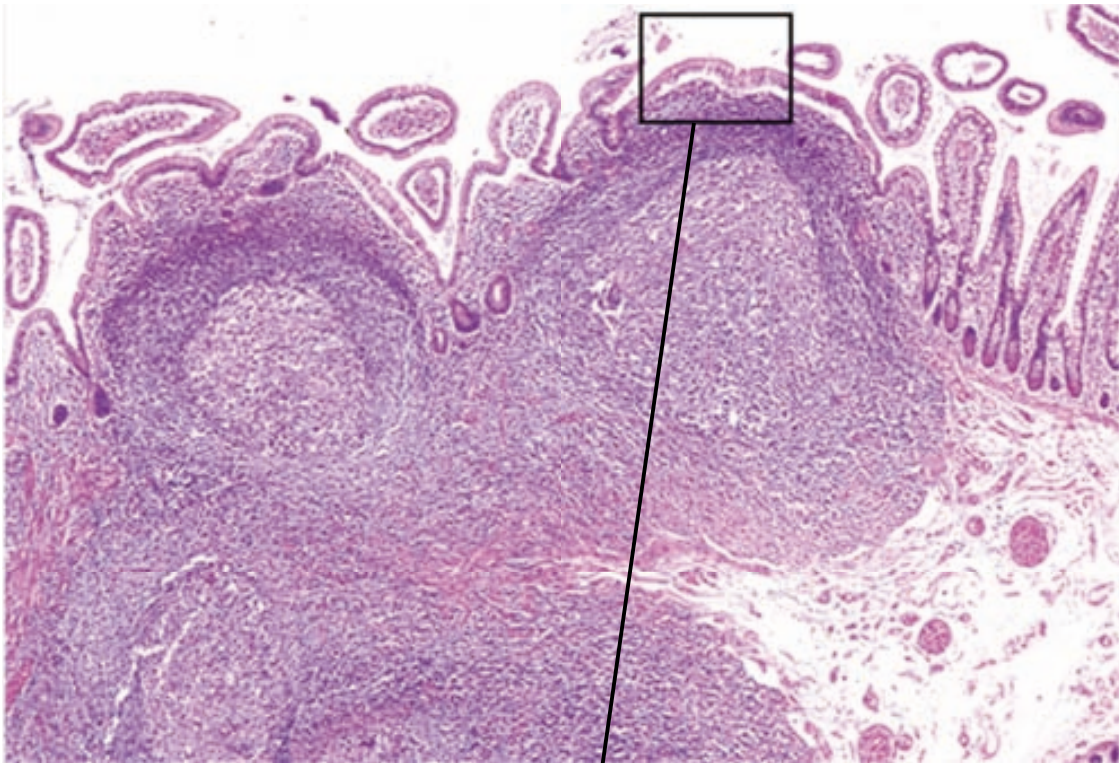


Figura 3.a.1. Detalle de la histología normal de las placas de Peyer. A mayor aumento puede observarse la presencia de linfocitos que excitan el epitelio de superficie.

La mucosa gástrica normal carece de este tejido linfoide organizado y es adquirido en la mayoría de los casos como resultado de un proceso inflamatorio crónico secundario a infección por HP, lo que denominamos MALT adquirido. El tejido MALT se acumula con relación a epitelio de tipo columnar y parece recibir un estímulo antigénico tanto del epitelio mismo como de antígenos que entran en el tejido a través del epitelio, que perpetúa su presencia. En una pequeña proporción de casos se produce una transformación de este tejido MALT reactivo a linfoma.

b. Linfoma MALT gástrico

b.1. Morfología

En este tipo de linfoma el diagnóstico se basa fundamentalmente en el estudio morfológico de las características del infiltrado en la mucosa gástrica (figura 3.b.1.1). Las técnicas adicionales en este caso pueden ser de utilidad en ocasiones concretas, pero por sí solas no son diagnósticas.

El tumor borra la arquitectura normal del estómago con una disminución significativa del número de estructuras glandulares secundarias al infiltrado, y está constituido por células linfoides de pequeño tamaño con núcleo irregular, en ocasiones hendido, y citoplasma relativamente abundante, existiendo un espectro entre células de hábito centrocitoide y otras de aspecto monocitoide. Este infiltrado tumoral se localiza en la zona marginal de centros germinales reactivos si éstos están presentes, y se extiende a la región interfolicular, de forma más o menos difusa. De forma ocasional, se identifican elementos linfoides de mayor tamaño.

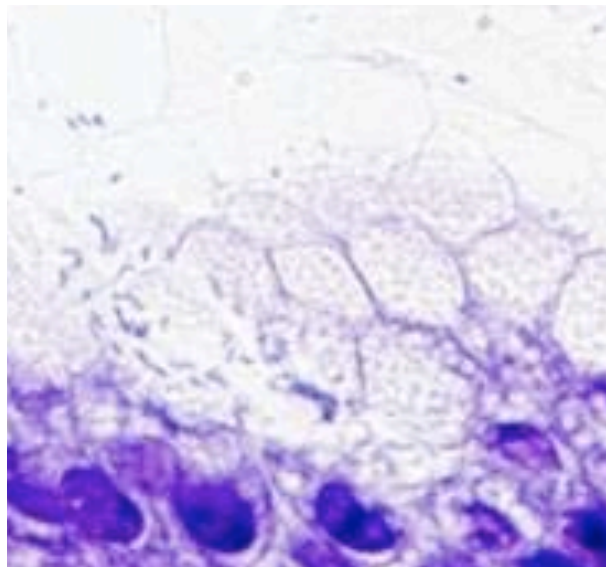
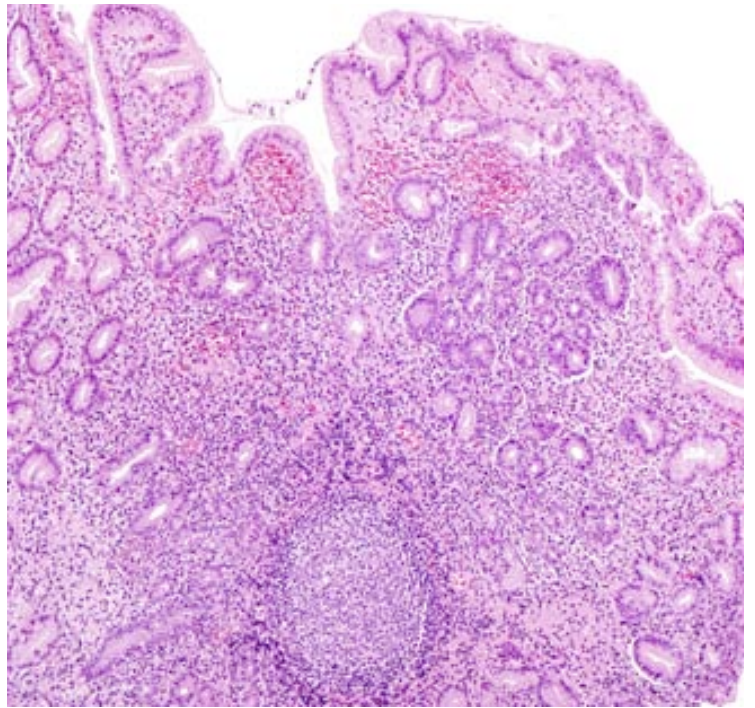
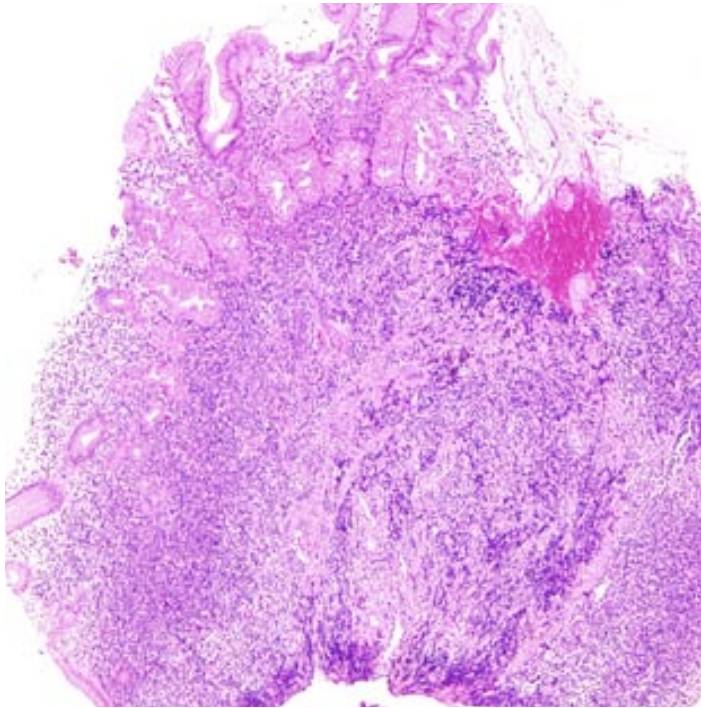


Figura 3.b.1.1 Biopsias gástricas correspondientes a linfoma MALT (superior izquierda) y a gastritis crónica asociada a infección por HP (superior derecha). La imagen de la izquierda muestra una alteración arquitectural marcada, con presencia de un infiltrado denso en lámina propia y que se continúa en profundidad, así como depleción glandular moderada. Por contra, en la imagen de la derecha puede observarse una mucosa gástrica con cambios de gastritis crónica con presencia de folículos linfoides en lámina propia. En la tinción de giemsa (imagen inferior) pueden identificarse estructuras bacilares en la superficie mucosa, compatibles con HP.

En una tercera parte de los casos existe diferenciación plasmácica. En este caso, las células plasmáticas, que formarán parte de la clona tumoral, se sitúan generalmente por debajo del epitelio (en la porción más externa del infiltrado) y en ellas es posible identificar cuerpos de Dutcher (figura 3.b.1.2.).

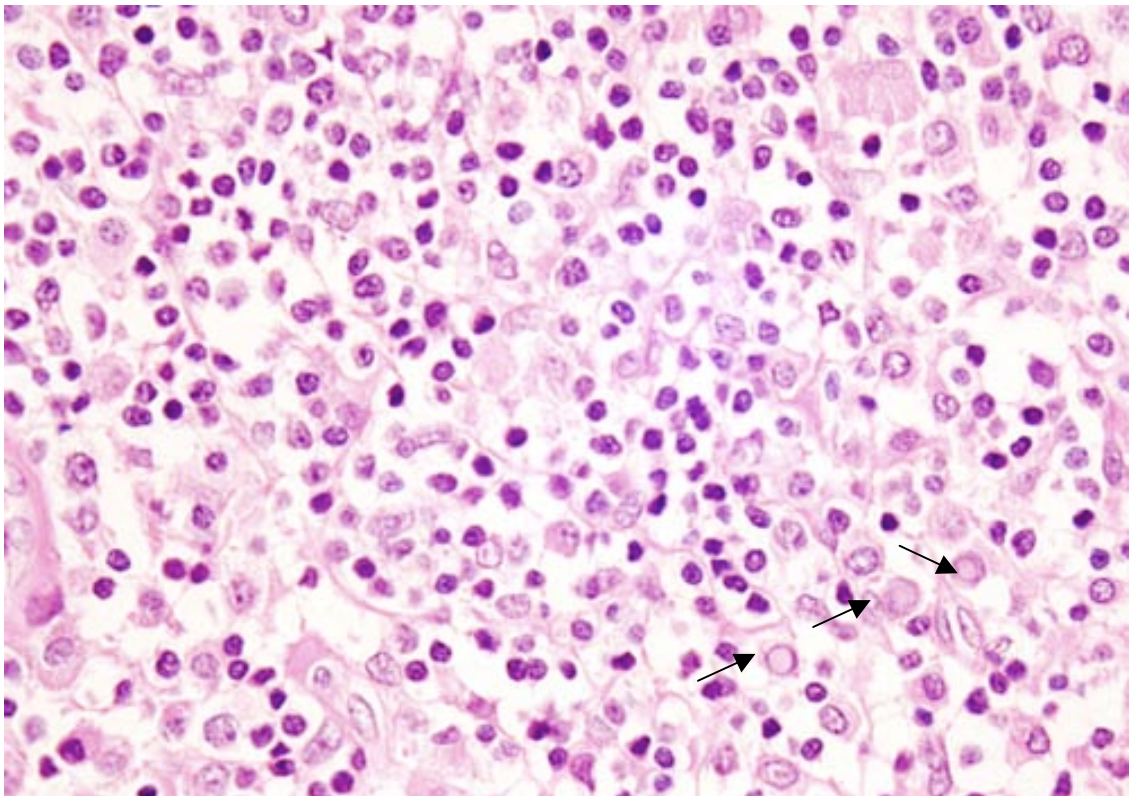


Figura 3.b.1.2. Detalle de cuerpos de Dutcher en el componente con diferenciación plasmácica del infiltrado tumoral.

En algunos casos, los centros germinales reactivos pueden ser invadidos, por lo que la arquitectura del folículo quedará alterada, hecho que queda bien reflejado con una tinción inmunohistoquímica con CD23. La malla de células dendríticas presente normalmente en los centros germinales queda desestructurada, llegando a desaparecer cuando su invasión es total. Por otro lado, en ocasiones, cuando ocurre esta invasión, las células tumorales adquieren una diferenciación plasmácica.

Un hallazgo frecuente en este tipo de linfomas son las lesiones de tipo linfoepitelial (figura 3.b.1.3.), aunque no son patognomónicas ni constantes. En este tipo de lesión las células neoplásicas infiltran el epitelio glandular en grupos de tres o más células y el epitelio residual adquiere un aspecto eosinofílico marcado. En su progresión, estas lesiones acabarán por destruir las glándulas. Una tinción inmunohistoquímica mediante un anticuerpo dirigido contra queratinas de bajo peso molecular (CAM 5.2) puede poner de manifiesto estas lesiones.

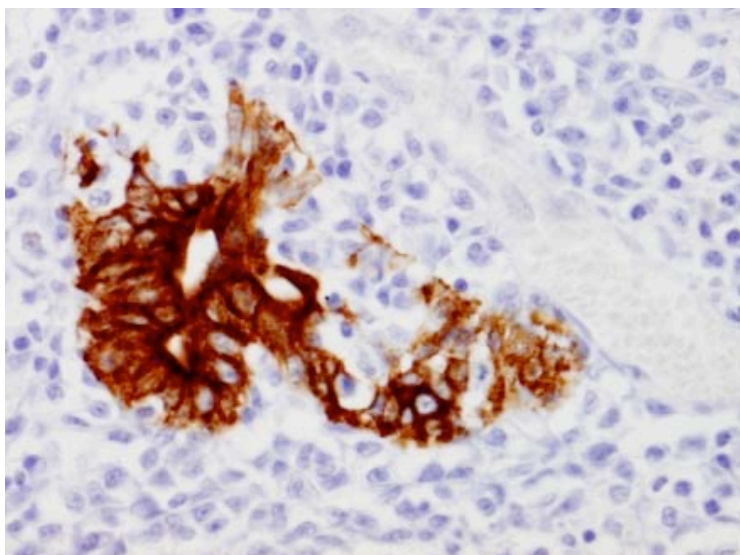
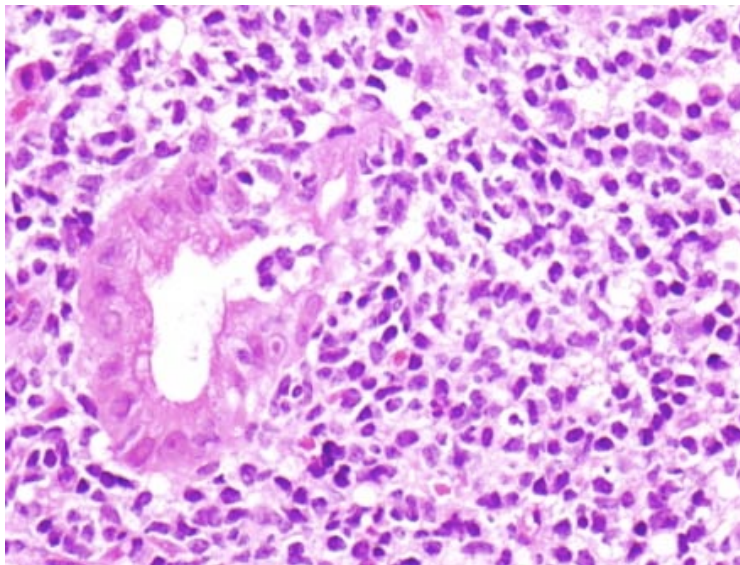


Figura 3.b.1.3. Ejemplo de lesión linfoepitelial. La imagen inferior corresponde al estudio de queratinas de bajo peso molecular; con esta tinción las células epiteliales se observan de color marrón mientras que la lesión queda reflejada en negativo.

Una proporción de casos presentan transformación a linfoma de célula B grande, y se debe utilizar esta terminología en lugar de linfoma de alto grado. Este hecho puede predecirse por un aumento de los elementos de mayor tamaño presentes en el infiltrado, lo que ha provocado que algunos autores hayan propuesto un sistema de clasificación del linfoma MALT gástrico en 4 categorías en función del número de blastos (A, con un porcentaje de blastos no superior al 5% y D, cuando el patrón de infiltración se asemeja a un linfoma de célula B grande sin componente de bajo grado presente).

b.2. Inmunofenotipo

A diferencia de lo que ocurre en otros linfomas, por ejemplo la sobreexpresión de ciclina D1 en el linfoma del manto o de Bcl2 en los folículos linfoides tumorales en el linfoma folicular, no existe ningún marcador inmunohistoquímico que permita realizar un diagnóstico específico de este tipo de linfoma. Así, en este caso, el diagnóstico es un diagnóstico por exclusión.

Las células tumorales expresan marcadores de línea B (CD79a+, CD20+, Bcl2+, IgM+), mientras que no suelen expresar CD5, CD10, Bcl6 ni ciclina D1. En aproximadamente la mitad de los casos, las células tumorales coexpresan CD43 (figura 3.b.2.1.). Esta coexpresión, que denominamos aberrante por no darse en condiciones normales/reactivas, es útil en el diagnóstico diferencial entre gastritis crónica y linfoma. En algunos casos se observa expresión nuclear de Bcl10 (figura 3.b.2.2), que se considera patológica y que se correlaciona con una alteración citogenética en una proporción de los casos (t(11;18) o t(1;14)).

Cuando el tumor tiene diferenciación plasmacítica, puede observarse una expresión monotípica de cadenas ligeras de inmunoglobulinas en la población de células plasmáticas (figura 3.b.2.3).

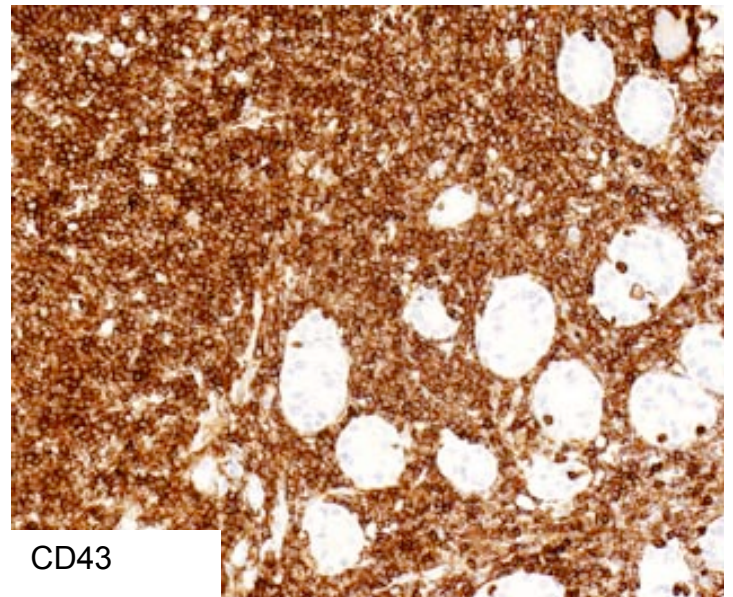
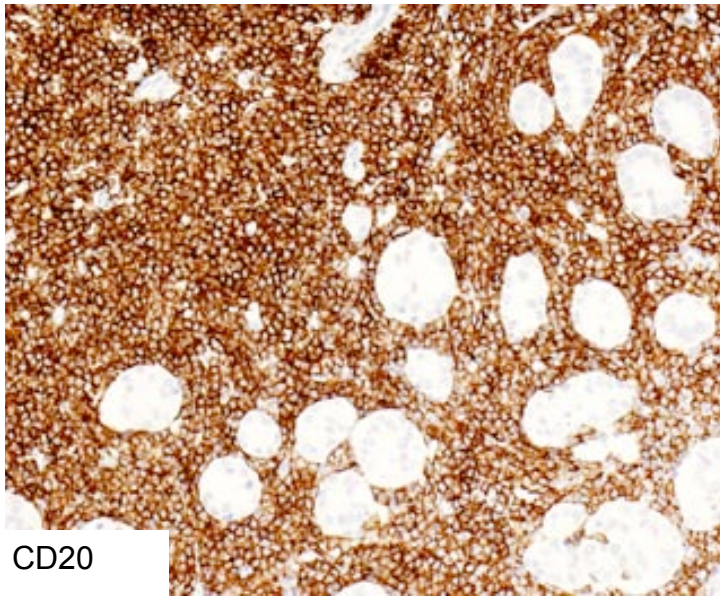


Figura 3.b.2.1. Ejemplo de un caso de linfoma MALT gástrico en el que las células tumorales coexpresan CD20 y CD43.

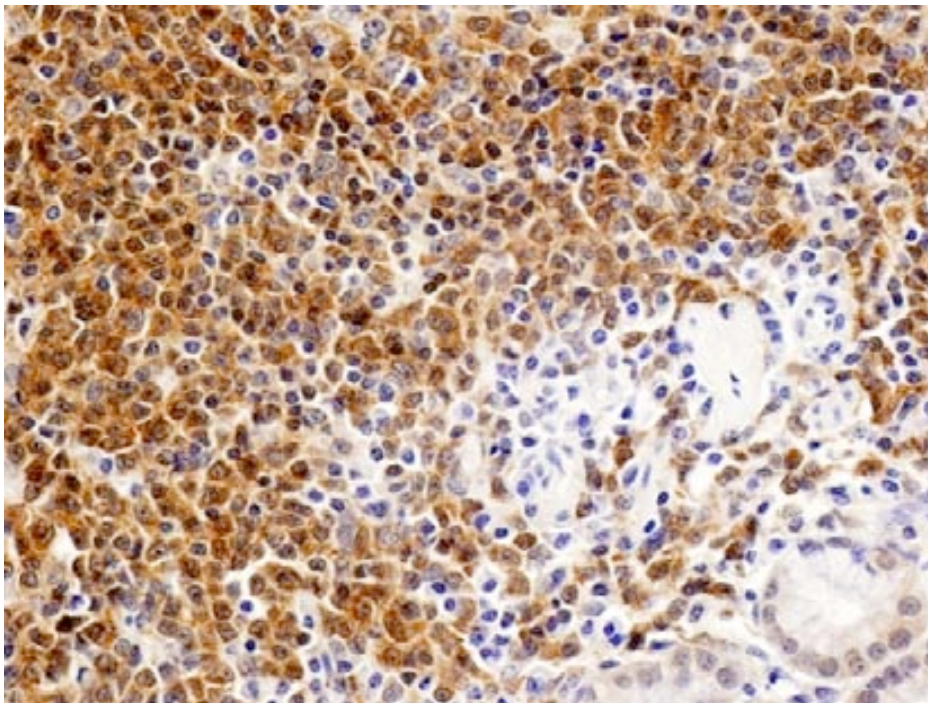


Figura 3.b.2.2. Tinción de Bcl10 en un caso de linfoma MALT gástrico. Algunos núcleos de células linfoides tumorales presentan expresión de este marcador.

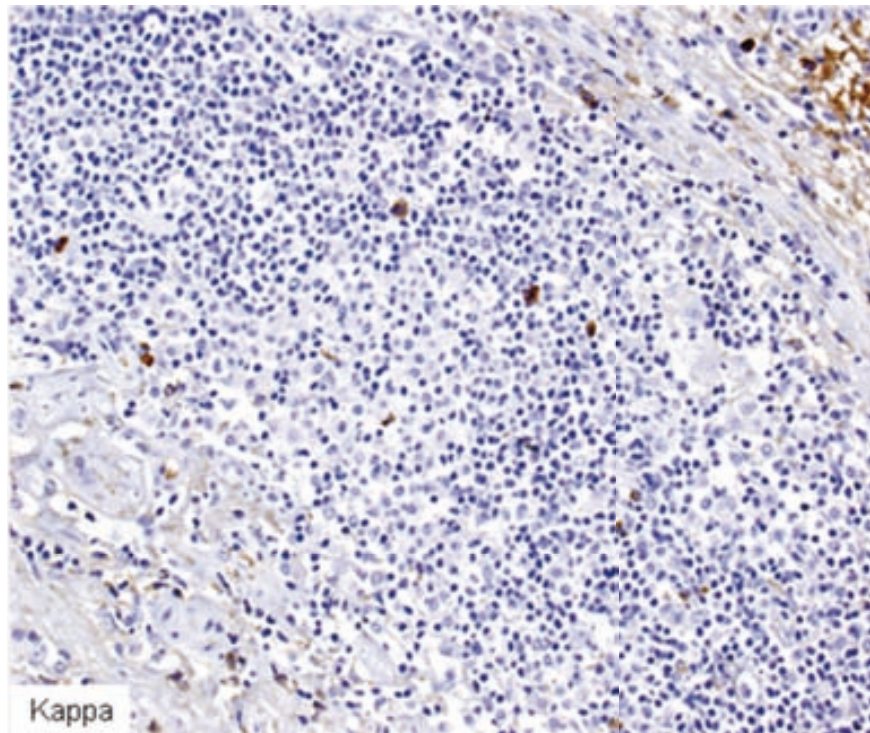
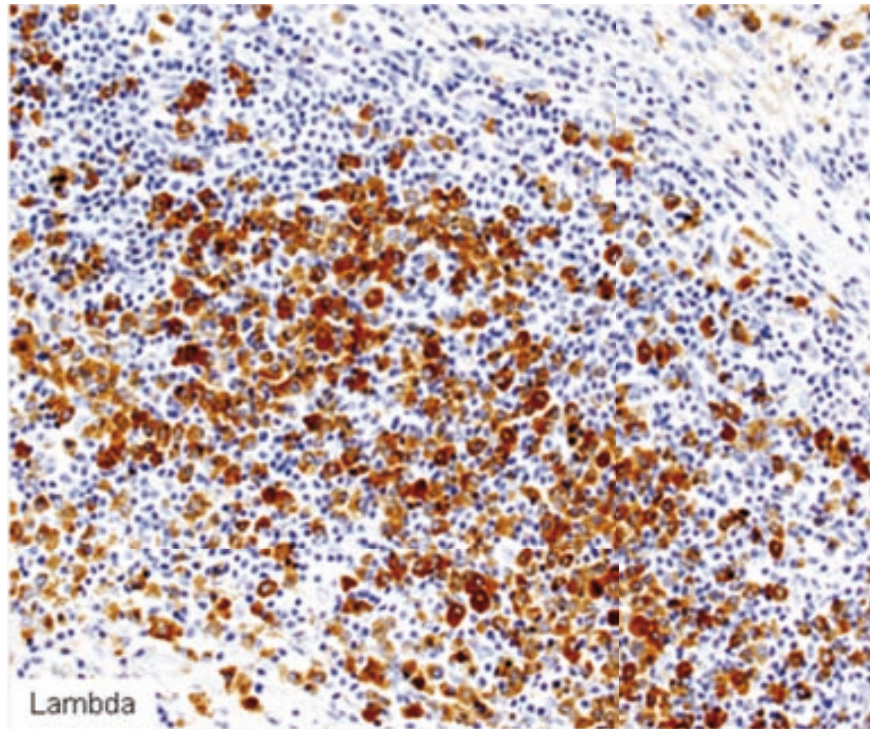


Figura 3.b.2.3. Ejemplo de un caso de linfoma MALT gástrico con diferenciación plasmacítica y expresión monotípica de cadenas ligeras lambda.

b.3. Clonalidad

En este tipo de linfoma, se observa reordenamiento de los genes correspondientes tanto a la cadena pesada de las inmunoglobulinas como a las cadenas ligeras. Asimismo, se observan hipermutaciones somáticas en gran parte de los mismos, lo que sugiere que la célula tumoral es un linfocito B de memoria que ha pasado por el centro germinal.

Este estudio proporciona información complementaria al estudio morfológico, aunque su mayor utilidad queda relegada a las biopsias de seguimiento, en las que pueden existir infiltrados linfoides dudosos y en los que el reconocimiento de una clona idéntica a la observada en la biopsia del diagnóstico indica que se trata de tumor residual o de una recidiva con expresión mínima.

b.4. Citogenética

b.4.1. t(11;18)(q21;q21)

La t(11;18)(q21;q21) es la alteración estructural más frecuente en linfoma MALT gástrico, y, cuando está presente, lo hace como alteración única. Asimismo, es extraordinariamente infrecuente su presencia en casos de transformación a linfoma de célula B grande. La t(11;18) está asociada de forma significativa con infección por HP cadenas CagA positivas, lo que sugiere que esta translocación tiene que estar en relación con un daño del DNA directo mediado por procesos oxidativos. Es importante saber también que su presencia se relaciona con una falta de respuesta al tratamiento erradicador en la mayoría de los casos.

En 1999, Dierlamm y colaboradores mostraron que la t(11;18) daba lugar a una fusión entre los genes API2, localizado en el cromosoma 11q21, y MALT1, localizado en el 18q21. En una pequeña proporción de casos, la translocación fue asociada a una deleción críptica que afectaba la porción 3' de API2, resultando en la pérdida del transcrito recíproco. Por ello, la fusión 5'API2-MALT1 3' localizada en el cromosoma 11 derivativo demostraba jugar un papel patogenético importante.

El gen API2 contiene tres repeticiones baculovirus en región N-terminal (BIR), un dominio de reclutamiento de caspasas (CARD) y un c-terminal zinc binding RING finger domain. El gen MALT1, clasificado como paracaspasa, contiene un dominio muerte N-terminal, seguido por dos dominios Ig-like C2 y un dominio tipo caspasa. Los puntos de corte de ambos genes son característicos. En el API2 tiene lugar después del tercer dominio BIR pero antes de CARD en el 91% de los casos, mientras que en MALT1 los puntos de rotura ocurren en cuatro intrones distintos antes del dominio caspasa-like. Así, el producto de fusión tiene los tres dominios BIR intactos y la región c-terminal MALT1 con el dominio caspasa-like intacto. Este producto de fusión es capaz de activar la vía NFκB.

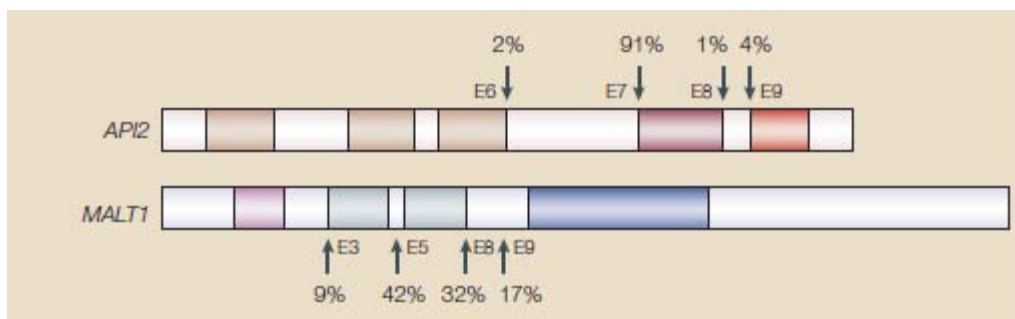


Figura 3.b.4.1.1. La t(11;18)(q21;q21) causa la fusión API2-MALT1, que activa el factor nuclear de NFκB. Los puntos de rotura y sus frecuencias se indican con flechas en la figura. Modificado de Isaacson PG et al., Nat Rev Cancer, 2004¹⁵

b.4.2. t(1;14)(p22;q32), t(1;2)(p22;p12)/Ig-BCL10

Estas translocaciones son exclusivas de linfomas tipo MALT, pero ocurren en una baja frecuencia (menos del 4% de los casos). Yuxtaponen BCL10 con el locus de las inmunoglobulinas permitiendo su desregulación. BCL10 contiene CARD en su extremo amino terminal. Muchas proteínas que interactúan con BCL10, incluido MALT1, han sido identificadas y están relacionadas con la activación de la vía NFκB por BCL10. En línea con estas observaciones, BCL10 se encuentra expresado normalmente en citoplasma, mientras que en linfomas MALT con la translocación t(1;14) BCL10 también se expresa en el núcleo de las células tumorales. Curiosamente, esta expresión de BCL10 nuclear también puede observarse en linfomas MALT sin la translocación t(1;14), aunque con menor intensidad. En estos casos la

expresión se relaciona con la translocación t(11;18). Los resultados sugieren un papel oncogénico cuando BCL10 se localiza en el núcleo.

b.5. Enfermedad residual

La enfermedad residual (ER) hace referencia a la persistencia de una cantidad pequeña de células malignas tras tratamiento con intención curativa del cáncer. Sin embargo, muchas veces el número de células patológicas es demasiado pequeño como para poder ser detectadas en un estudio morfológico o citogenético, por lo que la técnica de PCR y las técnicas de inmunofenotipo por citometría de flujo son las que presentan una mayor sensibilidad, y por lo tanto, son las técnicas de elección en su detección. Se ha visto que la persistencia de células tumorales después del tratamiento, aunque sea en tan poca cantidad, puede constituir una fuente de recidiva.

Sólo dos investigaciones han estudiado la detección de ER en pacientes con linfoma MALT gástrico tratado con quimioterapia (clorambucilo o cladribina). Dado que los casos incluidos entre ambos estudios no llegan a 20, no pueden establecerse conclusiones consistentes al respecto.

La realización de estudios de clonalidad en linfomas MALT gástricos resulta en la detección de monoclonalidad en la mayor parte de los casos en el diagnóstico, y en más del 50% de los pacientes con remisión histológica completa después del tratamiento erradicador de HP se observa persistencia de poblaciones monoclonales mediante técnicas de PCR. Cuando se utilizan métodos más sensibles como la detección de la t(11;18) en linfocitos de la mucosa gástrica, la población residual del linfoma puede ser identificada incluso en ausencia de monoclonalidad para IgH. Ello parece indicar que en estos pacientes, que en su mayoría se encuentran en remisión histológica, la ER puede detectarse durante años sin implicar recidiva clínica. Al parecer, lo mismo se observa también en pacientes tratados con quimioterapia.

4. Patogenia

Aunque la implicación patogénica de HP ha sido ampliamente demostrada, hay otros factores que contribuyen a la perpetuación de la clona patogénica seleccionada en el proceso infeccioso. Así, después de la adquisición de una respuesta inmune local se desarrolla una respuesta centrolifolicular que es mantenida de forma crónica, lo que aumenta la posibilidad de alteraciones cromosómicas y mutaciones puesto que en el centro germinal tienen lugar, de manera continua, fenómenos de recombinación génica. Las alteraciones genéticas resultantes pueden dar lugar a una clona B neoplásica. La proliferación de las células del linfoma es mantenida, en las fases iniciales, por la respuesta inespecífica de las células tumorales a autoantígenos y por la estimulación de las células tumorales por las células T específicas para la cepa de HP que ha desencadenado el proceso. La dependencia para su crecimiento de las células T activadas específicas para el HP explica, al menos en parte, que estos linfomas tengan escasa tendencia a diseminarse y que, en sus fases iniciales, un elevado porcentaje respondan al tratamiento erradicador. No todos los linfomas MALT gástricos son igualmente dependientes del HP para crecer. El 5% de linfomas MALT que adquieren la $t(1;14)$ son probablemente independientes del HP, suelen descubrirse en estadios avanzados y pueden progresar hacia linfomas agresivos. El 30% de linfomas MALT que adquieren la translocación $t(11;18)$ tienden a diseminarse con más frecuencia de la habitual, son independientes del HP pero raramente desarrollan linfomas agresivos. El 65% de linfomas MALT que no presentan estas translocaciones puede presentar un desequilibrio alélico debido a trisomías 3, 12 y 18. Estos casos tienen una menor tendencia a diseminarse y responden, en fases iniciales, al tratamiento erradicador pero pueden progresar, hacerse independientes del HP y finalmente transformarse en linfomas agresivos a través de la inactivación de genes supresores de tumores como p53 y CDKN2A.

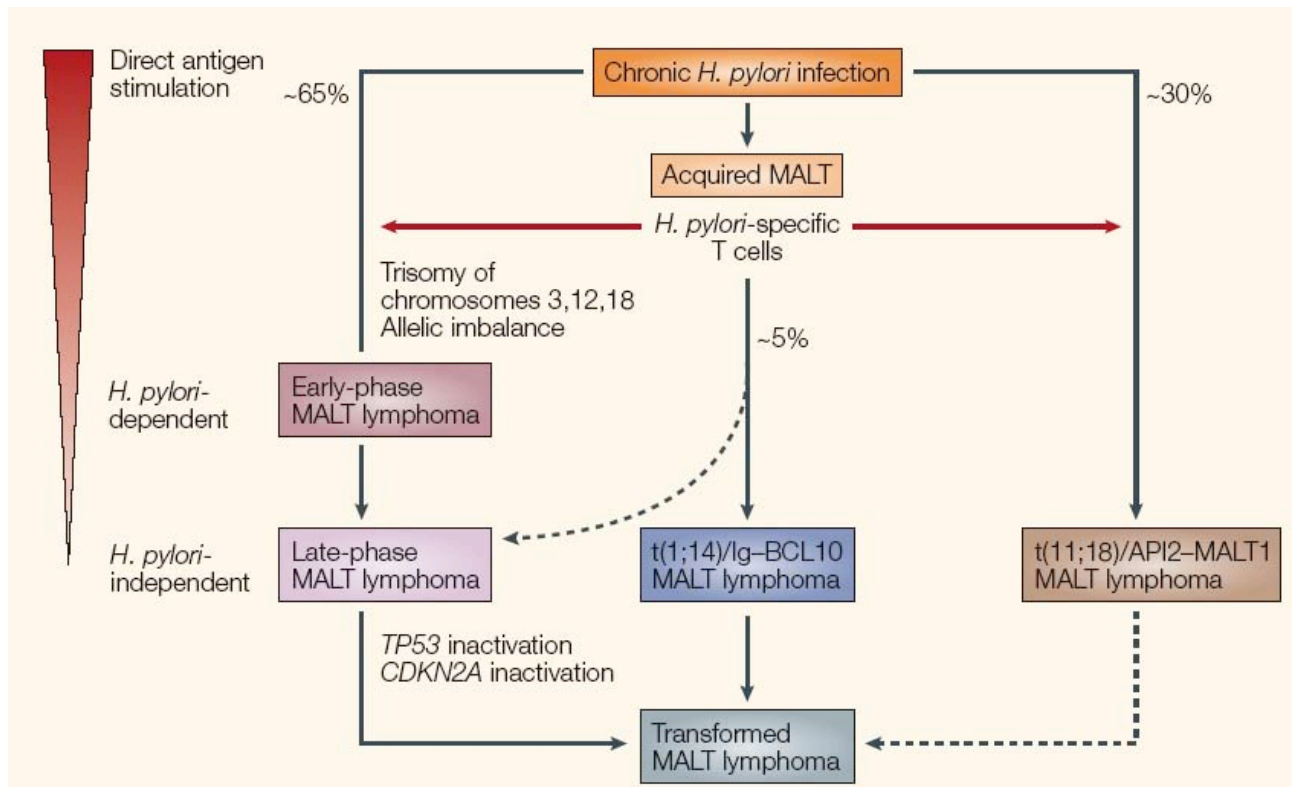


Figura 4.1. Resumen esquemático de las fases del desarrollo del linfoma MALT gástrico. De Isaacson PG et al., Nat Rev Cancer, 2004¹⁵

Por otro lado, la identificación de los genes involucrados en estas translocaciones ha permitido conocer la patogénesis molecular del linfoma MALT. Así, tanto la translocación $t(11;18)$ como la $t(1;14)$ influyen directamente sobre la vía NF- κ B, mientras que las trisomías 3, 12 y 18 actúan por mecanismos diferentes al estímulo de esta vía.

En la forma clásica de la vía NF- κ B, el factor de transcripción NF κ B es un heterodímero de p50 y p65. La subunidad p50 contiene el dominio de unión a las secuencias diana del DNA, y p65 (también conocida como RelA) contiene el dominio de transactivación para el reclutamiento de los coactivadores de la transcripción. Hay diversos homólogos a p50 y p65, de manera que existe una amplia familia de proteínas NF κ B en función de las subunidades que constituyen la proteína. La actividad de NF κ B está regulada a distintos niveles, el más importante del cual es su secuestro al citosol por las proteínas I κ B. Unido a I κ B, NF κ B no puede entrar en el núcleo, y por tanto, no puede regular la expresión de genes. Distintas vías transductoras de señales pueden activar NF κ B, induciendo la degradación de I κ B. La fosforilación de I κ B por actividad de IKK provoca su unión a complejos proteicos de ubiquitinización que provocan la degradación de I κ B mediante la acción del proteasoma, con la liberación y activación de NF κ B.

NFκB es un punto en el que convergen una gran cantidad de estímulos y puede actuar tanto induciendo como inhibiendo la apoptosis en función del contexto celular.

En los linfocitos B la señalización iniciada en el receptor de células B (BCR) es necesaria para la activación y proliferación de las células B maduras, y también es crucial en el desarrollo de las células B1 y las células de la zona marginal. La activación de la vía empieza por la unión del antígeno al BCR y como consecuencia de esta unión se desencadenan una serie de reacciones en las que participan CARMA 1 (o CARD11), BCL10 y MALT 1 que conducen a la activación de NFκB. Cuando NFκB es activo, promueve la expresión de genes relacionados con supervivencia e inhibición de la apoptosis de la célula, como son IAPs, c-FLIP, TRAF1-2 y miembros de la familia de BCL2 como BCL-XL o A1.

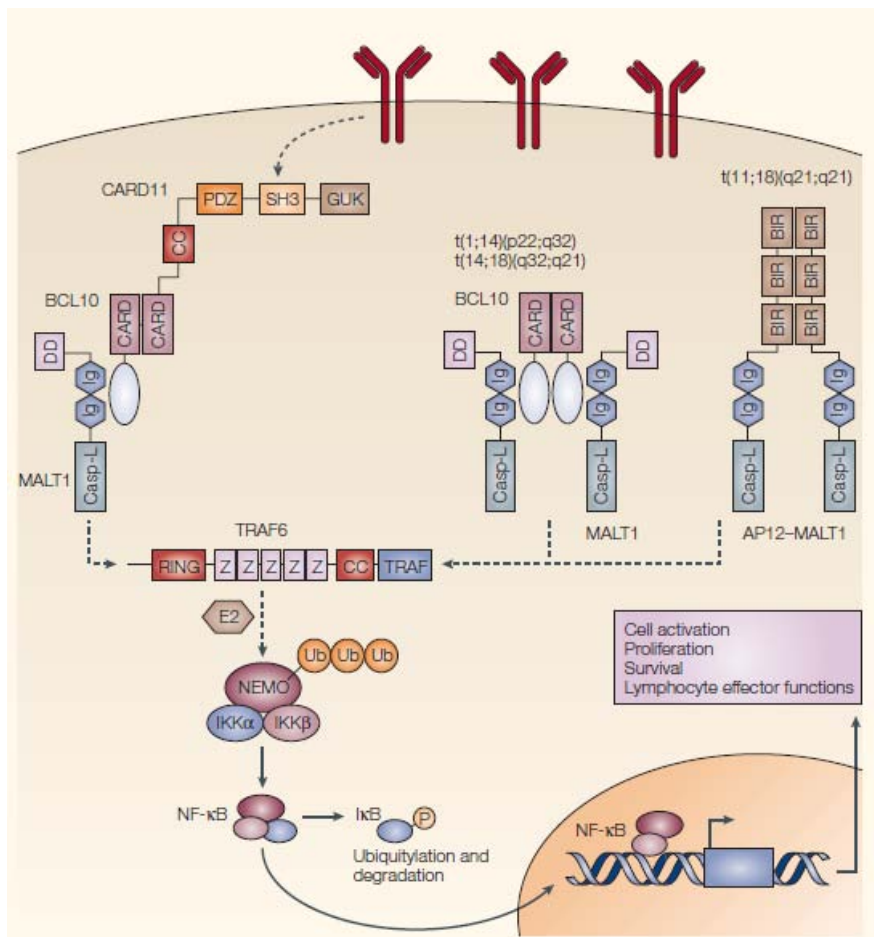


Figura 4.2. Esquema en el que se ilustra la vía NF-κB, y en la que se relaciona con las translocaciones observadas en el linfoma MALT. De Isaacson PG et al., Nat Rev Cancer, 2004¹⁵

B. LINFOCITOS T REGULADORES Y SU RELACIÓN CON LA EVOLUCIÓN DE LOS LINFOMAS B

1. Introducción

La unidad estructural básica del timo es el lóbulo, en el que se distinguen dos áreas morfológicamente diferenciadas, el córtex y la médula, ambas constituidas por una mezcla variable de células epiteliales y células linfoides (timocitos). En el córtex, las escasas células epiteliales presentes se hallan enmascaradas por numerosos linfocitos. Por el contrario, la médula contiene un número mayor de células epiteliales y pocos linfocitos. Ambas áreas constituyen el compartimento epitelial tímico, lugar en el que tiene lugar la maduración de los linfocitos T en este órgano.

Así pues, el timo juega un papel muy importante en la inmunidad celular. Durante el desarrollo embrionario inicial, los protimocitos procedentes de la médula ósea entran en el timo y migran hasta el córtex externo. Durante su proceso de maduración los linfocitos aprenden a distinguir lo propio de lo no propio y adquieren la habilidad de identificar antígenos mediante el reconocimiento del complejo mayor de histocompatibilidad (CMH). Cuando el timocito ha madurado, viajan de la capa externa del córtex a la médula para pasar finalmente al torrente circulatorio, donde funcionarán en la respuesta celular inmune como linfocitos T maduros helper (CD4+) o citotóxicos (CD8+), induciendo, entre otros, procesos de citotoxicidad, reacciones de hipersensibilidad y rechazo de trasplantes.

2. Desarrollo de células T

Como ya hemos mencionado, los progenitores linfoides tímicos viajan desde la médula ósea al timo, atraídos por algunos factores quimiotácticos. Estos progenitores expresan CD34 y la enzima desoxinucleotidil transferasa terminal (TdT) involucrada en la inserción de secuencias de nucleótidos en la región N-terminal de los segmentos de las regiones variables D y J para aumentar la diversidad de los receptores de células T (TCR). También expresan niveles

elevados de la molécula de adhesión CD44, el receptor del factor de células madre (CD117) y Notch (proteínas de la superficie celular que proporcionan señales en varios puntos clave durante la diferenciación del timocito y, por tanto, necesarias para condicionar el linaje de células T). Pero en este estadio su falta de expresión de CD4 y CD8 hace que se designen como timocitos doble negativos. Bajo la influencia de IL-1 y TNF, los progenitores se diferencian en pro-timocitos, que sufren una proliferación mediada por IL-7 para formar una población de células pre-T CD44+ CD117+. En esta fase, las células comienzan a expresar diversas cadenas de TCR y luego se expanden; por último, sintetizan CD3, el complejo de transducción de señal invariante del TCR, y se convierten en doble positivas para CD4+ CD8+, los marcadores de las subpoblaciones helper y citotóxica, respectivamente. Por último, de nuevo bajo la guía de las quimiocinas atraviesan la unión corticomedular y llegan a la médula cuando los marcadores CD4 y CD8 se segregan junto con la diferenciación en poblaciones inmunocompetentes separadas de precursores simples positivos de células T helper CD4+ y T citotóxicas CD8+. La señalización de Notch 1 está involucrada en la maduración de ambas subpoblaciones, con los ligandos Notch 1, Jagged 1, Jagged 2 y δ -tipo-1 que se expresan en las células epiteliales tímicas de una manera muy regulada. Las células $\gamma\delta$ permanecen doble negativas, excepto en el caso de un pequeño subconjunto que expresa CD8.

3. Adquisición de la tolerancia inmune central: proceso de selección positiva y selección negativa

La capacidad de las células T para reconocer los péptidos antigénicos en asociación con el CMH propio se desarrolla también en el timo. Las células epiteliales poseen un alto contenido de moléculas de CMH en la superficie y, según el criterio actual, las células doble positivas que poseen receptores que reconocen con alta afinidad el CMH propio en las células epiteliales se seleccionan de modo positivo para la diferenciación en células simples positivas CD4+ o CD8+ (*selección positiva*). Por el contrario, las células que reaccionan contra el CMH propio son eliminadas (las células que son autorreactivas sufren un proceso de *selección negativa*). Es decir, la selección positiva favorece la producción de células T anti-autoantígenos mientras que

la selección negativa representa el mayor mecanismo de autotolerancia, siendo el desarrollo de procesos autoinmunes el resultado si este mecanismo falla.

Únicamente un 3% de los precursores tímicos sobrevive a esta doble selección. El resultado es la obtención de una población de linfocitos T con receptores con afinidad baja o intermedia para autoantígenos que deja el timo y ocupa los órganos linfoides. Curiosamente, esta población que fue seleccionada por su baja afinidad a los autoantígenos pronto se convierte en la población que responde a antígenos externos. Ello es posible porque el TCR puede interactuar con múltiples péptidos por medio de la complementariedad a la vez que se modifica para adaptarse a unas nuevas condiciones. Durante esta interacción las moléculas de lo propio y lo no propio son discriminadas por el sistema inmune para evitar una autorreactividad que puede resultar desastrosa.

La restricción de cada linfocito contra una sola especificidad simplifica en gran medida el trabajo de establecer la autotolerancia, simplemente porque apenas requiere un mecanismo que anule desde el punto de vista funcional las células autorreactivas y deja el resto del repertorio sin alteraciones. Además, dado que los antígenos externos no se encuentran en el timo, los linfocitos T con alta afinidad para péptidos externos evaden el proceso de selección negativa y escapan a la circulación periférica hasta órganos y/o tejidos linfoides donde tendrá lugar el enfrentamiento, como resultado, por ejemplo, de la liberación de citocinas producida en un proceso infeccioso.

4. Tolerancia inmune periférica y linfocitos T reguladores (células Tregs)

Pero el sistema no es perfecto, y algunos linfocitos T con afinidad para autoantígenos, aunque no lo suficientemente alta como para sufrir la selección negativa, salen del timo. En la periferia, esta afinidad intermedia sí puede ser suficiente para desarrollar fenómenos autoinmunes.

Distintos mecanismos de regulación en los que intervienen distintos subgrupos de células supresoras forman la tolerancia inmune periférica, gracias a la cual enfermedades de tipo autoinmune no tienen lugar, a no ser que existan muchas poblaciones de clones autoreactivos en la población de linfocitos T maduros.

Uno de estos subgrupos de células supresoras lo constituyen las células Tregs. Esta población, inicialmente caracterizada por su expresión de CD4 y CD25, fue identificada en ratones sin timo que desarrollaban múltiples enfermedades de tipo autoinmune. Tras su nacimiento, en estos animales tenían lugar procesos de tipo autoinmune múltiples como insulinitis, tiroiditis, gastritis, etcétera. También se observó que si a los ratones se les inyectaba linfocitos T CD4+ CD25+ los procesos autoinmunes cesaban. Así, los experimentos indicaron que estas células estaban envueltas directamente en procesos de autoinmunidad en ratones inmunodeficientes.

Las células Tregs representan entre un 5 y un 10% de la población de linfocitos T en adultos, y previenen la autoinmunidad en individuos inmunocompetentes. Estos linfocitos CD4+ pueden o no expresar CD25, por lo que esta proteína ha dejado de ser utilizada para identificar a esta población. Más reciente es la observación de que el factor de transcripción FOXP3, miembro de la familia forkhead de factores de transcripción de DNA-binding, no sólo se expresa en esta población de células Tregs de forma específica sino que es el principal efector de su función supresora. Mutaciones en el gen FOXP3, localizado en Xq11.23-Xq13.3 del cromosoma X, es causa de enfermedad fatal de tipo autoinmune en ratones y de síndrome IPEX (disregulación inmune, poliendocrinopatía, enteropatía y síndrome ligado al X) en humanos. En ambos casos se produce un defecto en la activación de células T y una disminución de la población Treg. En estas células, además de FOXP3, se expresan otras moléculas de superficie como son CTLA-4 y GITR, mientras que IL10 y TGF- β participan en mecanismos intrínsecos de supresión¹⁸. Por otro lado, la IL-2 es esencial para su crecimiento y supervivencia. Paradójicamente, ellas mismas no son capaces de producirla y dependen de otros tipos celulares para conseguirlo.

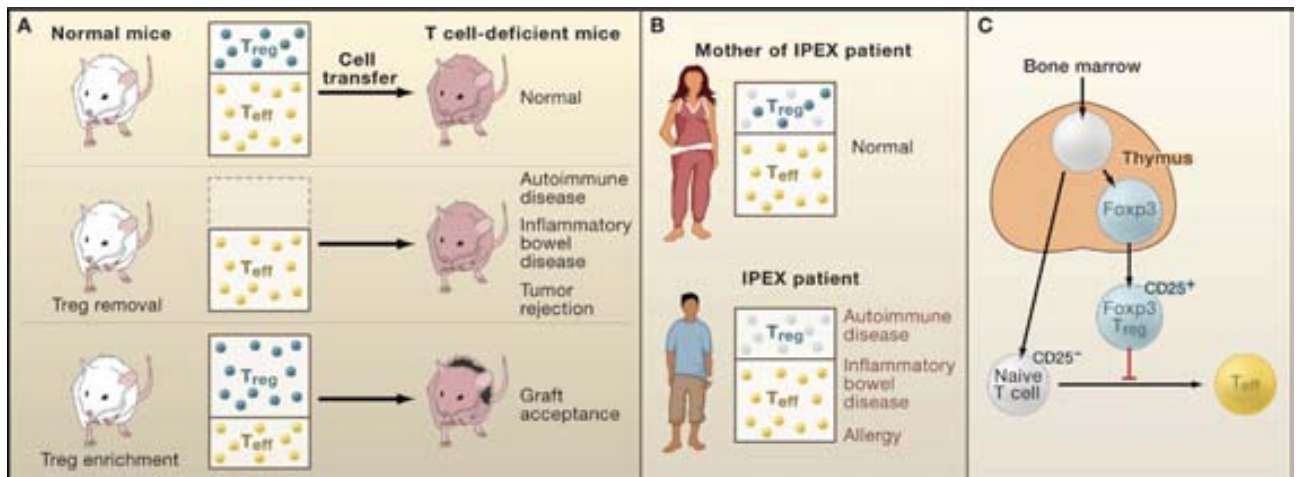


Figura B.4.1. Efectos del déficit de células T reguladoras en ratones y humanos.

En la actualidad se reconocen dos subpoblaciones de células Tregs en función de su origen en timo (naturales)(nTreg) o en periferia (inducidas)(iTreg). El pool periférico puede originarse por estimulación de células T CD4⁺ naïve en presencia de TGF- β , IL-2 y/o ácido retinoico, que inducen la expresión de FOXP3 en estas células. Con este mecanismo se consigue mantener el pool de células Treg, aunque se piensa que funcionalmente son más inestables que las originadas en timo¹⁷.

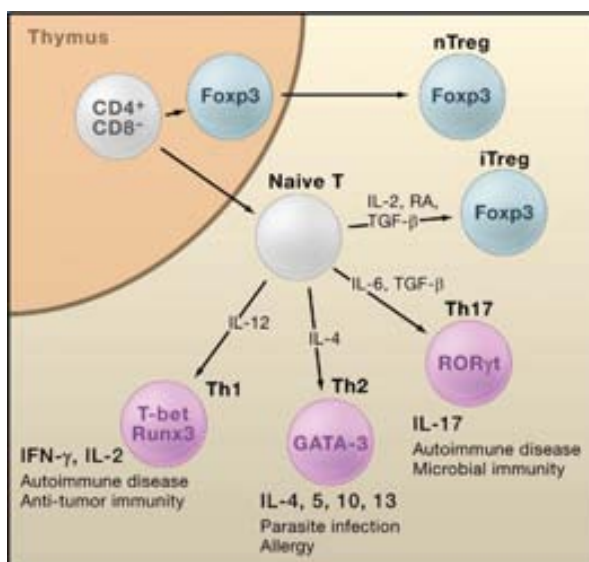


Figura B.4.2 Diferenciación de células T CD4⁺ naïve en células T efectoras o células T reguladoras.

5. Células Tregs y cáncer

Aunque inicialmente fue descrito el papel de las células Tregs en prevención de fenómenos de autoinmunidad, las células Tregs también juegan un papel importante en la supresión de la inmunidad T celular cáncer-específica y por lo tanto contribuye a la progresión del tumor. Numerosos estudios han demostrado que el número de células Tregs en pacientes con cáncer en sangre periférica es superior al de la población normal. Asimismo, este incremento se asocia a un peor pronóstico en mujeres con cáncer de ovario en fases avanzadas, así como también en melanomas y tumores renales.

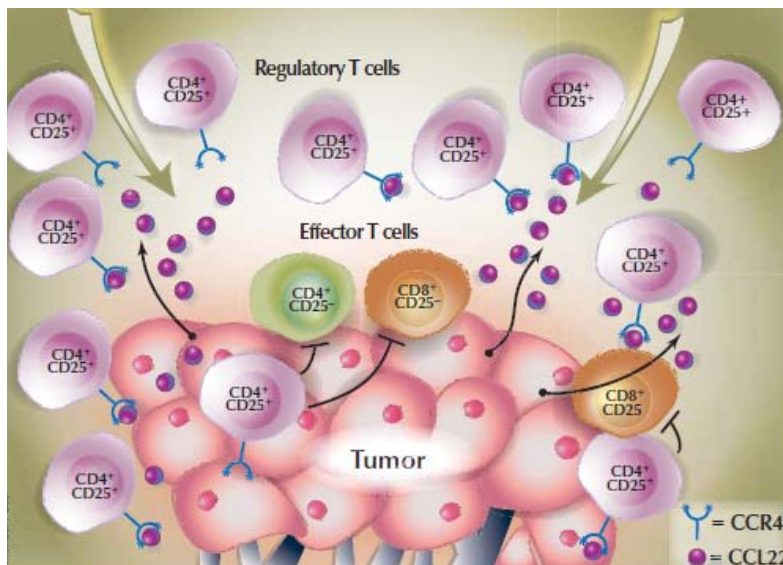


Figura B.4.3. Tumores ováricos se hallan infiltrados por células T efectoras y por un exceso de células T reguladoras. Estas últimas impiden a las células efectoras combatir el tumor. Mediante la secreción de citocina CCL22 la célula tumoral atrae a las células T reguladoras mediante la unión a su receptor (CCR4).

Esta observación ha llevado a intentar modular esta respuesta inmune mediante tratamientos inmunomoduladores con IL-2 en algunos carcinomas de células renales metastáticos o melanomas. De forma paradójica, altas dosis de esta molécula, esencial para la supervivencia y función de este tipo celular, inhibe o reduce el porcentaje de dichas células en pacientes que alcanzan una remisión completa de su enfermedad.

6. Células Tregs y linfoma

Recientemente, ha crecido el interés del papel del microambiente en la biología de los linfomas. De este modo, se ha podido observar que las células Tregs están presentes también en

cantidad variable en sangre periférica y en biopsias de pacientes con linfoma como parte de su microambiente. Al igual que en los tumores sólidos, en el caso de las neoplasias hematopoyéticas de forma natural se desarrolla una respuesta T celular para hacer frente al tumor y su papel en este caso es el de inhibir esta respuesta mediante la proliferación y la producción de citocinas o gránulos que inhiben esta barrera; es decir, mantienen su función inmunoreguladora. Asimismo, el propio tumor es capaz de inducir la atracción de células Tregs a estos tejidos patológicos mediante la producción de citocinas, así como la adquisición de una función inmunoreguladora de la población T CD4+CD25- con la inducción de la expresión de FOXP3 en estas células mediante su expresión de CD70 y la interacción de CD27 y CD70²⁶. Como resultado, el tumor escapa de la inmunidad induciendo una función supresora en células T CD4+CD25- y por tanto generando un gran microambiente inmunosupresivo.

Todos estos estudios han proliferado tras el desarrollo de anticuerpos que funcionan bien en tejidos parafinados. Así, se caracterizó la expresión de FOXP3 en tejidos normales humanos, en los que esta expresión se observa restringida en linfocitos TCD4+CD25+, CD8+ y CD8+CD25-, presentes en área interfolicular y centros germinales en amígdala, zona del manto, centro germinal y folículos secundarios de ganglios, vainas periarteriolares esplénicas, médula de timo fetal y maduro, y médula ósea²⁸.

En cuanto a la implicación pronóstica de esta población celular, los resultados en la literatura son ampliamente variables en función de los trabajos y según el tipo de linfoma estudiado, pudiendo tener su presencia un efecto beneficioso o perjudicial según los casos. Asimismo, parece que no sólo es importante su presencia sino también cómo se distribuyen en los tejidos. Uno de los linfomas más estudiados desde el punto de vista del microambiente es el linfoma folicular. En este tipo de linfoma, se ha visto que, además, el pronóstico es terapia dependiente. En el presente estudio se ha observado que su patrón de distribución tiene valor pronóstico negativo.

Aparte del linfoma folicular, existen en la literatura varios trabajos estudiando el papel de estas células en otros procesos linfoproliferativos. Así, Alvaro y colaboradores³⁶ demostraron la presencia de Tregs como parte del componente reactivo acompañante característico del linfoma de Hodgkin mediante estudio inmunohistoquímico para FOXP3. En dicho trabajo

observaron que la presencia de células TIA1+ y FOXP3+ en el infiltrado se asociaba con una mejor supervivencia, mientras que Beyer y colaboradores⁴⁰ observan un incremento de células Tregs en sangre periférica y medular de pacientes con mieloma múltiple y MGUS, sobretodo a expensas del compartimiento periférico.

En todos estos trabajos, FOXP3 identifica una población de linfocitos T reactivos presentes en el microambiente. Pero FOXP3 se encuentra expresado en baja una proporción de casos de linfoma/leucemia T del adulto, con un peor pronóstico⁴¹.

2. HIPÓTESIS DE TRABAJO

Los linfomas MALT gástricos se desarrollan en el contexto de una respuesta inmune local asociada a una infección por HP en aproximadamente el 70-80% de los casos, lo que implica la aparición de un tejido MALT organizado que, en condiciones normales, no se halla presente en estómago^{1,5}. Esta respuesta inmune está constituida por linfocitos B y T, así como por neutrófilos, siendo las células T específicas de HP las responsables, una vez establecida la infección, del estímulo crónico y mantenido de las células linfoides B componentes de este tejido MALT. En un momento determinado del proceso, las células linfoides B sufren daños en su estructura de DNA, dando lugar a una clona de linfocitos B que se expande y constituye finalmente un linfoma B de tipo MALT. Clínicamente, la inducción de remisiones tras tratamiento antibiótico contra HP en casos sin alteraciones citogenéticas asociadas ilustra la importancia de este mecanismo inmunopatogénico.

Por otro lado, en los últimos años ha crecido el interés por conocer el papel del microambiente en los linfomas. En el caso concreto del linfoma MALT, ya hemos visto que el microambiente es decisivo en la respuesta a la infección. De entre todos los tipos de linfocitos T que intervienen en este proceso nos hemos interesados por las células T reguladoras. Se trata de un subtipo de linfocitos T CD4+ que expresan de forma característica FOXP3, y que en el contexto de cáncer se ha visto que cumplen una función supresora de la respuesta inmune antitumoral por diferentes mecanismos, como a través de la activación del TCR, el contacto celular (interacciones célula-célula) o por la producción de TGF¹⁷⁻¹⁹. Además, estas células pueden ser reclutadas por las propias células tumorales a través de la secreción de citoquinas (CCL17 y CCL22)⁴². Su presencia se asocia en la mayor parte de los casos a un mal pronóstico. En algunos trabajos relacionados con los procesos linfoproliferativos se describe, además, que no sólo es importante su presencia sino también su distribución arquitectural³⁸.

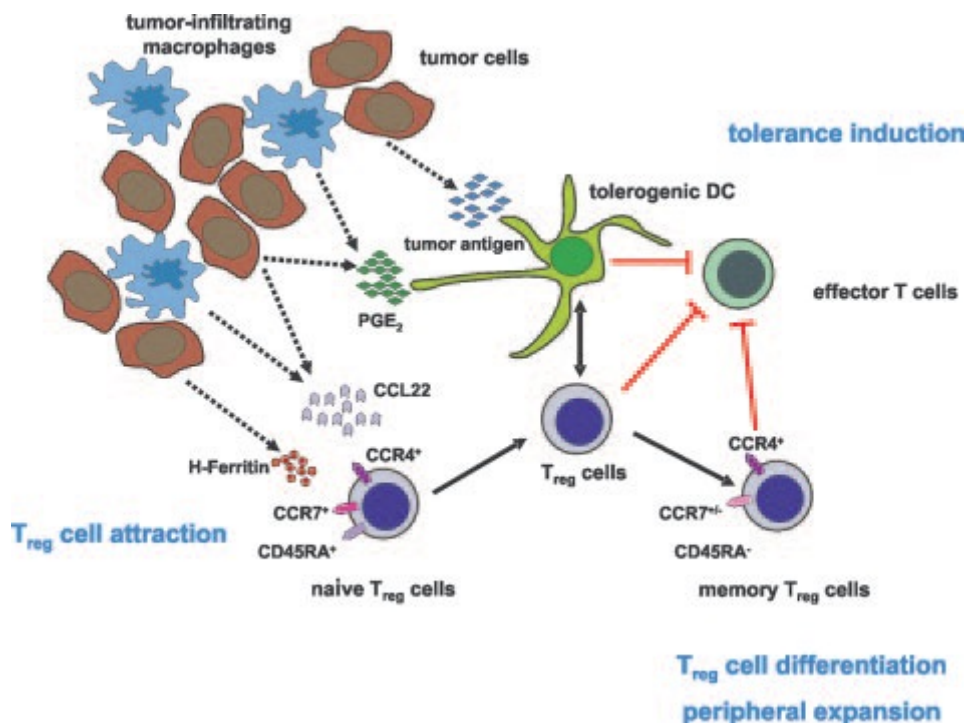


Figura 2.1. Modelo esquemático que muestra los distintos mecanismos de reclutamiento de células T reguladoras en relación a los infiltrados tumorales (From Beyer M and Schultze JL in Regulatory T cells in cancer)²⁰.

Así pues, nuestra hipótesis de trabajo se fundamenta en que las células T reguladoras pueden desempeñar un papel importante en la patogenia del linfoma MALT gástrico, influyendo de forma directa en la interacción entre los linfocitos B neoplásicos y las células T específicas de HP. Además, pensamos que la presencia intratumoral de células T reguladoras FOXP3⁺ puede variar en el momento del diagnóstico en función de la presencia o no de infección por HP, o incluso en función de la presencia de alteraciones genéticas recurrentes. En este contexto, resulta interesante evaluar la respuesta a los diferentes tratamientos en función de la presencia o no de estas células en cada caso. Además, es posible que este patrón de infiltración intratumoral por células T reguladoras varíe en el curso de la enfermedad.

3. OBJETIVOS

General:

- Caracterización de las células T reguladoras intratumorales en una serie consecutiva de pacientes con linfoma MALT gástrico en el momento del diagnóstico y durante el seguimiento, identificadas mediante técnica inmunohistoquímica de FOXP3.

Específicos:

1. Describir la distribución de las células T reguladoras en linfomas MALT gástricos.
2. Comparar los resultados obtenidos con otros procesos gástricos, como la gastritis crónica y el linfoma difuso de célula B grande de estómago, para ampliar conocimientos sobre la biología del linfoma MALT gástrico.
3. Conocer la posible influencia del microambiente, mediante la cuantificación de células CD3+ y FOXP3+, en la respuesta al tratamiento.
4. Determinar la evolución de las células B tumorales identificadas mediante tinción de CD20 y de células del microambiente mediante determinación de CD3 y FOXP3 en función de los tratamientos administrados.

4. MATERIAL Y MÉTODOS

4.1. MATERIAL

4.1.1. Diseño del estudio/Esquema de trabajo

En este trabajo hemos realizado un estudio observacional y descriptivo, retrospectivo y prospectivo, en el que se han considerado dos fases principales, la del diagnóstico y la del seguimiento posterior.

En todas las biopsias del diagnóstico se ha efectuado:

1. Estudio morfológico e inmunohistoquímico
2. Estudios de clonalidad del receptor de células B
3. Estudio de alteraciones citogenéticas

En todas las biopsias correspondientes al seguimiento de los pacientes se han llevado a cabo los mismos estudios con el fin de determinar la presencia o no de enfermedad residual. El estudio morfológico e inmunohistoquímico se ha realizado en las muestras parafinadas mientras que, al disponer también en este caso de muestras congeladas, tanto los estudios de clonalidad como los estudios de detección de la translocación $t(11;18)(q21;q21)$ por técnicas de PCR (RT-PCR de la $t(11;18)(q21;q21)$) en casos positivos al diagnóstico, se han realizado en las muestras congeladas de que disponíamos siempre que ha sido posible, ya que se supone que la calidad del DNA en este material es superior que en las muestras parafinadas.

Asimismo, los productos de PCR se han analizado en un secuenciador automático mediante electroforesis capilar. En este caso hemos comparado el tamaño de los productos amplificados de las muestras de seguimiento con los de la muestra en el momento del diagnóstico. Además, para confirmar que la clona detectada es la misma que en el diagnóstico, se ha procedido a secuenciar estos productos de PCR para estudiar o descartar una posible evolución clonal de las células tumorales.

4.1.2. Población de estudio

En el estudio se han incluido muestras de 35 pacientes con diagnóstico de linfoma de la zona marginal extranodal gástrico (tipo MALT) según criterios OMS⁴ en nuestro centro en el período 2000-2008, con material disponible para revisión tanto del diagnóstico como de los seguimientos posteriores.

Las características clínicas de estos pacientes quedan resumidas en la tabla 4.1.2.1. Su mediana de edad ha sido de 64 años (rango, 32 a 83 años), con un 54% de hombres. A destacar que 32 pacientes (91%) tenían enfermedad gástrica localizada, 23 en estadio I y 9 en estadio II de Lugano. En el momento de empezar el estudio, se ha visto que en 17 casos (49%) el linfoma estaba relacionado con infección por *H. pylori*. En 10 de los 35 casos (29%) se ha observado la presencia de la translocación t(11;18)(q21;q21) en el momento del diagnóstico. Si bien en 12 casos (34%) se ha observado que las células tumorales presentan expresión nuclear de BCL10, en dos de ellos esta expresión no se ha visto asociada a las translocaciones t(11;18)(q21;q21) o t(1;14). En cuanto al tratamiento recibido, el número y tipo de tratamientos administrados a los pacientes incluidos en el estudio corresponden a los habituales en la práctica clínica o bien se han administrado en el contexto de ensayos clínicos, y aparecen resumidos en la tabla 4.1.2.2. Cabe destacar que 12 pacientes en el momento de entrar en el estudio ya habían sido tratados en otros centros con terapia erradicadora contra *H. pylori* como terapia única.

Número de pacientes	35
Mediana de edad (rango)	64 (32-83)
Sexo	
Masculino	19 (54%)
Femenino	16 (46%)
Estadio de Lugano	
I	23 (66%)
II	9 (26%)
IV	3 (9%)
Síntomas B	2 (6%)
<i>H. pylori</i>	17 (49%)
t(11;18)(q32;q32)	10 (29%)
Expresión nuclear de BCL-10	12 (34%)

Tabla 4.1.2.1. Características clínicas de los pacientes con linfoma MALT gástrico.

Número de tratamientos por paciente	
1	32
2	5
3	1
NR*	3
Tipo de tratamiento	
Terapia erradicadora anti-HP	12
Quimioterapia sola o en combinación sin rituximab	5
Rituximab solo o en combinación con quimioterapia tipo CHOP	4
Fludarabina	8
Fludarabina o bendamustina con Rituximab	9
Interferón/ribavirina	1

*NR, tratamiento no realizado

Tabla 4.1.2.2. Número y tipo de tratamientos administrados a los pacientes incluidos en el estudio.

4.1.3 Muestras de estudio

Para la realización de este estudio hemos utilizado todas las biopsias gástricas obtenidas de cada uno de los pacientes en el diagnóstico y seguimientos posteriores. Estas biopsias han sido fijadas en formol y parafinadas para su conservación permanente según el protocolo descrito en el apartado 4.2.2. Las muestras correspondientes al seguimiento se han obtenido en forma de muestreo de mucosa patológica o de la zona patológica inicial en los casos sin patología en ese momento. Se han cogido dos muestras en paralelo de cada una de las zonas de interés, procesándose una de igual forma que en el estudio inicial (fijación en formol y parafinación), y la otra se ha congelado en OCT. Como se supone que el DNA se halla mejor preservado en muestras congeladas que en muestras parafinadas, en el seguimiento se han utilizado las muestras congeladas para los estudios moleculares y las muestras en parafina para el estudio morfológico y el estudio inmunohistoquímico.

4.2. MÉTODOS

4.2.1. Obtención de la muestra

Las muestras correspondientes a mucosa gástrica han sido obtenidas mediante endoscopia digestiva alta.



Figura 4.2.1. Imagen endoscópica de una de las lesiones gástricas biopsiadas macroscópicamente en forma de placa de aspecto ulcerado y con depósito de fibrina. *

4.2.2. Procesado de las muestras

4.2.2.1. Protocolo de fijación

Las biopsias gástricas se han fijado en formaldehído al 4% durante 10 horas aproximadamente.

El formaldehído al 4% se obtiene a partir de un formaldehído concentrado al 37 % con un tampón pH 7 y se estabiliza con metanol (UN 2209, Panreac Química SA, Barcelona, España).

Para la obtención de 2 litros de formaldehído al 4% se diluyen 0,216 litros de formaldehído al 37% con 1,784 litros de agua destilada.

El objetivo de la fijación es bloquear la degradación del tejido y mantener al máximo la estructura del DNA así como facilitar la inclusión, los cortes y la tinción de los tejidos.

4.2.2.2. Protocolo de inclusión en parafina

Se ha procesado el tejido de forma automática durante 11,30 horas en el procesador de tejidos (Tissue-Tek® V.I.P.™ 2000, Miles Inc., Elkhart, Indiana) (Tabla 4.2.2).

Programa Rutina Diaria	Solución	Tiempo
1	Alcohol formol	2 horas
2	Alcohol 70°	2 horas
3	Alcohol 70°	30 min
4	Alcohol 96°	30 min
5	Alcohol 96°	45 min
6	Alcohol ABS	45 min
7	Alcohol ABS	45 min
8	Xilol	45 min
9	Xilol	45 min
10	Xilol	45 min
11	Parafina	30 min
12	Parafina	30 min
13	Parafina	30 min
14	Parafina	30 min

Tabla 4.2.2. Protocolo del programa de inclusión en parafina.

4.2.2.3. Preparación de los bloques de parafina

Una vez procesada la muestra, se han realizado los bloques de parafina en la estación de trabajo (Tissue-Tek® TEC™ 5 Tissue Embedding Console System, Sakura Finetek USA, Inc., Torrance, CA). Para ello, hemos requerido un molde adecuado al tamaño de la biopsia, que hemos rellenado de parafina líquida. A continuación, y tras extraer la biopsia del casete, la hemos introducido en el molde donde ha sido orientada adecuadamente y se ha terminado de rellenarlo con parafina. Lo hemos dejado unos minutos hasta la perfecta solidificación de la parafina, y una vez terminado este proceso, el bloque ya está listo para ser cortado.

4.2.2.3.1. Corte de los bloques de parafina para el diagnóstico histológico e inmunohistoquímico

Se cortan los bloques parafinados con un microtomo (Rohezy Microtome HM325, Microm Laborgeräte GMBH, Walldorf, Alemania) a 3 µm de grosor. El corte histológico es teñido con Hematoxilina-Eosina.

Para la realización del estudio inmunohistoquímico y de FISH se han realizado cortes del bloque de parafina más representativo (con más patología) de cada una de las biopsias gástricas de los enfermos del estudio y, a diferencia del estudio morfológico, se han utilizado portaobjetos tratados con carga electrostática (portaobjetos *superfrost plus*) (Thermo scientific, Braunschweig).

4.2.3. Evaluación de las biopsias gástricas

Una vez disponemos de los cortes teñidos con hematoxilina-eosina, hemos realizado su estudio morfológico para decidir en cuál de ellos la patología a estudio se encontraba más representada. El estudio inmunohistoquímico se ha realizado del bloque correspondiente al corte escogido.

Antes de aplicar la técnica, los cortes histológicos se han depositado en una estufa a 65° C durante 1 hora como mínimo, y a continuación se ha procedido a desparafinar e hidratar el tejido sumergiéndolo en xilol y, posteriormente, en un gradiente de alcoholes hasta H₂O destilada.

Pueden consultarse los anticuerpos que hemos utilizado en este estudio en la tabla 4.2.3.

Anticuerpo	Clona	Dilución	Desenmascaramiento	Casa comercial
CD79a	JCB117	1:100	EDTA pH9	DAKO
CD20	L26	1:800	EDTA pH9	DAKO
CD3	F7.2.38	1:50	EDTA pH9	Novocastra
CD43	DF-T1	1:50	Citrato pH6	DAKO

CD4	1F6	1:20	EDTA pH9	Novocastra
CD68	PG-M1	1:100	EDTA pH9	DAKO
FOXP3	236A/E7	1:100	EDTA pH9	eBioscience
BCL10	151.1			MBL Medical and Biological Laboratories
PD1		1:2	Citrato pH6	CNIO
Ki67	MIB-1	1:100	Citrato pH6	DAKO
Kappa	Policlonal	1:50000	Citrato pH6	DAKO
Lambda	Policlonal	1:50000	Citrato pH6	DAKO

Tabla 4.2.3. Detalle de los anticuerpos utilizados en este estudio, clona, dilución, método de desenmascaramiento y casa comercial.

4.2.4. Técnica inmunohistoquímica

Este estudio se ha llevado a cabo mediante el sistema EnVision Plus (Dako, Glostrup, Denmark). Se trata de un sistema más sensible y corto, que elimina el problema de la biotina endógena.

Los pasos básicos de la técnica son: desenmascaramiento antigénico, inhibición de la peroxidasa endógena, incubación con el anticuerpo primario y un sistema de visualización o revelado.

4.2.4.1. Desenmascaramiento antigénico

Es un paso indispensable para recuperar los epítomos antigénicos, ya que el formol con el que el tejido ha estado fijado ha producido una reticulación de las proteínas y un exceso de uniones aldehído. Se produce desenmascaramiento antigénico mediante calor o con la ayuda de enzimas. Cada anticuerpo ha sido sometido con anterioridad a una batería de diferentes condiciones de desenmascaramiento para determinar cuál es la que proporciona los resultados óptimos para cada anticuerpo de forma individual.

Actualmente, este paso se realiza de forma automatizada en un contenedor Pmlink (Dako, Glostrup, Denmark) que dispone de dos tanques para colocar los diferentes tampones (Citrato

pH6 y EDTA pH9), que dependerán del anticuerpo a estudiar (ver tabla 4.2.3). Se han colocado los racks con las laminillas en su interior y se ha activado el programa de 95° C durante 20 minutos. Una vez finalizado el ciclo se han colocado los racks en tampón de lavado durante 5 minutos como mínimo.

4.2.4.2. Inhibición de la peroxidasa endógena e incubación del anticuerpo primario

Este paso también se realiza de forma automatizada mediante el sistema Autostainer Plus Link de la casa comercial Dako (Dako, Glostrup, Denmark).

La dilución que se ha empleado para los distintos anticuerpos puede verse en la tabla 4.2.3.

4.2.4.3. Sistema de visualización

El sistema de visualización empleado ha sido Envision Flex (DAKO) en el que se produce la unión del anticuerpo primario con un polímero de dextrano inerte conjugado con la enzima peroxidasa de rábano. La incubación es de 20 minutos. El sustrato cromógeno utilizado para el revelado de la inmunotinción ha sido Diamino Benzidina (DAB).

Se ha finalizado el proceso con una coloración de contraste con Hematoxilina de Mayer, con tiempo de incubación de 2 minutos.

A partir de aquí, el proceso se ha efectuado manualmente. Las preparaciones se han lavado con agua corriente (mínimo 2 veces, 5 minutos cada vez), y se han deshidratado con gradiente creciente de alcoholes hasta xilol.

Por último se ha procedido al montaje permanente de las preparaciones con DPX en una máquina montadora Leica CV 5030.

El número de células CD20+ y FOXP3+ ha sido cuantificado mediante un ocular micrométrico (WPK 10xmn) que tiene una cuadrícula de 1 mm² dividida en 100 cuadrados.

4.2.5. Estudios moleculares

4.2.5.1. Extracción de DNA de las muestras parafinadas

Para ello se ha utilizado una sección completa de la biopsia en estudio y se ha realizado mediante el kit QIAamp de tejidos (QIAGEN, Hilden, Germany), de dos días de duración, que consiste en:

Primer día:

- Realizar dos secciones de 15 μm cada una, del bloque de parafina y ponerlas en un tubo eppendorf.
- Añadir 1.200 μl de xileno y agitar vigorosamente con el fin de extraer la parafina.
- Centrifugar a máxima velocidad durante 5 minutos a temperatura ambiente.
- Extraer el sobrenadante con una pipeta.
- Añadir 1.200 μl de etanol absoluto al pellet para extraer el xileno residual y mezclar la agitación. Centrifugar 5 minutos a 10.000 rpm. Extraer el sobrenadante con una pipeta.
- Incubar con el tubo abierto a 37° C de 10 a 15 minutos hasta que el etanol se haya evaporado del pellet.
- Resuspender el pellet en 180 μl del tampón de lisis tisular ATL incluido en el Kit QIAamp de tejidos.
- Añadir 20 μl de Proteinasa K, mezclarlo bien e incubar a 55° C toda la noche en un baño de agitación hasta que el tejido quede bien lisado.

Segundo día:

- Poner el baño seco antes de empezar a 70° C.
- Añadir 200 μl del tampón de lisis AL incluido en el kit QIAamp de tejidos, mezclar e incubar a 70° C durante 10 minutos para conseguir una solución homogénea.
- En este paso la muestra tiene que estar homogeneizada, si bien a veces se puede formar un precipitado blanco que en algunos casos se disuelve incubando a 70° C. De todos modos el precipitado no interfiere en los pasos posteriores.

- Añadir 210 µl de etanol absoluto y mezclar bien.
- Poner una columna QIAamp en un tubo de 2 ml (proporcionada por el kit). Con mucho cuidado, añadir la mezcla anterior dentro de la columna y centrifugar a 8.000 rpm durante 1 minuto.
- Poner la columna en un tubo de 2 ml nuevo y descartar el tubo que contiene el filtrado. Abrir la columna y añadir 500 µl de tampón AW1 del kit QIAamp de tejidos. Centrifugar a 8.000 rpm durante 1 minuto, y volver a poner la columna dentro de un tubo nuevo de 2 ml.
- Abrir de nuevo la columna y añadir otra vez 500 µl de tampón AW2 del kit QIAamp de tejidos. Centrifugar a máxima velocidad durante 3 minutos.
- Volver a poner la columna en un tubo nuevo, abrirla y eludir el DNA una vez con 100 µl de agua destilada precalentada a 70° C.
- Incubar a temperatura ambiente durante 1 minuto y centrifugar a 8.000 rpm durante 1 minuto.
- La muestra eluida en el eppendorf contendrá el DNA.

4.2.5.2. Extracción de DNA de las muestras congeladas

Para ello se ha utilizado una sección completa de la biopsia en estudio y se ha realizado mediante el kit QIAamp de tejidos (QIAGEN, Hilden, Germany), de dos días de duración, que consiste en:

Primer día:

- Realizar dos secciones de 15 µm del tejido congelado con OCT y ponerlas en un tubo eppendorf.
- Añadir 1.200 µl de PBS y agitar vigorosamente con el fin de lavar la muestra de OCT.
- Centrifugar a máxima velocidad durante 5 minutos a temperatura ambiente.
- Extraer el sobrenadante con una pipeta.
- Resuspender el pellet en 180 µl del tampón de lisis tisular ATL incluido en el Kit QIAamp de tejidos.
- Añadir 20 µl de Proteinasa K, mezclarlo bien e incubar a 55° C toda la noche en un baño de agitación hasta que el tejido quede bien lisado.

Segundo día: El procedimiento es el mismo que el que se realiza para el tejido parafinado (Apartado 4.2.5.1)

4.2.5.3. Lectura de DNA en el espectrofotómetro Nanodrop ND-1000

Para determinar la concentración de DNA (o de RNA) de la muestra eluida obtenida con el procedimiento anterior, hemos realizado su lectura en el espectrofotómetro Nanodrop ND-1000.

Para ello, hemos seguido los siguientes pasos:

1. Hemos limpiado las superficies ópticas superior e inferior del sistema de retención de la muestra del microespectrómetro. Para ello hemos puesto 1µl de agua destilada en la superficie óptica inferior y bajado el brazo superior, con lo que se han lavado ambas superficies ópticas. Posteriormente, hemos subido el brazo y lo hemos secado con un pañuelo de papel.
2. Hemos abierto el programa informático del Nanodrop ND-1000 y hemos seleccionado el apartado correspondiente a muestras de DNA (o RNA en su defecto).
3. Hemos iniciado el programa poniendo 1µl de agua limpia en la superficie óptica inferior, hemos bajado el brazo y seleccionado *inicialize* en el software del Nanodrop ND-1000. Cuando la inicialización ha sido completa, hemos limpiado ambas superficies ópticas con un pañuelo de papel.
4. Hemos realizado el blanco poniendo 1µl de agua destilada en la superficie óptica inferior y seleccionado *blank* en el software del Nanodrop ND-1000. Cuando hemos hecho el blanco, hemos limpiado ambas superficies ópticas con un pañuelo de papel.
5. Medimos nuestra muestra poniendo 1µl de la misma en la superficie óptica inferior y seleccionamos *measure* en el software del Nanodrop ND-1000. Hemos procedido a limpiar ambas superficies una vez terminada la lectura. Dicha lectura ha sido expresada en el programa en forma de concentración ng/ml o bien mediante una ratio.

4.2.5.4. Extracción de RNA de las muestras congeladas

La técnica queda resumida en los siguientes pasos:

- Hemos realizado un corte del bloque de material congelado con OCT y hemos añadido 1 ml de Trizol al tejido.
- Hemos pasado esta solución unas 15-20 veces por una jeringa de 2 ml con una aguja de 20G. Cuando la solución ha resultado ser muy viscosa, hemos añadido un poco más de Trizol.
- Lo hemos dejado como mínimo 5 minutos a 4° C, para permitir la completa disociación de los complejos proteínicos-ácido nucleicos.
- Hemos añadido 200 µl de cloroformo por cada ml de Trizol utilizado. Posteriormente, hemos agitado vigorosamente durante 15 segundos y lo hemos dejado nuevamente en gel durante 5 minutos (mínimo).
- Hemos centrifugado a 14.000 rpm durante 15 minutos a 4° C. En este paso se han formado dos fases: una fase inferior, que es orgánica y contiene DNA y proteínas, y una fase superior, que es acuosa y contiene RNA.
- Hemos transferido con mucho cuidado la fase acuosa en un nuevo eppendorf estéril. Hemos añadido un volumen igual de isopropanol (2-propanol), aproximadamente 600 µl. Hemos mezclado por inversión y dejado las muestras durante 10 minutos a 4° C (mínimo). En este paso, si no nos ha sido posible continuar, hemos conseguido detener el proceso dejando la muestra a -20° C hasta el día siguiente.
- Hemos centrifugado a 14.000 rpm durante 10 minutos a 4° C. El RNA ha formado un precipitado blanco (muy pequeño) en el fondo del tubo eppendorf, por lo que hemos tirado el sobrenadante con mucho cuidado de no perder el precipitado blanco.
- Hemos realizado 2 lavados con etanol 75% preparado con H₂O DEPC a 10.000 rpm durante 5 minutos a 4° C, y tirado el sobrenadante después de cada lavado.
- Hemos dejado secar el precipitado blanco poniendo los tubos boca abajo sobre un kleenex un mínimo de 30 minutos.
- Hemos añadido 40 µl de H₂O DEPC y dejado que se disolviera el pellet a 4° C un mínimo de 30 minutos.

- Finalmente, hemos leído la concentración del RNA en un Nanodrop (ND-1000). En este caso los pasos han sido los mismos que en el apartado anterior (apartado 4.2.5.3) pero seleccionando la opción del programa del Nanodrop ND-1000 correspondiente a lectura de muestras RNA.

4.2.5.5. Técnica de la retrotranscripción (obtención de cDNA a partir de RNA)

En primer lugar hemos preparado el reactivo MIX. Este reactivo puede prepararse con anterioridad y ser congelado hasta el momento de su utilización.

Para la preparación de un volumen de 1.000 µL hemos utilizado H₂O DEPC, Tampón 5x first strand, DTT 0.1M, dNTPs 25mM y Pd(N)₆ 5mg/mL, según las cantidades indicadas en la tabla 4.2.5.

REACTIVOS MIX	Vf= 1.000 µl
H ₂ O DEPC	420
Tampón 5x first strand	428
DTT 0.1M	21,5
dNTPs 25 mM	85,5
Pd(N) ₆ 5mg/mL	45

Tabla 4.2.5. Detalle de los componentes y cantidades de cada uno del MIX para la técnica de la retrotranscripción para un volumen final de 1.000 µl.

Una vez preparado el reactivo MIX, este ha sido alícuotado en un volumen de 175 µl y congelado a -20° C. Cada una de estas alícuotas nos ha servido posteriormente para procesar 8 muestras.

En el momento de hacer la retrotranscripción (cDNA) hemos descongelado una de las alícuotas previamente preparadas, y le hemos añadido 12 µl de M-ML VRT (200 U/ µL) y 6 µL RNA sin (40/ µL).

Por otro lado, según la concentración de RNA de la muestra (que hemos leído según lo especificado en el apartado 4.2.5.3) hemos cogido el volumen equivalente a 1 µg de RNA y le hemos añadido un volumen de H₂O DEPC necesario para obtener un volumen total de 19 µL.

Esta mezcla RNA y de H₂O DEPC se ha centrifugado un pulso y puesto en el termociclador 5 minutos a 65° C.

Para finalizar, a los 19 µL de la mezcla RNA+ H₂O DEPC se ha añadido 21 µL del preparado de reactivo MIX, y se ha dejado a 37° C durante las dos primeras horas y a 65° C los siguientes 10 minutos. Posteriormente se ha guardado a -20°C.

4.2.5.6. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

La técnica de PCR permite la síntesis y amplificación de las secuencias específicas de la doble cadena de DNA in vitro. Esta técnica se basa en una de las características de la DNA polimerasa, que trabaja únicamente en dirección 5' a 3'. Para iniciarla hemos colocado en el tubo de trabajo todos los componentes, que son:

- los 4 nucleótidos (dNTPs) con una concentración óptima de tampón de cloruro de magnesio (MgCl₂),
- los *primers* o cebadores, que corresponden a secuencias de DNA monocatenario de entre 15 y 30 pares de bases (pb) que se unen al extremo 5' de la cadena de DNA que se copiará y que servirán de inicio para copiar las nuevas cadenas a partir de su extremo 3' libre.
- Por último, se añade la Taq ADN polimerasa (AmpliTaq Gold, Applied Biosystems, Foster City, CA), que se unirá al extremo 3' de los *primers* a partir de los cuales se copiará la cadena de DNA.

La Taq polimerasa fue aislada de la bacteria *Thermophilus Aquaticus*, es estable al calor y su una temperatura óptima de trabajo es de 72° C.

Cada muestra se ha preparado por duplicado y, además, se ha incluido:

- un control negativo, que contiene 1 µl de H₂O sin DNA, y
- un control positivo, que contiene de 1 a 5 µl de ADN

Se ha puesto en marcha el termociclador automatizado cerrado (Applied Biosystems, Foster City, CA) y en el momento en que éste ha indicado una temperatura de 95° C se han colocado los tubos de trabajo preparados según especificación previa.

En el termociclador han pasado por varias etapas o ciclos repetitivos, cada uno de ellos integrado por 3 reacciones que se diferencian en la temperatura de trabajo y el tiempo de incubación:

- Primera etapa o desnaturalización: a alta temperatura, 94-95° C, para desnaturalizar la doble cadena de ADN en cadenas simples.
- Segunda etapa o hibridación: a temperatura relativamente baja, 50-70° C, en la que se producirá la hibridación de los *primers* con las secuencias complementarias del ADN.
- Tercera etapa o extensión: a una temperatura intermedia, 72° C, que corresponde a la temperatura óptima de trabajo de la Taq polimerasa. En esta etapa se producirá la síntesis de nuevas cadenas de DNA a partir del extremo 3' de los *primers* hibridados.

Una característica importante de la PCR es que todas las secuencias de DNA servirán posteriormente para la síntesis de otras cadenas nuevas de DNA en los ciclos posteriores. Normalmente los ciclos se repiten de 30 a 40 veces, precedidos de 10 minutos a 95° C y terminados por 10 minutos a 72° C.

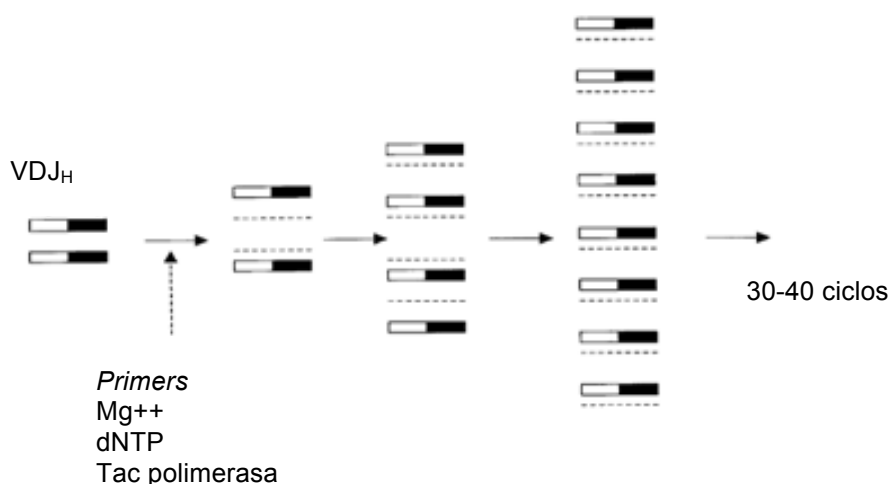


Figura 4.2.5.6. Ilustración esquemática de la amplificación exponencial en la técnica de PCR de Medeiros LJ y Carr J⁴⁴.

Una vez finalizada la amplificación, hemos sacado los tubos del termociclador y los hemos mantenido a 4° C hasta que hemos analizado el producto de la reacción en un gel de agarosa o mediante electroforesis capilar.

4.2.5.6.1. PCR Control de calidad del DNA obtenido

Dado que el DNA extraído de muestras parafinadas suele ser de menor calidad en comparación con las muestras procesadas en fresco o congeladas, es fundamental estudiar la integridad y amplificabilidad del DNA con el que trabajamos, es decir, cuál es el tamaño máximo de los productos que podremos amplificar con el DNA de que disponemos. Para ello hemos utilizado el protocolo multiplex BIOMED-2 Control Gene tube, en el que se han realizado productos de PCR de 100, 200, 300, 400 y 600 pb. Por debajo de 300 pb, la calidad del DNA no es muy buena, por lo que el resultado del estudio de clonalidad será poco creíble.

Para realizar esta PCR hemos necesitado un volumen final de 50 µl a partir de una mezcla de reacción de PCR de 49 µl y 1 µl de ADN.

Para preparar la mezcla de reacción de PCR, hemos requerido los elementos detallados en la tabla 4.2.5.6.1.1

Mix	1x
Tpx10 sin MgCl ₂	5
MgCl ₂ 25 mM	4
dNTP 2 mM	5
Primer Mix	1
H ₂ O	33,75
Taq Gold	0,25

Tabla 4.2.5.6.1.1. Detalle de los componentes y cantidades del MIX que se requieren para la técnica de la PCR de control de calidad para cada muestra.

El Primer Mix lo hemos preparado con anterioridad (estará congelado a -20°C en alícuotas de 50 o 100 μl) y consiste en una mezcla equimolar de los 10 primers necesarios para la PCR a una concentración 10 μM . Por cada muestra estudiada hemos necesitado 1 μl de esta mezcla.

A continuación hemos iniciado el programa de PCR del termociclador 2700 (Applied Biosystems, Foster City, CA) según las condiciones especificadas en la tabla Tabla 4.2.5.6.1.2

Nº ciclos	Temperatura	Tiempo
40	95° C	10 min
	95° C	45 seg
	60° C	45 seg
	72° C	90 seg
	72° C	10 min

Tabla 4.2.5.6.1.2. Condiciones de la PCR de control de calidad realizada con el termociclador 2700 (Applied Biosystems, Foster City, CA).

Finalmente, los productos de la PCR se han analizado mediante electroforesis en un gel de agarosa al 2%.

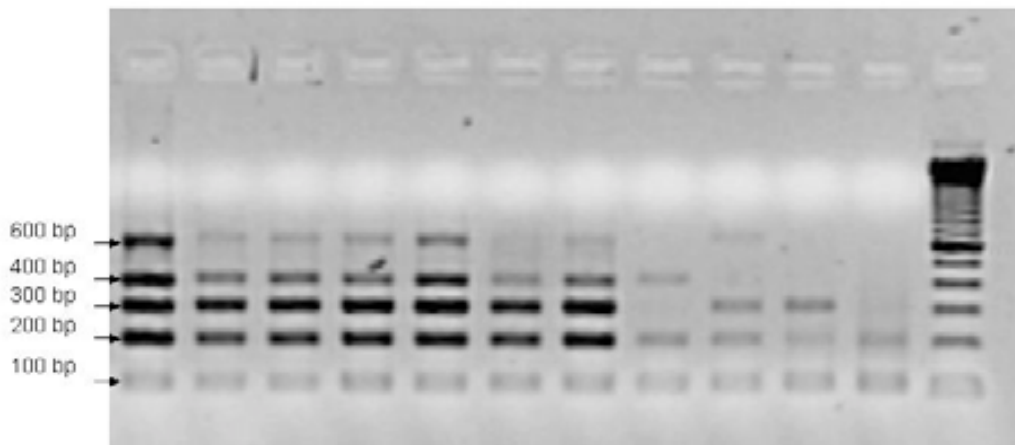


Figura 4.2.5.6.1. Ejemplo del resultado de la PCR de control de calidad.

4.2.5.7. Análisis de la translocación t(11;18)(q21;q21) por RT-PCR

Con el fin de amplificar el reordenamiento del producto de la translocación t(11;18), API2-MALT1, hemos realizado una PCR con un volumen final de 50 µl a partir de una mezcla de reacción de PCR de 49 µl y 1 µl de cDNA.

Para preparar la mezcla de reacción de PCR, hemos requerido los elementos detallados en la tabla 4.2.5.7.1.

Mix 1	X1	Mix 2	X1
Tpx10 sin MgCl ₂	2.5	Tpx10 sin MgCl ₂	5
MgCl ₂ 25 mM	2	MgCl ₂ 25 mM	3
dNTP 2 mM	2,5	dNTP 2 mM	5
MALT 10 µM (forward)	2	MALT 10 µM (forward)	2
Reverse 1 (R1) 10 µM	2	Reverse 2 (R2) 10 µM	1
H ₂ O	13,75	H ₂ O	13,75
Taq Gold	0,25	Taq Gold	0,25

Tabla 4.2.5.7.1. Componentes de los MIX necesarios para la realización de la RT-PCR para el estudio de la translocación t(11;18)(q21;q21).

A continuación hemos iniciado el programa de PCR del termociclador 2700 (Applied Biosystems, Foster City, CA), en el que ha tenido lugar una pre-PCR y una PCR, según las condiciones especificadas en las tablas 4.2.5.7.2 y 4.2.5.7.3.

Una vez terminada la reacción el producto puede dejarse a temperatura ambiente (10° C) por tiempo indefinido.

Nº ciclos de pre-PCR	Temperatura	Tiempo
1	95° C	10 min
	65° C	1 min
	72° C	90 seg
1	95° C	1 min
	64° C	1 min
	72° C	90 seg

Tabla 4.2.5.7.2. Condiciones de la pre-PCR realizada para el estudio de la translocación t(11;18)(q21;q21) con el termociclador 2700 (Applied Biosystems, Foster City, CA).

Nº ciclos PCR	Temperatura	Tiempo
2	95° C	1 min
	63° C	1 min
	72° C	90 seg
6 holds	95° C	1 min
	61° C	1 min
	72° C	90 seg
	95° C	1 min
	60° C	1 min
	72° C	90 seg
2	95° C	1 min
	59° C	1 min
	72° C	90 seg
35	95° C	1 min
	58° C	1 min
	72° C	90 seg
2 holds	72° C	10 min

Tabla 4.2.5.7.3. Condiciones de la PCR realizada para el estudio de la translocación t(11;18)(q21;q21) con el termociclador 2700 (Applied Biosystems, Foster City, CA).

Finalmente, los productos de la PCR para el estudio del reordenamiento de API2-MALT1 se han analizado mediante electroforesis en un gel de agarosa al 2%.

4.2.5.8. Análisis de las regiones FR1, FR2, FR3 de los genes que codifican para la cadena pesada de las inmunoglobulinas

Con el fin de amplificar el reordenamiento de las regiones FR1, FR2, FR3 de las cadenas pesadas de las inmunoglobulinas, hemos realizado una PCR con un volumen final de 50 μ l a partir de una mezcla de reacción de PCR de 49 μ l y 1 μ l de ADN.

Para preparar la mezcla de reacción de PCR, diferente para cada región estudiada, hemos necesitado los elementos detallados en las tablas 4.2.5.8.1.

FR1	μ L	FR2	μ L	FR3	μ L
Tampón 10x	5	Tampón 10x	5	Tampón 10x	5
MgCl ₂ 25mM	3	MgCl ₂ 25mM	3	MgCl ₂ 25mM	3
dNTP 2mM	5	dNTP 2mM	5	dNTP 2mM	5
Primer mix FR1	1	Primer mix FR2	1	Primer mix FR3	1
H ₂ O	34,75	H ₂ O	34,75	H ₂ O	34,75
Taq Gold	0,25	Taq Gold	0,25	Taq Gold	0,25

Tabla 4.2.5.8.1. Componentes de los MIX necesarios para la realización de la PCR para el reordenamiento de las regiones FR1, FR2 y FR3 de la cadena pesada de las inmunoglobulinas.

El conjunto de *sense primers* utilizados en el caso de las regiones FR1, FR2 y FR3 (primer mix FR1, FR2 y FR3) están formados por 6 o 7 oligonucleótidos capaces de hibridar con su correspondiente segmento V_H (V_H1- V_H7). Todos ellos comparten un único *antisense primer* J_H consenso marcado con un fluorocromo (J_Hconflu) para permitir su detección posterior en el equipamiento del secuenciador automático (ABIPrism 3500DX, Applied Biosystems, Foster City, CA).

- *primer mix* FR1: V_H1-V_H2-V_H3-V_H4-V_H5-V_H6-J_Hconflu
- *primer mix* FR2: V_H1-V_H2-V_H3-V_H4-V_H5-V_H6- V_H7-J_Hconflu
- *primer mix* FR3: V_H1-V_H2-V_H3-V_H4-V_H5-V_H6- V_H7-J_Hconflu

A continuación hemos iniciado el programa de PCR del termociclador 2700 (Applied Biosystems, Foster City, CA) según las condiciones especificadas en la tabla 4.2.5.8.4, que han sido idénticas para cualquiera de las regiones estudiadas:

Nº ciclos	Temperatura	Tiempo
1	95° C	10 min
40	95° C	45 seg
	60° C	45 seg
	72° C	90 seg
1	72° C	10 min

Tabla 4.2.5.8.4. Condiciones de la PCR del estudio de clonalidad de las regiones FR1, FR2, FR3 realizado con el termociclador 2700 (Applied Biosystems, Foster City, CA).

Los productos de la PCR, según la región estudiada del gen que codifica para la cadena pesada de las inmunoglobulinas, presentan unos rangos de banda clonal característicos (véase tabla 4.2.5.8.5).

Primer	Rango de producto de amplificación
FR1	310-360 pb
FR2	250-295 pb
FR3	100-170 pb

Tabla 4.2.5.8.5. Longitud de los fragmentos obtenidos en el estudio de reordenamiento de las regiones FR1, FR2, FR3 de la cadena pesada de las inmunoglobulinas.

Finalmente, los productos de la PCR para el reordenamiento de las regiones FR1, FR2, FR3 se han analizado mediante una técnica de electroforesis capilar y análisis de los fragmentos en un secuenciador automático (ABIPrism 3100, Applied Biosystems, Foster City, CA).

4.2.5.9. Listado de los *primers* utilizados

Primer	Secuencia 5' a 3'
V _H 1-FR1	GGCCTCAGTGAAGGTCTCCTGCAAG
V _H 2-FR1	CTTACCTGAGGAGACGGTGACC

V_H3-FR1	CTGGGGGGTCCCTGAGACTCTCCTG
V_H4-FR1	CTTCGGAGACCCTGTCCCTCACCTG
V_H5-FR1	CGGGGAGTCTCTGAAGATCTCCTGT
V_H6-FR1	TCGCAGACCCTCTCACTCACCTGTG
V_H1-FR2	CTGGGTGCGACAGGCCCTGGACAA
V_H2-FR2	TGGATCCGTCAGCCCCAGGGAAGG
V_H3-FR2	GGTCCGCCAGGCTCCAGGGAA
V_H4-FR2	TGGATCCGCCAGCCCCAGGGAAGG
V_H5-FR2	GGGTGCGCCAGATGCCCGGGAAGG
V_H6-FR2	TGGATCAGGCAGTCCCCATCGAGAG
V_H7-FR2	TTGGGTGCGACAGGCCCTGGACAA
V_H1-FR3	TGGAGCTGAGCAGCCTGAGATCTGA
V_H2-FR3	CAATGACCAACATGGACCCTGTGGA
V_H3-FR3	TCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCC
V_H4-FR3	GAGCTCTGTGACCGCCGCGGACACG
V_H5-FR3	CAGCACCGCCTACCTGCAGTGGAGC
V_H6-FR3	GTTCTCCCTGCAGCTGAACTCTGTG
V_H7-FR3	CAGCACGGCATATCTGCAGATCAG
JH	CTTACCTGAGGAGACGGTGACC
MALT-F	ATTAATGCTGCCGTGGAAAT
MALT-R1	GCTTTTGGGAAGTTGGTTCA
MALT-R2	GGTGCTCCCGTAATTCATA
100F	GCCCGACATTCTGCAAGTCC
100R	GGTGTGGCCGGAAGGGTT
200F	TGTTGACTCGATCCACCCCA
200R	TGAGCTGCAAGTTTGGCTGAA
300F	TGCGATGTGGTCATCATGGTG
300R	CGTGTCATTGTCGTCTGAGGC
400F	CCGCAGCAAGCAACGAACC
400R	GCTTTCTCTGGCGGCTCC
600F	GGAGCAGCATTCCATCCAGC
600R	CATCCATGGGCCGGACATAA

4.2.5.9. Tabla con el listado de todos los *primers* utilizados en este estudio.

4.2.5.10. Electroforesis en gel de agarosa

Los productos de la PCR para el estudio del reordenamiento de API2-MALT1 y el control de calidad del DNA se han analizado mediante electroforesis en un gel de agarosa al 2%, con el fin de separar los productos amplificados.

Para preparar el gel de agarosa hemos:

1. Pesado 2 gr de agarosa y en una probeta medido 100 ml de tampón tris-bórico-EDTA (TBE) a una concentración de 0,5x.
2. Colocado la agarosa y el TBE en un Erlenmayer y disuelto la agarosa en el microondas.
3. Preparado las cubetas.
4. Añadido 5 µl de bromuro de etidio a la concentración de 10 mg/ml por cada 100 ml de TBE a una concentración de 0,5x.
5. Agitado y puesto en la cubeta, colocado los peines y esperado a que solidificara.
6. Quitado los peines, y en el espacio que éstos ocupaban hemos podido observar los pocillos.

Una vez solidificado el gel de agarosa, hemos cargado las muestras en los pocillos del gel para la electroforesis. Para ello, hemos:

1. Sumergido el gel en una cubeta con tampón TBE 0,5x.
2. Cargado las muestras en los pocillos del gel de agarosa. Cada muestra consta de 10 µl del producto de PCR y 2 µl de tampón de azul de bromofenol a una concentración 6x (40% de sacarosa, 25% de azul de bromofenol y 0,125 gramos de xileno cyanol (Kodak)).
3. Cargado el marcador de peso molecular para determinar la medida de los fragmentos.
4. Conectado la fuente de alimentación y dejado migrar a un voltaje de 100-120 V durante 30 minutos.

Por último, hemos visualizado los productos de la PCR colocando el gel en un transiluminador de luz ultravioleta (UV) (Gene Genius, Syngene) y hemos tomado fotografías. Un caso se ha

considerado positivo para el reordenamiento de API2-MALT1 cuando se ha detectado una banda de peso molecular característico, prominente y por duplicado después de la transiluminación.

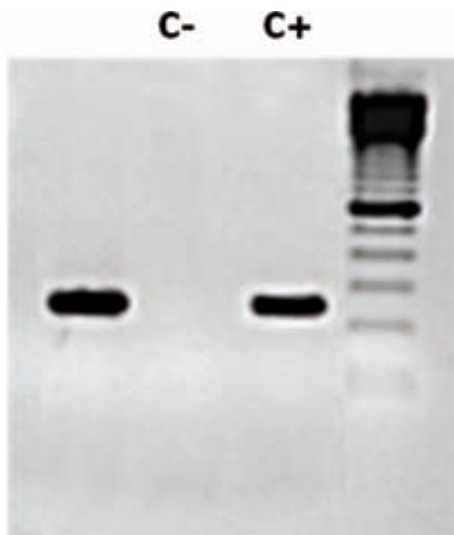


Figura 4.2.5.10. Ejemplo de caso positivo para la translocación t(11;18)(q21;q21).

4.2.5.11. Análisis de los fragmentos

Los productos de la PCR para el reordenamiento de la cadena pesada de las inmunoglobulinas con la utilización de los *primers* para las regiones FR1, FR2, FR3 se han analizado mediante la técnica de electroforesis capilar y análisis de los fragmentos en un secuenciador automático (ABIPrism 3100, Applied Biosystems, Foster City, CA), que separa los productos de la PCR en un polímero de alta resolución según su longitud. Esta técnica es rápida y relativamente sencilla, pero requiere de un equipamiento caro.

Para la preparación de la muestra que se pone en el secuenciador hemos necesitado 1 μ l del producto de PCR y 10 μ l de una mezcla de 200 μ l de foramida y 10 μ l de patrón de peso molecular (GeneScan 500 ROX Size, Standard, Applied Biosystems).

Las cadenas sencillas (desnaturalizadas) correspondientes a los productos de la PCR marcadas con un fluorocromo para los *primers* hibridados se han separado según su tamaño en un polímero de secuenciación capilar mediante escaneo automático con un láser.

En el caso de proliferaciones linfoides policlonales hemos obtenido una distribución *gaussiana* de múltiples picos, representando diferentes productos de PCR y en los casos de proliferación

linfoide monoclonal o un solo pico, o monoclonal bialéica o biclonal en el caso de dos picos, respectivamente.

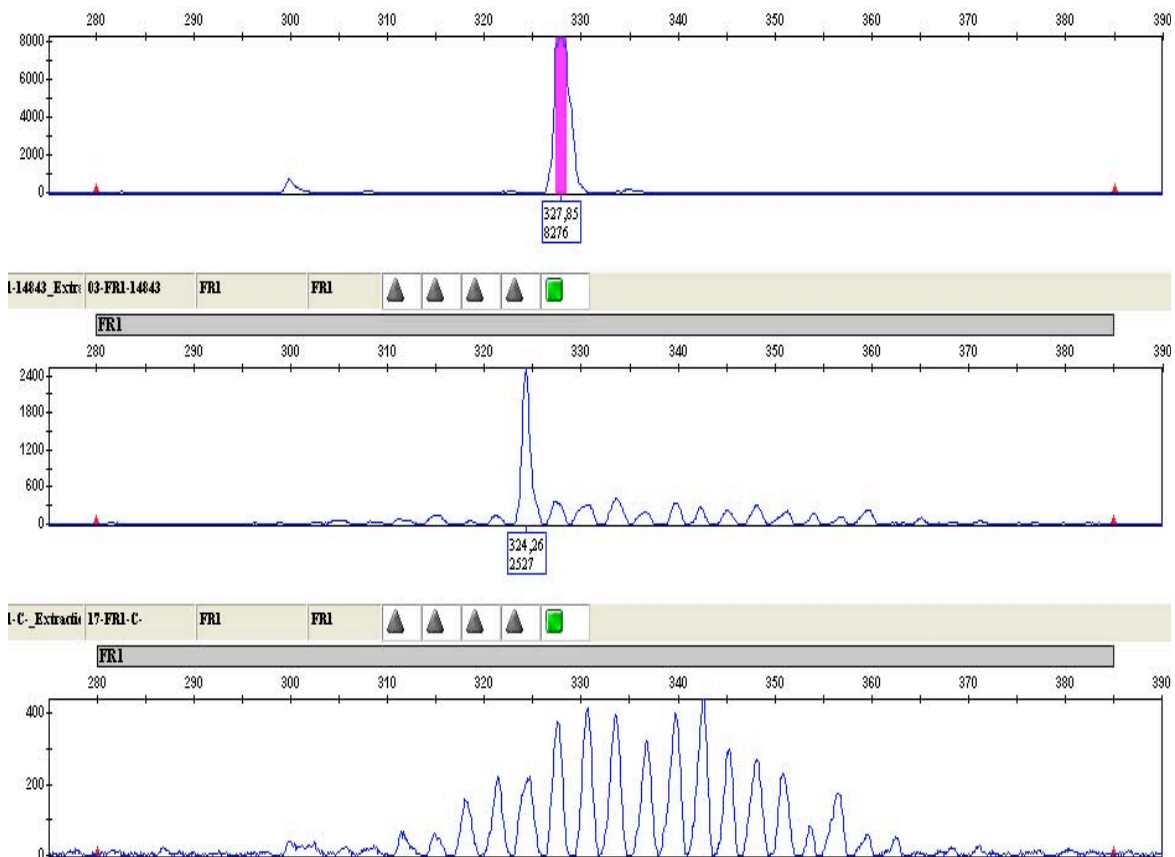


Figura 4.2.5.11. Ejemplos de control policlonal y de caso monoclonal.

4.2.5.12. Estudio de alteraciones citogenéticas al diagnóstico mediante técnicas de hibridación in situ fluorescente (FISH) sobre tejido parafinado

El protocolo utilizado es el que se detalla a continuación:

1. Colocar los cristales con el corte histológico parafinado entre media hora a toda la noche en estufa a 65° C (hasta que la parafina «llore»).
2. Desparafinación: Para ello realizaremos los siguientes baños de forma consecutiva:
 - Xilol: 10 min (3 veces)
 - Etanol 100%: 5 min (2 veces)

- Etanol 80%: 5 min
- Etanol 70%: 5 min
- H₂O destilada (conservar en este paso hasta que el pretratamiento pueda tener lugar).

3. Se recomienda realizar el pretratamiento con EDTA-Microondas. Para ello se colocan los cristales en un recipiente con tampón EDTA y se incuban durante 3 tandas de 7, 5 y 7 minutos respectivamente (19 minutos en total) en microondas a máxima potencia. Evitar que la solución EDTA hierva. En ese caso, parar el microondas y dejar enfriar.

4. Tratamiento con pepsina: Previamente tendrán que prepararse las siguientes soluciones:

- Solución 0.1mM de HCl: 10 ml de H₂O + 100 µl HCl 1M + 5 µl de pepsina (100 mg/ml)
- Solución de STOP: 50 ml de PBS 1x + 2.5 ml de Mg₂Cl 1M

Una vez listas estas soluciones procederemos al tratamiento con pepsina:

- Precalentar la cámara húmeda a 37° C (estufa).
- Colocar 40 µl de la solución con pepsina sobre cada corte.
- Cubrir los cortes e incubar 30 min en estufa a 37° C. Se controla la digestión observando la preparación con un microscopio de contraste de fases. Si ésta no fuera suficiente, el tiempo se puede alargar a 45 min.
- Introducir los portas en solución de STOP 5 min.
- Lavar en agua.
- Secar los portas.

5. Hibridación:

Este paso tiene lugar en dos días, según se detalla a continuación:

a. DÍA 1

Preparación de la sonda y de la muestra

- Mezclar 3,5 µL de tampón + 0,5 µL de sonda + 1 µL de H₂O a RT en un eppendorf cubierto con papel de plata. Mezclar bien (vórtex).
- Centrifugar la mezcla de 1 a 3 segundos.

- Colocar 5 μ L de la mezcla de la sonda sobre el área del porta marcada. Cubrir con un cubreobjetos de 20x20 mm y sellar con pegamento.

Desnaturalización-Hibridación

- Encender el aparato (Hybrite).
- Seleccionar el programa a utilizar. Para sondas centroméricas o de locus específico se utiliza el programa #3:
 - *Melting*: 80°C, 5 min.
 - *Hybridization*: 37°C, 30 h.
- Colocar en las ranuras de los lados un papel de filtro húmedo para mantener la humedad en el aparato durante la hibridación.
- Colocar los portaobjetos sobre la placa.
- Esperar que el proceso de desnaturalización y posterior hibridación tenga lugar (desde 4 horas a toda la noche).

b. DÍA 2

Lavados de posthibridación (con Formamida)

- Eliminar mediante unas pinzas el pegamento de sellado de los cubres uno a uno y colocarlos en el primer baño.
- Realizar 3 lavados en solución de Formamida 50% durante 10 min a 45° C.
- Realizar 1 lavado en solución de 2xSSC durante 10 min a 45° C.
- Realizar 1 lavado en solución de 2xSSC/0.1%NP-40 durante 5 min a 45° C.
- Dejar secar los portas en la oscuridad.

Contratinción

- Colocar 7 μ L de DAPI II en el área diana y cubrir con un cubre de 20x20 ó 24x24mm.
- Mantener las preparaciones a –20° C en una caja oscura un mínimo de 30 min hasta su observación.

4.2.5.13. Sondas de FISH utilizadas en el estudio

4.2.5.13.1. Vysis LSI *API2/MALT1* t(11;18)(q21;q21) Dual Color, Dual Fusion Translocation Probe

Con esta sonda se marcan las regiones del gen *API2*, localizado en el cromosoma 11, y del gen *MALT1*, localizado en el cromosoma 18, con dos fluorocromos distintos. El patrón de normalidad muestra 2 señales rojas y 2 señales verdes separadas correspondientes a cada una de las copias del gen de cada uno de los cromosomas, mientras que una señal en amarillo indica fusión de ambos genes y, por tanto, que la translocación estudiada está presente (figura 4.2.5.13.1.1).

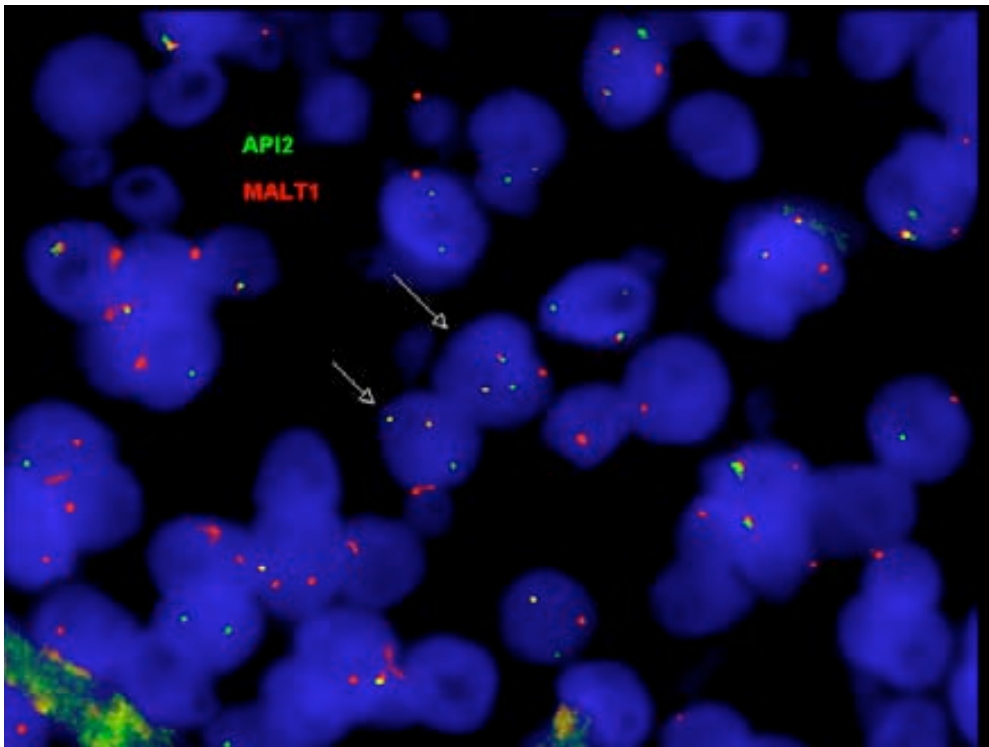


Figura 4.2.5.13.1.1. Caso de linfoma MALT con la translocación t(11;18). Se observa en cada célula una señal verde, una señal roja y una señal amarilla, ésta última como resultado de la fusión de rojo y verde y por tanto, sinónima de translocación.

4.2.5.13.2. Sonda *BCL10* DNA Probe, Fluorochrome-Conjugated (Dako) «Break-apart»

En este caso, se marcan ambos flancos del gen de interés con dos fluorocromos distintos, rojo y verde, y la imagen de fusión de color amarillo indica ausencia de reordenamiento, mientras que si se observan las señales por separado indica que el gen se ha partido y, por tanto, reordenado con otro gen. En este caso se observa una imagen de fusión, una señal verde y otra señal roja.

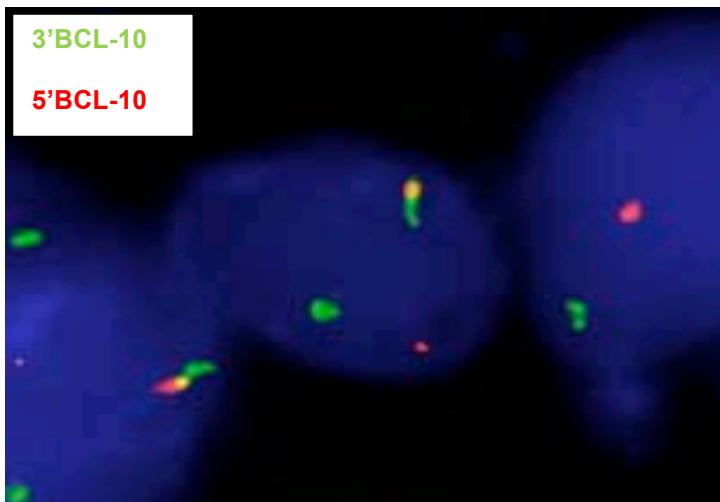


Figura 4.2.5.13.2.2. Caso de linfoma MALT con translocación del gen *BCL10*. Se observa en cada célula una señal verde, una señal roja y una señal amarilla. La señal amarilla en este caso es el patrón de normalidad e indica que las porciones 3' y 5' del gen están juntas, mientras que la señal verde y roja representan el gen de *BCL10* que se halla translocado; en este caso las porciones 3' y 5' se han separado, motivo por el cual no vemos la imagen de fusión en amarillo.

4.2.6. Recogida y análisis de datos

Los resultados obtenidos han sido recogidos en una base de datos en forma de variables cualitativas o cuantitativas y se han correlacionado con los datos clínicos de los pacientes, así

como la respuesta y el seguimiento evolutivo de estos pacientes después del tratamiento. La confidencialidad de los datos clínicos de los pacientes ha sido preservada en todo momento. Los estudios anatomopatológicos se han realizado de forma ciega en relación a los datos clínicos.

El análisis estadístico con respecto a las células T reguladoras ha sido descriptivo, dado que no hay ningún estudio previo sobre ellas en este tipo de linfomas. Además, se ha intentado relacionar la presencia de células T reguladoras con variables clínicas, biológicas y evolutivas.

Los resultados han sido analizados mediante pruebas estadísticas, basadas en técnicas no paramétricas. Éstas incluyen comparaciones cuantitativas (Chi cuadrado) y cualitativas para uno o varios grupos ('U' de Mann-Whitney y/o Kruskal-Wallis). Se han determinado las interrelaciones simples (Spearman) entre los parámetros analizados. La información estadística ha sido recogida en una base de datos diseñada para su posterior transferencia al programa SPSS (versión 15.0) y R (R Development Core Team, R Foundation for Statistical Computing, Viena, Austria, 2008).

5. RESULTADOS

A. Patrón de distribución de células T y B en gastritis crónica, linfoma MALT gástrico y linfoma difuso de células grandes B (LDCGB) gástrico transformado de MALT

Decidimos incluir en el estudio casos de gastritis crónica y de linfomas LDCGB gástricos transformados de MALT, con el objetivo de tener una visión de otras patologías linfoides que pueden observarse en el estómago, y que abarcan desde lesiones reactivas (como son las gastritis crónicas) hasta linfomas agresivos (LDCGB transformado de MALT). En total seleccionamos 12 casos de gastritis crónica (7 asociadas a infección por *H. pylori* y 5 sin evidencia de infección por *H. pylori*) y 7 casos de linfoma difuso de célula B grande transformados de linfoma MALT.

En el momento del diagnóstico, la mediana (rango) de células tumorales CD20+ en pacientes con linfoma MALT gástrico fue de 700 (85-1000) células/mm². Estos resultados fueron diferentes a los observados en pacientes con LDCGB transformados de linfoma MALT (484 (207-760) células/mm²; p=0.041) o en el contexto de gastritis crónica (304 (16-550) células/mm²; p<0.0001). Por otro lado, el número de células CD3+ intratumorales fue de 125 (30-258) células/mm² en casos de linfoma MALT, 66 (9-226) células/mm² en casos de DLBCL y 176 (73-499) células/mm² en los casos de gastritis crónica (tabla 5.A.1).

	Linfoma MALT HP+ (N=17)	Linfoma MALT HP- (N=18)	LDCGB (N=7)	CG HP+ (N=7)	CG HP- (N=5)
CD20+	700(85-1000)	750(174-1000)	484 (207-760)	430 (16-550)	191 (122-534)
FOXP3+	28 (1-110)	27 (1-100)	10 (1-22)	30 (11-97)	15 (1-133)
CD3+	151 (44-243)	109.5 (30-258)	66 (9-226)	243 (73-376)	140 (101-499)
FOXP3/CD3	22.3%(0.8-63%)	19.9%(0.5-53.7%)	14% (4-40%)	12% (6-27%)	11% (1-27%)

Tabla 5.A.1 Cuantificación de células CD20+, CD3+ y FOXP3+, así como el cociente FOXP3/CD3 por diagnóstico. MALT: tejido linfoide asociado a mucosas; DLBCL: linfoma difuso de célula B grande; CG: gastritis crónica; HP: *Helicobacter pylori*.

Además, se estudió la presencia de células FOXP3+ en todas las condiciones anteriormente descritas. No observamos ningún patrón de distribución característico de estas células en relación a las células tumorales. Quizás destacar únicamente que cuando se observaban centros germinales, las células FOXP3+ eran más numerosas dentro de los mismos (se localizaban con mayor medida dentro del centro germinal). La mediana (rango) de células FOXP3+ intratumorales fue superior (27 (1-110) células/mm²) en los casos de linfoma MALT gástrico que en casos de LDCGB (10 (1-22); p=0.162), pero similar a los números observados en los casos de gastritis crónica (20 (1-133); p=0.605). Por último, no se observaron diferencias en la proporción de células FOXP3+ como fracción del total de células CD3+ entre los casos de linfoma MALT, LDCGB y gastritis crónica (p=0.826 and p=0.222, respectivamente).

La mediana de células tumorales CD20+ y células intratumorales FOXP3+ fue similar en todos los casos de linfoma MALT gástrico, con independencia de la presencia o no de la translocación t(11;18). En este particular grupo, en los casos positivos para la translocación t(11;18), la asociación a infección por HP no tuvo efecto en el número de células CD20+, CD3+ y/o FOXP3+ presentes en el infiltrado (p=0.551, p=0.552 y p=0.564, respectivamente). Tampoco observamos diferencias en el número de células FOXP3+, CD3+ y/o de la ratio FOXP3+/CD3+ en función de parámetros clínicos o biológicos, con excepción de que el número medio de células CD3+ fue algo superior en pacientes con estadio I (175 (44-258) células/mm²) que en pacientes con estadios II-IV (103 (30-186) células/mm²)(p=0.021).

B. Evaluación de la respuesta a la terapia

Se analizaron un total de 39 tratamientos de forma que 32 pacientes fueron tratados con una única línea de tratamiento, 5 pacientes recibieron 2 y 1 paciente 3. De esta evaluación, tres pacientes fueron excluidos puesto que no pudo identificarse el tipo de tratamiento recibido en su caso.

Los distintos esquemas de tratamiento quedan resumidos en la tabla 5.B.1. En resumen, 13 casos fueron tratados con terapia erradicadora (antibióticos), 9 pacientes recibieron

quimioterapia sola o en combinación, con o sin rituximab, y 17 pacientes recibieron fludarabina o bendamustina con o sin rituximab.

	N
Número de líneas de tratamiento por paciente	
1	32
2	5
3	1
ND	3
Tipo de tratamiento	
Terapia erradicadora anti-HP	12
Quimioterapia (mono o en combinación) sin rituximab	5
Rituximab solo o CHOP-like con rituximab	4
Fludarabina	8
Fludarabina or bendamustina con Rituximab	9
Interferon/ribavirina	1

Tabla 5.B.1. Número y tipos de tratamientos recibidos por los pacientes con linfoma MALT incluidos en el estudio.

Globalmente, la tasa de respuesta clínica fue del 85%, con un 77% de remisiones completas (CR). El único factor asociado a una peor respuesta a terapia fue una edad superior a 60 años ($p=0.049$). Los pacientes con la translocación $t(11;18)$ no respondieron peor, quizás porque estos pacientes fueron tratados de forma más intensa: todos ellos recibieron inmunquimioterapia con o sin antibióticos de acuerdo a la presencia de infección por *H. pylori*. Únicamente un paciente que no presentaba ninguna de las translocaciones $t(11;18)$ o $t(1;14)$ en las células tumorales, pero en las que sí se observaba expresión nuclear intensa de bcl10, no respondió a 3 líneas de inmunquimioterapia.

En todos los pacientes, el número de células CD20+, CD3+, FOXP3+ y la ratio FOXP3/CD3 no se asociaron a una diferente respuesta al tratamiento. Aún así, cabe destacar que el número de células FOXP3+ sí influyó en la respuesta de los pacientes tratados sólo con antibióticos. Por otro lado, el número medio de células FOXP3+ en los pacientes respondedores fue superior que en los pacientes no respondedores (40 (3-110) células/mm²) vs 3 (1-5) células/mm²; $p=0.048$). De acuerdo con este último resultado, la ratio FOXP3/CD3 fue también superior en los pacientes respondedores (29%(4-64%) vs 2%(1-3%); $p=0.03$).

Por último, las tasas de respuesta histológica y molecular al final del tratamiento fueron del 72% y 56%, respectivamente.

C. Cinética de las células tumorales CD20+ y de las células intratumorales FOXP3+ y CD3+ durante el seguimiento

Globalmente, el número medio de células tumorales CD20+ fue reducido significativamente después del tratamiento, pero como era de esperar, esta reducción fue más pronunciada en los pacientes respondedores de forma significativa ($p < 0.0001$). El tipo de tratamiento tuvo un fuerte impacto en la cinética de estas células CD20+. Los tratamientos con fludarabina o bendamustina con o sin rituximab indujeron una depleción rápida y profunda en el número de células tumorales CD20+ en comparación con los otros tratamientos analizados (figuras 5.C.1 y 5.C.2). En pacientes respondedores tratados con antibióticos, la depleción de células CD20+ fue progresiva durante al menos el primer año, pero llegando finalmente a valores de células CD20+ similares a los observados en los pacientes tratados con fludarabina o bendamustina. La presencia de la translocación t(11;18) o la expresión de bcl10 relacionada o no con la presencia de esta translocación no tuvo ningún impacto en la cinética de las células CD20+.

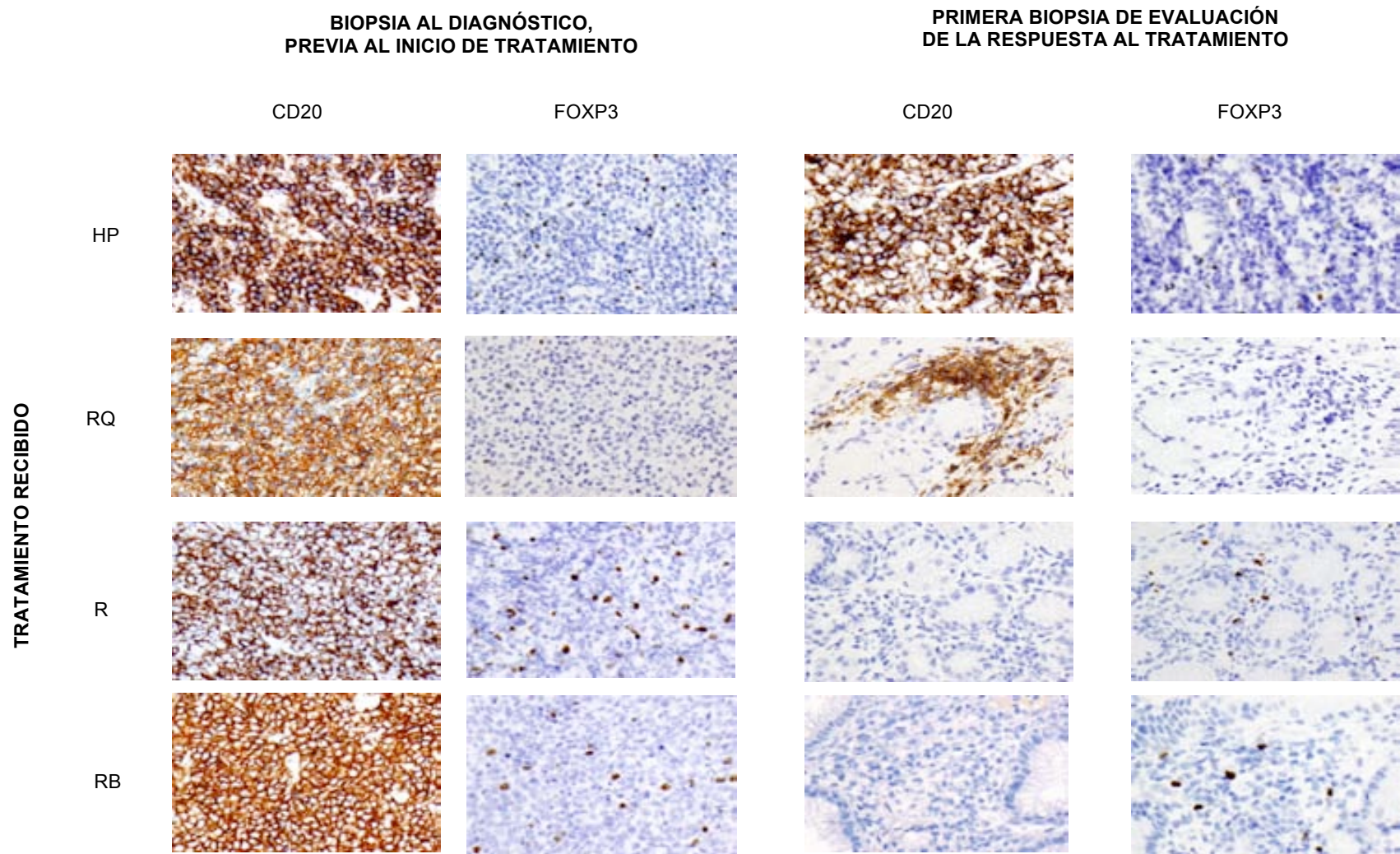


Figura 5.C.1. Estudio inmunohistoquímico para expresión de CD20 y FOXP3, en la biopsia del diagnóstico y en la biopsia correspondiente a la primera evaluación de la respuesta al tratamiento (a 1-2 meses de finalizar el tratamiento), de 4 pacientes que recibieron distintos tipos de tratamiento. HP: sólo terapia erradicadora; RQ: Rituximab+CHOP; RF: Rituximab+Fludarabina; RB: Rituximab+Bendamustina.

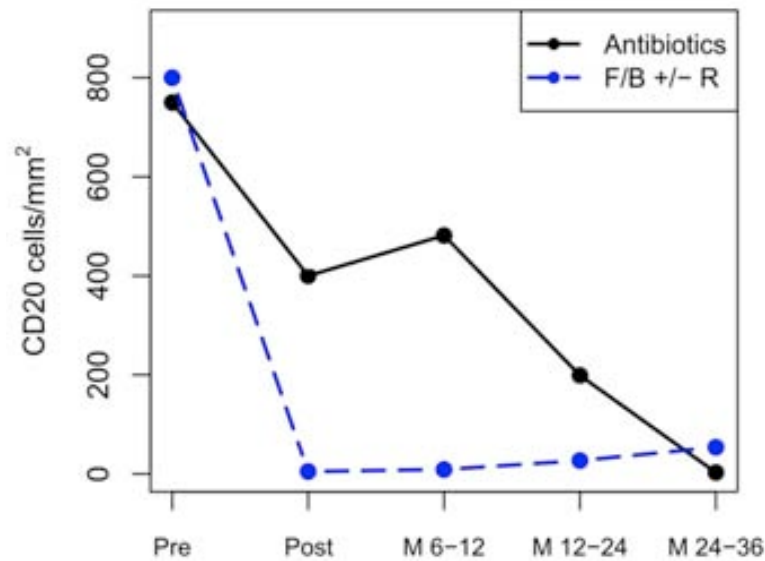


Figura 5.C.2. Cinética de los linfocitos CD20+ en los pacientes respondedores. En la primera evaluación de la respuesta, a los 1-2 meses de finalizar el tratamiento, la mediana de células CD20+ fue significativamente inferior en los casos tratados con fludarabina o con bendamustina con o sin rituximab, en comparación con los pacientes tratados con terapia erradicadora ($p=0.001$). Esta diferencia, por el contrario, no se mantuvo durante el seguimiento posterior.

Al final del tratamiento, el número de células intratumorales FOXP3+ disminuyó desde una media de 31 células/mm² a 15 células/mm² en pacientes respondedores, pero no se observaron cambios en los pacientes no respondedores (Figura 5.C.3). Aunque el descenso del número de células intratumorales FOXP3+ al final del tratamiento fue significativamente superior en los casos tratados con fludarabina o bendamustina que en los casos tratados con antibióticos, el número de células FOXP3+ continuó descendiendo hasta pasado un año en ambos grupos de tratamiento.

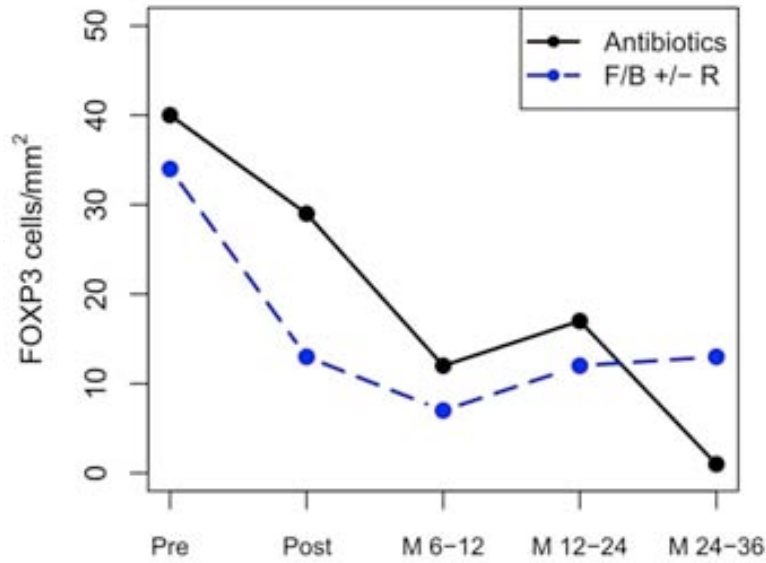


Figura 5.C.3. Cinética de los linfocitos FOXP3+ en los pacientes respondedores.

No se observó una reducción significativa de células CD3+ al final del tratamiento (Figura 5.C.4). Incluso los pacientes tratados con fludarabina o bendamustina con o sin rituximab, el número medio de células CD3+ fue similar antes y después del tratamiento (108 células/mm² vs 96 células/mm², $p=0.831$). Además, la ratio FOXP3/CD3 no se modificó en los distintos grupos al final del tratamiento (Figura 5.C.5).

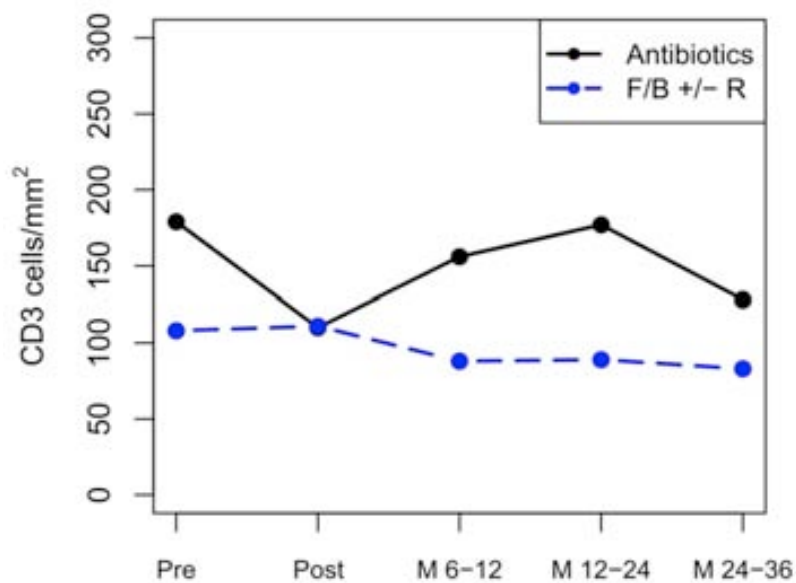


Figura 5.C.4. Cinética de los linfocitos CD3+ en los pacientes respondedores.

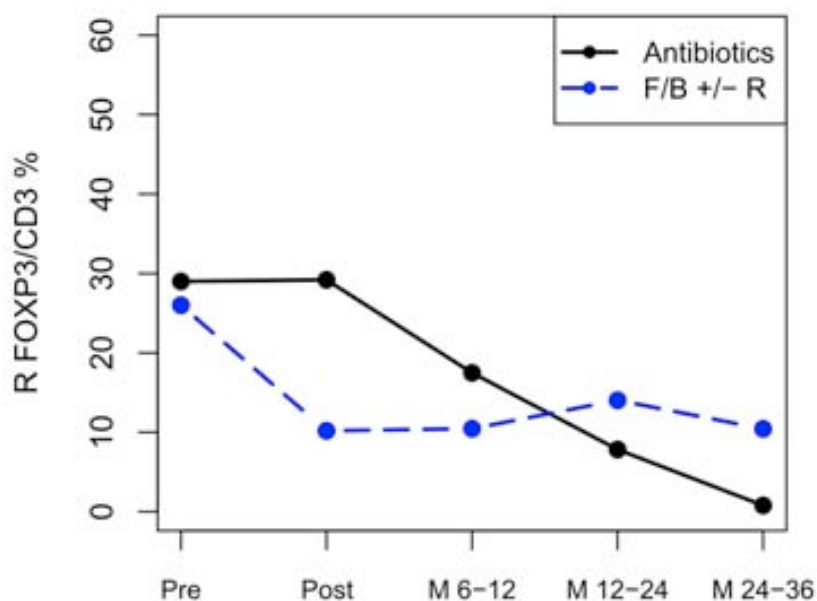


Figura 5.C.5. Cinética de la ratio FOXP3+/CD3+ en los pacientes respondedores.

Después de un periodo medio de seguimiento de 54 meses (rango 1-8 años), todos los pacientes con linfoma MALT gástrico están vivos, pero 4 pacientes han recaído a los 3, 5, 23 y 31 meses. Las muestras de estos cuatro pacientes en el momento de la recaída fueron también estudiadas, sin que pudiéramos observar diferencias en cuanto a la cantidad de células CD20+, CD3+ y/o FOXP3+, en el momento del diagnóstico inicial y en la biopsia de la recaída (Tabla 5.C.1).

	Tratamiento	Tiempo a la recaída*	Nº células al diagnóstico CD20+/CD3+/FOXP3+	Nº células en la recaída CD20+/CD3+/FOXP3+
Paciente 1	HP	3	700/114/28	1110/30/29
Paciente 2	F	5	800/186/100	628/250/210
Paciente 3	HP	23	750/184/67	700/130/37
Paciente 4	QT	31	660/125/1	855/70/10

Tabla 5.C.1. Resultados de los pacientes que recayeron durante el seguimiento. Se muestra la cuantificación en la biopsia del diagnóstico inicial y la biopsia de la recaída. HP: terapia erradicadora; F: Fludarabina; QT: Quimioterapia; *Tiempo a la recaída en meses.

6. DISCUSIÓN

6.1. Caracterización de las células T reguladoras intratumorales en una serie consecutiva de pacientes con linfoma MALT gástrico en el momento del diagnóstico y durante el seguimiento, identificadas mediante técnica inmunohistoquímica de FOXP3+

En los últimos años, el desarrollo de la tecnología de arrays de expresión génica para el estudio de los procesos linfoproliferativos ha permitido identificar la presencia de firmas de genes correspondientes a células inmunes no tumorales, que tienen una asociación directa en la progresión y supervivencia de estas enfermedades. Estas células forman parte del denominado microambiente en el que proliferan las células linfoides neoplásicas, y algunas de ellas, como por ejemplo los macrófagos asociados a linfoma (LAM) y las células T reguladoras (FOXP3+), son las que han cobrado más interés. Estos tipos celulares varían en función de los distintos tipos de linfoma y es posible que sean moduladores de la interacción entre las células del linfoma y el huésped^{25,26}. Las células T reguladoras tienen una función en la tolerancia inmune, con efecto supresor de células autoreactivas, previniendo así el desarrollo de enfermedades de tipo autoinmune. De la misma manera, inhiben la respuesta inmune local frente a células tumorales. En estas células, el factor de transcripción FOXP3 es crítico para su desarrollo y función, y se ha utilizado como marcador de este subtipo celular¹⁷⁻¹⁹.

Nuestro trabajo aporta información acerca de la presencia de células T reguladoras (FOXP3+) como integrantes del microambiente en procesos linfoproliferativos. Recientemente, de Boer y colaboradores han valorado la presencia de este tipo celular en linfoma MALT gástrico, en el momento del diagnóstico y seguimiento⁴⁵, haciendo hincapié en el efecto del tratamiento con fludarabina en los distintos subtipos de linfocitos T y en la respuesta del tumor. Beyer y colaboradores⁴⁰ observan un incremento de células FOXP3+ en sangre periférica y sangre medular en pacientes con mieloma múltiple y MGUS, sobretodo a expensas del compartimento periférico, como respuesta a la progresión de la enfermedad. Otros grupos, han estudiado el papel de las células FOXP3+ en otros tipos de procesos linfoproliferativos (linfoma folicular, linfoma difuso de célula B grande, linfoma de Hodgkin,...), en este caso con gran interés en su impacto pronóstico. En estos estudios, los resultados son ampliamente variables, pudiendo tener su presencia un efecto beneficioso o perjudicial según los casos³⁰⁻³⁷. Como ejemplos,

Alvaro y colaboradores³⁶ demostraron la presencia de células FOXP3 como parte del componente reactivo acompañante característico del linfoma de Hodgkin mediante estudio inmunohistoquímico para FOXP3. En este trabajo observaron que la presencia de células TIA1+ y FOXP3+ en el infiltrado se asociaba con una mejor supervivencia. En nuestro trabajo, por la idiosincrasia propia del tipo de linfoma que hemos estudiado, puesto que se trata de un proceso linfoproliferativo con buen pronóstico con buena respuesta a la terapia, no es posible sacar conclusiones acerca del impacto de estas células en el pronóstico.

6.2 Distribución de las células T reguladoras en linfomas MALT gástricos y en otros procesos gástricos, como la gastritis crónica y el linfoma difuso de célula B grande de estómago

Parece ser que no sólo es importante la presencia de las células T reguladoras en linfomas sino también cómo se distribuyen estas células en el tumor³⁸. En el linfoma folicular, su patrón de distribución tiene valor pronóstico negativo³⁹, pero no existe información en la literatura acerca de lo que ocurre en el linfoma MALT gástrico.

En primer lugar, hemos estudiado la presencia de células FOXP3+ intratumorales en biopsias de pacientes con este tipo de linfoma (linfoma MALT gástrico), así como también en otros procesos inflamatorios reactivos o neoplásicos del estómago. Así, hemos incluido casos de gastritis crónica (GC), asociados o no a infección por *Helicobacter pylori* (HP) como ejemplo de lesión precursora del linfoma MALT gástrico, y casos de linfoma difuso de célula B grande (DLBCL), como ejemplo progresión de enfermedad. Las células FOXP3+ se hallan presentes en el linfoma MALT gástrico, y en cantidad más parecida a la que se observa en los casos de GC que en casos de DLBCL. Estos resultados sugieren que la hipótesis formulada por nosotros al inicio del trabajo de que las células T reguladoras pueden tener un papel importante en la patogenia del linfoma MALT gástrico puede ser cierta. Por el contrario, los mecanismos que tienen lugar en la progresión serían diferentes. De hecho, en nuestro estudio hemos observado que el número de células FOXP3+ en DLBCL gástrico desarrollado a partir de un linfoma MALT ha sido 2.7 veces inferior, un número similar al descenso que se observa en el linfoma folicular y el linfoma folicular transformado en dos estudios previos presentes en la literatura^{33,34}.

En esta primera parte del trabajo, también hemos valorado el patrón de distribución de las células FOXP3+ en el linfoma MALT gástrico y en la GC. En ninguna de estas patologías hemos observado un patrón de distribución de estas células específico. Sólo es de destacar que las células FOXP3+ han sido más numerosas dentro de centros germinales cuando éstos han estado presentes, mientras que en los casos en que el infiltrado ha presentado un patrón difuso estas se han distribuido indistintamente entre el mismo. Así pues, en contra de lo observado de forma previa en el linfoma folicular, no hemos podido describir un patrón de distribución arquitectural característico de las células FOXP3 en el linfoma MALT gástrico³⁸. En nuestro estudio nos hemos centrado en las células T reguladoras, pero existen otros subtipos celulares integrantes del microambiente de los linfomas que podrían ser sujetos también en el linfoma MALT gástrico, puesto que han demostrado su importancia en otros tipos de linfomas, como por ejemplo linfocitos T PD1+ o macrófagos CD163+^{43,44}.

6.3. Influencia del microambiente, mediante la cuantificación de células CD3+ y FOXP3+, en la respuesta al tratamiento

También hemos querido investigar el impacto que tiene el número de células FOXP3+ en linfoma MALT gástrico en el momento del diagnóstico para predecir la respuesta al tratamiento. Hemos analizado nuestros datos separando a los pacientes en varios grupos de acuerdo al tratamiento recibido, ya que se ha descrito previamente la influencia del tratamiento en el impacto que tienen las células del microambiente para predecir la evolución en los pacientes con linfoma folicular³⁹. En nuestra serie hemos observado que los pacientes tratados con terapia erradicadora, el número de células FOXP3 puede predecir la respuesta a este tratamiento. Así, hemos los pacientes respondedores tienen mayor número de células FOXP3 intratumorales en el momento del diagnóstico. Sin embargo, esta diferencia de respuesta no la hemos observado en los pacientes tratados con otras terapias más agresivas, ya sea con quimioterapia o inmunquimioterapia. Por otro lado, también hemos observado que el número total de células CD3+ no ha tenido influencia o impacto en la respuesta al tratamiento en ninguno de los grupos de tratamiento, de forma similar a lo observado previamente en linfoma folicular por otros autores. Estos resultados sugieren que las células FOXP3+ juegan un papel más determinante en aquellos casos de linfoma que se hallan en fases más iniciales, cuándo el

crecimiento de las células tumorales es dependiente del estímulo antigénico del *H pylori*, y por tanto, responden a la terapia erradicadora. Es posible en este contexto que estas células T reguladoras puedan modular la respuesta T celular inducida por el propio microorganismo, respuesta también relacionada con el mantenimiento y proliferación de la clona B, y nuestros resultados así lo sugieren. En este sentido, es bien conocido que estas células son capaces de suprimir la actividad de las células T presentadoras de antígenos en el contexto de neoplasias sólidas. De todos modos, el hecho de que este efecto positivo de respuesta de las células FOXP3+ sólo se observe en los pacientes tratados con antibióticos, hace que su determinación de rutina en nuevos casos de linfoma MALT gástrico tenga un impacto limitado en la toma de decisiones previa al inicio de tratamiento, puesto que en la decisión terapéutica intervienen hasta el momento muchos factores o variables clínicas, como la presencia en el tejido de *H pylori* o por ejemplo la existencia de alteraciones citogenéticas que sabemos se relacionan con una falta de respuesta a la terapia erradicadora.

6.4. Evolución de las células B tumorales determinadas mediante tinción de CD20 y de células del microambiente mediante determinación de CD3 y FOXP3 en función de los tratamientos administrados

La última parte del trabajo ha consistido en analizar el impacto del tratamiento en la cinética de las células tumorales (CD20+), y de los linfocitos T (CD3+) y células FOXP3+, mediante estudio inmunohistoquímico. Los pacientes con linfoma MALT incluidos en el estudio han sido tratados de acuerdo a la práctica estándar o bien, en pocos casos, con drogas como fludarabina o bendamustina con o sin rituximab en el contexto de ensayos clínicos^{13,14} La población de pacientes estudiados en esta investigación refleja la población de pacientes con linfoma MALT gástrico diagnosticada en un hospital general, y como tal, tanto los estadios como la presencia de otras variables de interés es amplia. Por este motivo, se podría argumentar que el tratamiento administrado ha sido heterogéneo, pero, en realidad, la variabilidad del tratamiento administrado obedece a que el manejo de estos linfomas ha cambiado significativamente en los últimos años, circunstancia principalmente atribuible a la detección de translocaciones específicas que predicen resistencia a ciertos tratamientos y, por otra parte, a la incorporación en el manejo de estos pacientes de nuevos fármacos como los análogos de las purinas y los

anticuerpos monoclonales anti-CD20. A nuestro entender, la discreta heterogeneidad de la población y la variabilidad del tratamiento administrado no es un punto negativo sino todo lo contrario. De hecho, el disponer de diferentes situaciones a analizar nos ha permitido estudiar la evolución de las células tumorales y del microambiente en varios escenarios, y creemos que en esta circunstancia radica parte del interés de este estudio.

El tratamiento de los linfomas MALT gástricos asociados a la infección por *Helicobacter pylori* está claramente definido y consensuado, y consiste en la erradicación del mismo. Sin embargo, no existen pautas de tratamiento estándar para los pacientes con linfoma gástrico que no responden o progresan con tratamiento erradicador. Clásicamente, la cirugía había jugado un papel importante, pero debido a la considerable morbi-mortalidad asociada intrínsecamente a la cirugía gástrica radical y a la buena evolución con otras estrategias, actualmente tiene un papel muy limitado. La radioterapia consigue un buen control local de la enfermedad, superior en casos con afectación gástrica frente a extragástrica, aunque esta estrategia está limitada a centros con gran experiencia, y además no hay que olvidar que actualmente se conoce que un tercio de los pacientes presentan enfermedad diseminada, si se realizan los procedimientos exploratorios convenientes. En nuestro centro, la estrategia terapéutica actual empleada es más sistémica. En general, el tratamiento sistémico está basado en la utilización de agentes alquilantes como el clorambucilo y la ciclofosfamida. Recientemente, se han añadido al arsenal terapéutico los análogos de las purinas (fludarabina y deoxycitofuridina), y más recientemente los anticuerpos monoclonales anti-CD20, mostrando ambos agentes una buena actividad junto con un excelente perfil de seguridad de rituximab. Además, en nuestro centro, dentro del grupo GELTAMO, se está estudiando la asociación de rituximab con fludarabina o bendamustina en pacientes con linfoma MALT en primera línea. Por los motivos anteriormente especificados, en nuestra investigación hay pacientes tratados con diferentes regímenes de quimioterapia e inmunquimioterapia.

Hemos observado una reducción más pronunciada de células FOXP3+ en tejido de mucosa gástrica en aquellos pacientes respondedores a terapia antierradicadora o a fludarabina o bendamustina, con o sin rituximab, consiguiendo una mayor reducción de estas células a los 6-12 meses de inicio del tratamiento y manteniéndose esta respuesta de forma prolongada durante los siguientes controles de seguimiento. La fludarabina induce la apoptosis de linfocitos

quiescentes y células linfoides malignas de diversos síndromes linfoproliferativos. Una variedad de estudios in vitro postulan los mecanismos subyacentes de esa muerte celular. Si bien las células tumorales de los síndromes linfoproliferativos indolentes pueden encontrarse predominantemente sin dividir, el trifosfato de fludarabina puede ser incorporado al ADN de las células tumorales, posiblemente durante la síntesis de reparación del ADN. La ruptura inducida por el grupo de los análogos nucleósidos conduce a la activación de los genes blanco p53 y de sus dependientes, y se ha sugerido que la inducción de la apoptosis mediada por p53 desempeña un papel central en la destrucción de las células tumorales. Así, la fludarabina induce depleción linfoide, tanto si los linfocitos son normales como malignos. Se ha demostrado que tanto las células T CD4 + y CD8 + disminuyen tras su administración y que alcanzan un nadir de aproximadamente 30% del valor basal a las cuatro semanas después del último tratamiento. Además, mientras las células T memoria (CD4 + CD45RO +) como naïve (CD4 + CD45RA +) disminuyen tras fludarabina, su ratio aumenta, lo que indica una mayor resistencia en el subconjunto de las células T memoria. Además, el grupo de células CD3 + CD25 + disminuye significativamente con el tratamiento con fludarabina, pero no las CD3 + HLA-DR +. Por otra parte, la fludarabina induce una profunda reducción de las células B CD20 +. En nuestro estudio, de forma interesante, la depleción de células FOXP3+ fue más lenta en pacientes tratados con antibióticos que en aquellos casos tratados con análogos de las purinas. Interesantes han sido también las observaciones con respecto a los linfocitos T CD3+. Estas células se han visto poco modificadas cuantitativamente en pacientes respondedores tratados con terapia erradicadora en relación a las muestras pre-tratamiento, con una reducción modesta en tejido gástrico, así como también en pacientes tratados con fludarabina o bendamustina. En este último grupo se trata de una observación poco esperable, puesto que estos pacientes han presentado linfopenias intensas en sangre periférica. Por tal motivo, pensamos que los distintos tipos de tratamiento que se utilizan para tratar este tipo de linfoma influyen de forma distinta en la misma población celular en función de si se hallan en el tejido o bien circulando en sangre periférica. Por último, a través de la cuantificación de las células tumorales CD20+, hemos identificado diferentes patrones de disminución del número de células tumorales CD20+ en función del tratamiento administrado (antibióticos vs quimioterapia). Con ambos tratamientos es posible eliminar totalmente las células tumorales,

pero a distinta velocidad. Así, mientras que en pacientes tratados con quimioterapia esta eliminación se consigue rápidamente y puede documentarse justo después de terminar el tratamiento de quimioterapia o inmunquimioterapia, en los pacientes tratados con terapia erradicadora la cinética de eliminación de la clona tumoral es más lenta y sucede progresivamente durante los meses posteriores a la conclusión del tratamiento. Nuestros resultados muestran que algunas remisiones pueden ocurrir muchos meses después de finalizar el tratamiento están en la línea de las recomendaciones clínicas que valoran la posibilidad de esperar varios meses antes de iniciar otra terapia en pacientes tratados con antibióticos, siempre y cuando no se evidencie una progresión clínica⁴⁵.

7. CONCLUSIONES

1. Las células T reguladoras, identificadas mediante expresión de FOXP3, forman parte del microambiente en linfomas MALT gástricos. No se ha evidenciado la presencia de un patrón de distribución específico ni tampoco una asociación entre el número de estas células con otros parámetros clínico-biológicos.

2. En los linfomas MALT gástricos el número de células FOXP3+ intratumorales es similar al observado en las gastritis crónicas y superior al de los linfomas difusos de célula B grande del estómago. Esta observación sugiere que las células T reguladoras pueden tener un papel importante en la patogenia del linfoma MALT gástrico.

3. La presencia de un mayor número de células FOXP3+ intratumorales en el diagnóstico se asocia a una mayor tasa de respuesta al tratamiento erradicador en el linfoma MALT gástrico. Sin embargo, el número de células T reguladoras no tiene impacto en la respuesta cuando el tratamiento es inmuno-quimioterapia.

4. La cinética de las células FOXP3+ intratumorales y de los linfocitos tumorales CD20+ depende en gran medida del tratamiento administrado. Los tratamientos con fludarabina o bendamustina con o sin rituximab inducen una depleción rápida y profunda de estas dos poblaciones celulares en comparación con otros tratamientos. Sin embargo, a medio plazo, el número de células CD20+ y FOXP3+ es similar en todos los pacientes respondedores independientemente del tratamiento recibido.

8. BIBLIOGRAFIA

1. Isaacson P, Wright DH. Malignant lymphoma of mucosa-associated lymphoid tissue. A distinctive type of B-cell lymphoma. *Cancer*. 1983;52:1410-1416.
2. Harris NL, Jaffe ES, Stein H. A revised European-American classification of lymphoid neoplasm: a proposal from the International Lymphoma Study Group. *Blood*. 1994;84(5):1361-1392.
3. Jaffe ES, Harris NL, Stein H, Vardiman JW: *Pathology and Genetics of tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues*. Lyon, France: IARC Press; 2001.
4. Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, Jaffe ES, Pileri SA, Stein H, Thiele J, Vardiman JW. *WHO classification of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues*. Lyon, France: IARC Press; 2008:214-217.
5. Cavalli F, Isaacson PG, Gascoyne RD, *et al*. MALT lymphomas. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2001:241-58.
6. Thieblemont C, Berger F, Dumontet, *et al*. Mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma is a disseminated disease in one third of 158 patients analyzed. *Blood*. 2000 Feb 1;95(3):802-6.
7. Thieblemont C, Bastion Y, Berger F, *et al*. Mucosa-associated lymphoid tissue gastrointestinal and nongastrointestinal lymphoma behavior: analysis of 108 patients. *J Clin Oncol*. 1997 Apr;15(4):1624-30.
8. Raderer M, Vorbeck F, Formanek M, *et al*. Importance of extensive staging in patients with mucosa-associated lymphoid tissue (MALT)-type lymphoma. *Br J Cancer*. 2000 Aug;83(4):454-
9. Musshoff K. Clinical staging classification of non-Hodgkin's lymphomas. *Strahlentherapie*. 1977 Apr;153(4):218-21.
10. Palazzo L, Roseau G, Ruskone-Fourmestreaux, *et al*. Endoscopic ultrasonography in the local staging of primary gastric lymphoma. *AEndoscopy*. 1993 Oct;25(8):502-8.
11. Rohatiner A, d'Amore F, Coiffier B, *et al*. Report on a workshop convened to discuss the pathological and staging classifications of gastrointestinal tract lymphoma. *Ann Oncol*. 1994 May;5(5):397-400.
12. Dierlamm J, Baens M, Wlodarska I, *et al*. The apoptosis inhibitor gene API2 and a novel 18q gene, MLT, are recurrently rearranged in the t(11;18)(q21;q21) associated with mucosa-associated lymphoid tissue lymphomas. *Blood*. 1999 Jun 1;93(11):3601-9.

13. Salar A, Bellosillo B, Serrano S, *et al.* Persistent residual disease in t(11;18)(q21;q21) positive gastric mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma treated with chemotherapy or rituximab. *J Clin Oncol.* 2005;23:7361-2.
14. Santón A, García-Cosío M, Bellosillo B, *et al.* Persistent monoclonality after histological remission in gastric mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma treated with chemotherapy and/or surgery: influence of t(11;18)(q21;q21). *Leuk Lymphoma.* 2008;49:1516-22.
15. Isaacson PG, Du MQ. MALT lymphoma: from morphology to molecules. *Nat Rev Cancer.* 2004 Aug;4(8):644-53.
16. Roitt IM. *Essential immunology.* Blackwell Science, 9th edition.
17. Sakaguchi S, Yamaguchi T, Nomura T, *et al.* Regulatory T cells and immune tolerance. *Cell.* 2008;133:775-87.
18. Jiang H and Chess L. Regulation of immune responses by T cells. *The new England journal of medicine.* 2006;354:1166-76.
19. Hori S, Nomura T, Sakaguchi S. Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. *Science.* 2003;299:1057-61.
20. Beyer M and Schultze JL. Regulatory T cells in cancer. *Blood.* 2006;108:804-11.
21. Curiel TJ, Coukos G, Zou L, *et al.* Specific recruitment of regulatory T cells in ovarian carcinoma fosters immune privilege and predicts reduced survival. *Nat Med.* 2004 Sep;10(9):942-9.
22. Ahmadzadeh M, Felipe-Silva A, Heemskerk B, *et al.* FOXP3 expression accurately defines the population of intratumoral regulatory T cells that selectively accumulate in metastatic melanoma lesions. *Blood.* 2008. Dec 15;112(13):4953-60.
23. Cesana GC, DeRaffele G, Cohen S, *et al.* Characterization of CD4+CD25+ regulatory T cells in patients treated with high-dose interleukin-2 for metastatic melanoma or renal cell carcinoma. *J Clin Oncol.* 2006 Mar 1;24(7):1169-77.
24. Lenz G, Wright G, Dave SS, *et al.* Stromal gene signatures in large-B-cell lymphomas. *N. Engl. J. Med.* 2008; 359: 2313-23.
25. Dave SS, Wright G, Tan B, *et al.* Prediction of survival in follicular lymphoma based on molecular features of tumor-infiltrating immune cells. *N. Engl. J. Med.* 2004; 351; 2159-69.

26. Yang ZZ, Novak A, Ziesmer SC, *et al.* CD70+ non-Hodgkin lymphoma B cells induce FOXP3 expression and regulatory function in intratumoral CD4+CD25- T cells. *Blood*. 2007;110:2537-44.
27. Mittal S, Marshall NA, Duncan L, *et al.* Local and systemic induction of CD4+CD25+ regulatory T-cell population by non-Hodgkin lymphoma. *Blood*. 2008;111:5359-70.
28. Roncador G, Brown PJ, Maestre L, *et al.* Analysis of FOXP3 protein expression in human CD4+CD25+ regulatory T cells at the single-cell level. *Eur J Immunol*. 2005 Jun;35(6):1681-91.
29. Dave SS, Wright G, Tan B, *et al.* Prediction of survival in follicular lymphoma based on molecular features of tumor-infiltrating immune cells. *N Engl J Med*. 2004;351:2159-69.
30. Glas AM, Knoop L, Delahaye L, *et al.* Gene-expression and immunohistochemical study of specific T-cell subsets and accessory cell types in the transformation and prognosis of follicular lymphoma. *J Clin Oncol*. 2007;25:390-8.
31. Lee AM, Clear AJ, Calaminici M, *et al.* Number of CD4+ cells and location of forkhead box protein P3-positive cells in diagnostic follicular lymphoma tissue microarrays correlates with outcome. *J Clin Oncol*. 2006;24:5052-9.
32. Alvaro T, Lejeune M, Salvadó MT, *et al.* Immunohistochemical patterns of reactive microenvironment are associated with clinicobiologic behavior in follicular lymphoma patients. *J Clin Oncol*. 2006;24:5350-7.
33. Carreras J, Lopez-Guillermo A, Fox BC, *et al.* High numbers of tumor-infiltrating FOXP3-positive regulatory T cells are associated with improved overall survival in follicular lymphoma. *Blood*. 2006;108:2957-64.
34. Tzankov A, Meier C, Hirschmann P, *et al.* Correlation of high numbers of intratumoral FOXP3+ regulatory T cells with improved survival in germinal center-like diffuse large B-cell lymphoma, follicular lymphoma and classical Hodgkin's lymphoma. *Haematologica*. 2008;93:193-200.
35. Kim WY, Jeon, YK, Kim TM, *et al.* Increased quantity of tumor-infiltrating FOXP3-positive regulatory T cells is an independent predictor for improved clinical outcome in extranodal NK/T-cell lymphoma. *Annals of Oncology*. 2009;20:1688-96.

36. Alvaro T, Lejeune M, Salvado MT, *et al.* Outcome in Hodgkin's lymphoma can be predicted from the presence of accompanying cytotoxic and regulatory T cells. *Clin Cancer Res.* 2005;11:1467-73.
37. Gjerdrum LM, Woetmann A, Odum N, *et al.* FOXP3+ regulatory T cells in cutaneous T-cell lymphomas: association with disease stage and survival. *Leukemia.* 2007;21:2512-18.
38. Farinha P, Al-Tourah A, Gill K, *et al.* The architectural pattern of FOXP3-positive T cells in follicular lymphoma is an independent predictor of survival and histologic transformation. *Blood.* 2010;115:289-95.
39. De Jong D, Koster Ad, Hagenbeek A, *et al.* Impact of the tumor microenvironment on prognosis in follicular lymphoma is dependent on specific treatment protocols. *Haematologica.* 2009;94:70-7.
40. Beyer M, Kochanek M, Giese T, *et al.* In vivo peripheral expansion of naive CD4+CD25high FoxP3+ regulatory T cells in patients with multiple myeloma. *Blood.* 2006 May 15;107(10):3940-9.
41. Roncador G, Garcia JF, Maestre L, *et al.* FOXP3, a selective marker for a subset of adult T-cell leukaemia/lymphoma. *Leukemia.* 2005 Dec;19(12):2247-53.
42. Craig VJ, Cogliatti SB, Arnold I, *et al.* B-cell receptor signaling and CD40 ligand-independent T cell help cooperate in Helicobacter-induced MALT lymphomagenesis. *Leukemia.* 2010;24:1186-96.
43. Takahashi H, Tomita N, Sakata S, Tsuyama N, Hashimoto C, *et al.* Prognostic significance of programmed cell death-1-positive cells in follicular lymphoma patients may alter in the rituximab era. *Eur J Haematol.* 2013 Jan 19.
44. Hartmann S, Jakobus C, Rengstl B, Döring C, Newrzela S, *et al.* Spindle-shaped CD163+ rosetting macrophages replace CD4+ T-cells in HIV-related classical Hodgkin lymphoma. *Mod Pathol.* 2013 Jan 11.
45. Jäger G, Neumeister P, Brezinschek R, Hinterleitner T, Fiebiger WJ, *et al.* Treatment of extranodal marginal zone B-cell lymphoma of mucosa-associated lymphoid tissue type with cladribine: a phase II study. *Clin Oncol.* 2002 Sep 15;20(18):3872-7.

Study of Regulatory T-Cells in Patients with Gastric Malt Lymphoma: Influence on Treatment Response and Outcome

Mar García^{1,4*}, Beatriz Bellosillo^{1,4}, Blanca Sánchez-González^{2,4}, Francesc Garcia-Payarols^{2,4}, Agustín Seoane^{3,4}, Ana María Ferrer^{1,4}, Eva Gimeno^{2,4}, Luis Eugenio Barranco^{3,4}, Ariadna Torner^{1,4}, Francesc Solé^{1,4}, Carles Besses^{2,4}, Sergi Serrano^{1,4,5}, Antonio Salar^{2,4,5}

1 Departments of Pathology, Hospital del Mar, Barcelona, Spain, **2** Department of Hematology, Hospital del Mar, Barcelona, Spain, **3** Department of Gastroenterology, Hospital del Mar, Barcelona, Spain, **4** IMIM (Hospital del Mar Medical Research Institute), Barcelona, Spain

Abstract

Purpose: FOXP3+ regulatory T cells (Treg) play an essential role in modulating host responses to tumors and infections. The role of these cells in the pathogenesis of MALT lymphomas remains unknown. The aims of the study were to quantify the number of infiltrating FOXP3+ and CD3+ cells in patients with gastric MALT lymphoma at diagnosis and to study kinetics of these cells and CD20+ tumor cells after treatment and during long-term follow-up.

Methods: FOXP3+, CD3+ and CD20+ cells were analyzed by immunohistochemistry and the number of cells was quantified using a micrometric ocular. Samples of 35 patients with gastric MALT lymphoma at diagnosis and after treatment were included. Diagnostic samples were compared to 19 cases of chronic gastritis and diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL) of the stomach.

Results: The median number of FOXP3+ infiltrating cells was higher (27 cells/cm²) in gastric MALT patients than in DLBCL (10 cells; $p=0.162$) but similar to chronic gastritis (20 cells; $p=0.605$). No characteristic or specific distribution pattern of infiltrating FOXP3+ cells was found. Gastric MALT lymphoma patients responding to bacterial eradication therapy had higher number of FOXP3+ cells at study entry. Kinetics of both infiltrating FOXP3+ cells and tumor CD20+ cells were strongly dependent on the treatment administered.

Discussion: Gastric MALT lymphomas have a number of Treg cells more similar to chronic gastritis than to DLBCL. Patients with higher number of tumor infiltrating FOXP3+ cells at study entry seem to have better response to antibiotics. Kinetics of Treg and tumor cells are influenced by type of treatment.

Citation: García M, Bellosillo B, Sánchez-González B, Garcia-Payarols F, Seoane A, et al. (2012) Study of Regulatory T-Cells in Patients with Gastric Malt Lymphoma: Influence on Treatment Response and Outcome. PLoS ONE 7(12): e51681. doi:10.1371/journal.pone.0051681

Editor: Alfonso Navarro, University of Barcelona, Spain

Received: August 17, 2012; **Accepted:** November 5, 2012; **Published:** December 19, 2012

Copyright: © 2012 García et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: This work received grant support from Instituto de Salud Carlos III, Spanish Ministry of Science and Technology grant (FIS-FEDER 07/0586). The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

* E-mail: 94972@parcdosalutmar.cat

These authors contributed equally to this work.

Introduction

Gastric mucosa-associated lymphoid tissue (MALT) lymphoma is an indolent B-cell neoplasm associated with *H. pylori* infection in over 70–80% of cases. It has been demonstrated that continued proliferation of gastric MALT lymphoma cells depends on the presence of T-cells specifically activated by *H. pylori* antigens [1]. The induction of remissions with antibiotics to eradicate *H. pylori* illustrates how important this pathogenic mechanism is. However, the acquisition of some translocations confers resistance to antibiotics in some patients and, as a result, these cases are usually treated with alkylating agents, purine analogs, and recently, rituximab.

Multiple T-cells have been shown to be important for immune homeostasis, being regulatory T cells (Treg) a subset of critical

importance. Currently, the most widely used and reliable Treg marker is the forkhead box transcription factor Foxp3, which is expressed specifically in CD4+ Tregs and which is essential for their lineage identity and suppressive function [2–4]. In patients with cancer, Treg cells have been reported to have influence on outcome and this may be due, at least in part, through the ability of these cells to suppress antitumor immune response either through TCR activation, cell-to-cell contact, or by producing TGF-beta [5]. Moreover, intratumoral FOXP3+ T cells have been shown to migrate or be induced in response to chemokines produced by malignant B cells in some lymphomas [6,7]. Furthermore, Tregs can also induce activated macrophages, the so-called M2 type which are associated with protumoral immunity [8]. Recent evidence suggests that not only is the quantity of tumor-infiltrating Treg cells important for outcome in some types

Table 2. Number and types of treatments followed by the patients included in the study.

	N
Number of treatment lines by patient	
1	32
2	5
3	1
ND	3
Type of treatment	
Eradication therapy anti-HP	12
Single or combined chemotherapy without rituximab	5
Rituximab alone or CHOP-like with rituximab	4
Fludarabine	8
Fludarabine or bendamustine with rituximab	9
Interferon/ribavirin	1

ND, not done.

doi:10.1371/journal.pone.0051681.t002

FISH with the commercially available break-apart BCL10 DNA probe (Dako, Glostrup, Denmark).

Immunoglobulin gene rearrangements were analyzed as previously described [25]. In brief, deoxyribonucleic acid was obtained from paraffin-embedded tissue blocks using the QIAamp Tissue Kit (QIAGEN GmbH, Hilden, Germany). For heavy immunoglobulin chain (IgH) gene analysis, DNA was amplified by PCR using consensus primers specific for framework (FR)1, FR2, FR3 following in both analysis the BIOMED-2 protocol. One of the primers was fluorescent dye-labeled and analysis of the amplified products was performed by capillary electrophoresis in an automated DNA sequencer (ABIPrism 3100, Applied Biosystem, Foster City, CA). Duplicate PCR amplifications were performed.

Statistical Analysis

The main characteristics at study entry and during follow-up, including immunohistochemistry parameters, were recorded and analyzed for prognostic significance. Statistical comparisons were made using the Mann-Whitney U test or Fisher's exact test for nonparametric values, or the chi-square test, as appropriate. P values of less than 0.05 for two-sided tests were considered statistically significant. Curves of FOXP3, CD3 and CD20 evolution were constructed using base package of R. The statistical software packages SPSS (version 15.0) and R (R Development Core Team, R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria, 2008) were used.

Results

Distribution pattern of B and T cells in chronic gastritis, gastric MALT lymphoma and DLBCL of the stomach

In addition to gastric MALT lymphoma cases, we analyzed 12 patients with chronic gastritis according to Wotherspoon criteria [24] (7 associated to *H. pylori* infection and 5 without evidence of *H. pylori* infection) and 7 patients with gastric diffuse large B-cell lymphomas transformed from MALT, in order to set the immunohistochemical findings in different lymphoid conditions of the stomach.

At diagnosis, the median (range) number of CD20+ cells in patients with gastric MALT lymphoma was 700 (85–1000) cells/

mm². These figures were different to those observed in patients with DLBCL transformed from MALT (484 (207–760) cells/mm²; $p=0.041$) or chronic gastritis (304 (16–550) cells/mm²; $p<0.0001$). The number of infiltrating CD3+ cells was 125 (30–258) cells/mm² in MALT, 66 (9–226) cells/mm² in DLBCL and 176 (73–499) cells/mm² in chronic gastritis (table 3). FOXP3+ cells could be assessed in all gastric MALT lymphoma cases. We were not able to find any characteristic or specific distribution pattern of FOXP3+ infiltrating cells. When germinal centers were present, FOXP3+ cells were more numerous within them, whereas no specific pattern of infiltration could be observed when the infiltrate was uniform. The median (range) number of FOXP3+ infiltrating cells was higher (27 (1–110) cells/mm²) in gastric MALT patients than in DLBCL (10 (1–22); $p=0.162$) but similar to chronic gastritis (20 (1–133); $p=0.605$). The proportion of FOXP3+ as a fraction of all CD3+ cells was not different between MALT lymphoma and DLBCL or chronic gastritis ($p=0.826$ and $p=0.222$, respectively).

The median number of CD20+ tumor cells and FOXP3+ infiltrating cells was similar among gastric MALT lymphomas with or without t(11;18). In this group, HP status did not have influence in the number of CD20+, CD3+ and FOXP3+ infiltrating cells ($p=0.551$; $p=0.552$; $p=0.564$). We did not observe differences in the number of FOXP3+, CD3+ or ratio FOXP3+/CD3+ according to clinical or biologic parameters in MALT (data not shown) with the exception that the median number of CD3+ cells was higher in patients with stage I (175 (44–258) cells/mm²) than with stage II–IV (103 (30–186) cells/mm²) ($p=0.021$).

Response to therapy

Thirty-nine treatments were analyzed: 32 patients received 1 treatment, 5 patients received 2 and 1 patient 3. Type of treatment was not available in three patients.

Treatment regimens are shown in Table 2. In summary, 13 cases were treated with anti-infectious therapy alone, 9 with single or combined agent chemotherapy with or without rituximab and 17 with fludarabine or bendamustine with or without rituximab.

Overall response rate was 85% (77% complete remission (CR)). Age older than 60 years was the only factor associated with a worse response to therapy ($p=0.049$). Patients carrying t(11;18) did not respond worse since all of them did receive immunochemotherapy with or without antibiotics according to their *H. pylori* status. Only one patient with strong nuclear expression of bcl10 without t(11;18) or t(1;14) did not respond to 3 lines of immunochemotherapy. In the whole group, the number of cells CD20+, CD3+, FOXP3+ and FOXP3/CD3 ratio was not associated with different response to treatment. However, interestingly, the number of FOXP3+ cells did influence response in those patients treated with anti-infectious therapy alone. The median number of FOXP3+ cells in responding patients was higher than in non responders (40 (3–110) cells/mm²) vs 3 (1–5) cells/mm²; $p=0.048$). In addition, the ratio of FOXP3/CD3 was higher in responders (29% (4–64%) vs 2% (1–3%); $p=0.03$).

Histologic and molecular overall remissions at the end of therapy were 72% and 56%, respectively.

Kinetics of CD20+ tumor cells and infiltrating FOXP3+ and CD3+ cells

Overall, the median number of CD20+ cells was significantly reduced after treatment but, as expected, CD20+ depletion was deeper in responding patients ($p<0.0001$). Treatment type had a strong impact on CD20 kinetics. Fludarabine or bendamustine with or without rituximab induced a quick and profound depletion in the number of CD20+ tumor cells in comparison with the other

Table 3. Immunohistochemistry by gastric condition (cells/mm²).

	MALT lymphoma HP+ (N = 17)	MALT lymphoma HP- (N = 18)	DLBCL (N = 7)	CG HP+ (N = 7)	CG HP- (N = 5)
CD20+	700(85–1000)	750(174–1000)	484 (207–760)	430 (16–550)	191 (122–534)
FOXP3+	28 (1–110)	27 (1–100)	10 (1–22)	30 (11–97)	15 (1–133)
CD3+	151 (44–243)	109.5 (30–258)	66 (9–226)	243 (73–376)	140 (101–499)
Ratio FOXP3/CD3	22.3%(0.8–63%)	19.9%(0.51–53.76%)	14% (4–40%)	12% (6–27%)	11% (1–27%)

MALT: mucosa-associated lymphoid tissue; DLBCL: diffuse large B-cell lymphoma; CG: chronic gastritis; HP: *Helicobacter pylori*.
doi:10.1371/journal.pone.0051681.t003

treatments (figure 1 and 2). In responding patients treated with anti-infective therapy, CD20 depletion was progressive and at least for more than 1 year, reaching similar values than those achieved with fludarabine or bendamustine. t(11;18) or bcl10 status did not have impact in CD20 kinetics.

At the end of treatment, FOXP3+ infiltrating cells decreased from a median of 31 cells/cm² to 15 cells/cm² in responding patients, but no changes were seen in non responding cases. Although FOXP3+ cell depletion at the end of treatment was slightly deeper in cases treated with fludarabine or bendamustine than in those treated with antibiotics, FOXP3+ cells continue to falling up to one year in both treatment groups.

No significant reduction of CD3+ cells was observed after treatment. Even in patients treated with fludarabine or bendamustine with or without Rituximab, the median number of

CD3+ cells was similar pre and post therapy (108 cells/mm² vs 96 cells/mm², p = 0,831). Moreover, the ratio of FOXP3/CD3 did not vary after treatment in any group.

After a median follow-up of 54 months (range, 1–8 years), 4 patients have relapsed at 3, 5, 23 and 31 months. Samples at relapse were available in all 4 cases and we could not find any difference in the number of cells (CD20+, CD3+ or FOXP3+) between diagnosis and relapse (table 4). No death related mortality has been observed.

Discussion

Tumor cell microenvironment is now thought to play a relevant role in the biology of B-cell lymphomas. It has been shown that lymphoma-infiltrating FOXP3+ cells vary between different lymphoma types and these cells may represent important

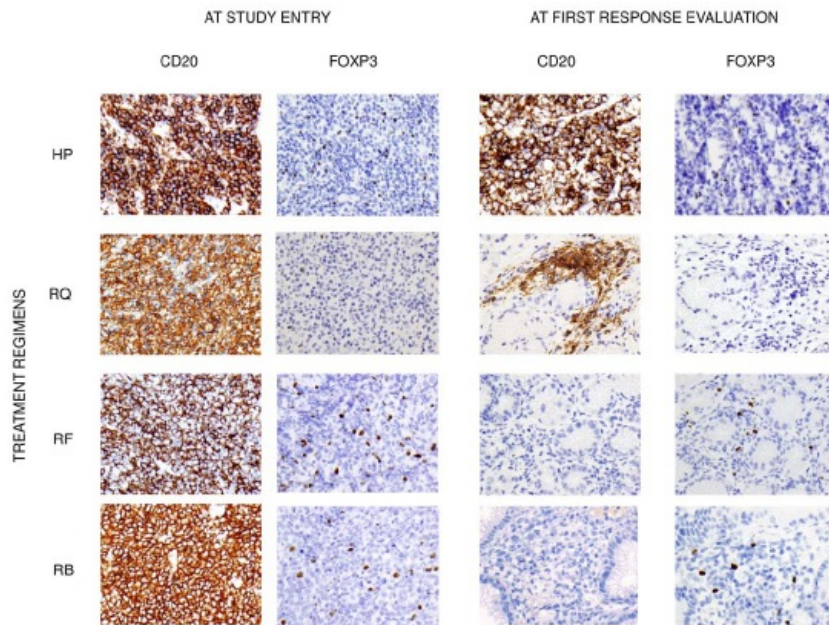


Figure 1. Immunohistochemistry for CD20 and FOXP3 at study entry and at first response evaluation (1–2 months after finishing treatment). Gastric biopsies samples from 4 gastric MALT lymphoma patients treated with different schedules. HP: eradication therapy alone; RQ: Rituximab+CHOP; RF: Rituximab+Fludarabine; RB: Rituximab+Bendamustine.
doi:10.1371/journal.pone.0051681.g001

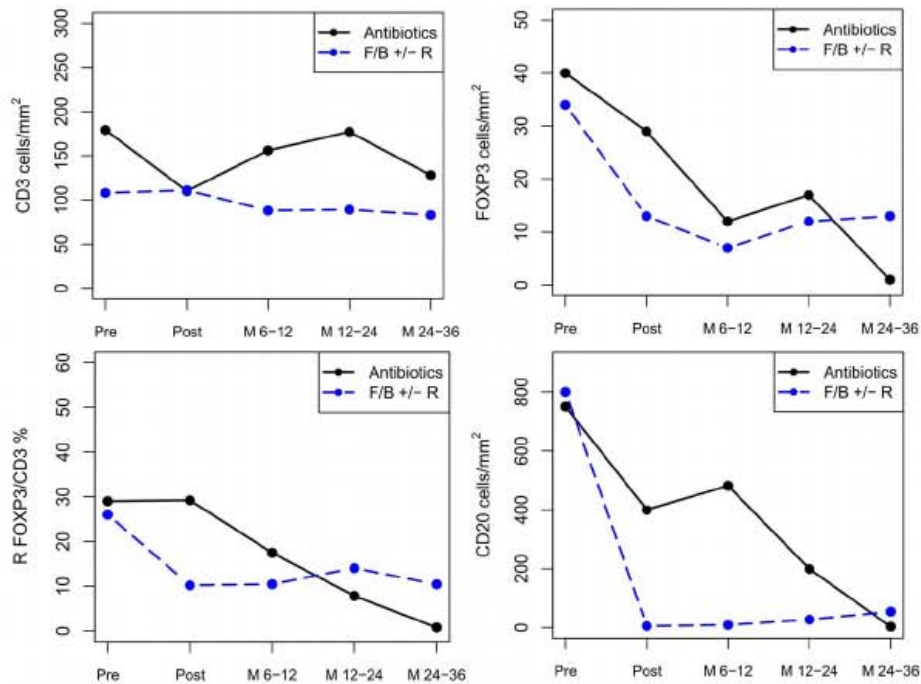


Figure 2. Kinetics of CD3+, FOXP3+, ratio FOXP3+/CD3+ and CD20+ cells by immunohistochemistry in responding patients. Median CD20+ cells were significantly different between cases treated with antibiotics and those treated with fludarabine or bendamustine with or without Rituximab at first response evaluation ($p = 0.001$) but not later during follow-up.
doi:10.1371/journal.pone.0051681.g002

lymphoma/host microenvironment-modulators [26,27]. Our study provides further information on tumor-infiltrating FOXP3+ cells in lymphomas and other gastric conditions, in particular in gastric MALT lymphoma with special emphasis in response after therapy and in long term follow-up.

We first evaluated tumor-infiltrating FOXP3+ cells in gastric MALT lymphomas and, to study them in the context of other lymphoid conditions of the stomach, we analyzed samples with chronic gastritis, as precursor lesions preceding gastric MALT lymphomas, and gastric diffuse large B-cell lymphoma, as late event lesions resulting from progression of gastric MALT lymphoma. Interestingly, the number of FOXP3+ infiltrating cells

in gastric MALT lymphoma was more like chronic gastritis than transformed lymphomas. Our findings suggest the hypothesis that immune homeostasis in gastric MALT lymphoma is more similar to chronic gastritis but different to the regulatory mechanisms which take over the events leading to progression. In fact, the lower number of FOXP3+ cells in gastric DLBCL evolving from MALT observed by us was 2.7 fold, a figure that is similar to the decreased fold observed in FL and transformed FL in two previous studies [14,15].

We next investigated the distribution pattern of FOXP3+ cells in lymphoma and chronic gastritis samples. In both settings, T reg cells were more numerous within germinal centers, when they

Table 4. Data of relapsed patients both at diagnosis and at relapse.

	Treatment	Time to relapse*	At diagnosis	At relapse
			CD20+/CD3+/FOXP3+	CD20+/CD3+/FOXP3+
Patient 1	HP	3	700/114/28	1110/30/29
Patient 2	F	5	800/186/100	628/250/210
Patient 3	HP	23	750/184/67	700/130/37
Patient 4	Chemo	31	660/125/1	855/70/10

HP: eradication therapy; F: Fludarabine; Chemo: Chemotherapy.

*Time to relapse in months.

doi:10.1371/journal.pone.0051681.t004

were present, but we could not find a specific distribution of Treg infiltration when the lymphoid infiltrate was diffuse. Therefore, in contrast to previous observations in follicular lymphoma, no characteristic architectural pattern of FOXP3+ cells was found in gastric MALT lymphoma [9].

We further investigated the value of FOXP3+ infiltrating cells at diagnosis to predict treatment response. We analyzed our data splitting them up into several treatment groups because previous studies in FL have shown that specific therapeutic regimens decisively influenced the prognostic impact of the microenvironment [19]. Our results showed that gastric MALT lymphoma patients responding to eradication therapy had higher number of FOXP3+ cells. However, in our patients treated with chemotherapy or immunochemotherapy, we were not able to detect influence in the response rate according to the number of FOXP3+ cells at diagnosis. We also observed in our study that the total number of CD3+ cells did not have impact in the response in any therapeutic group, similar to that seen in FL. Our results suggest that Treg cells have stronger impact in treatments that are not directly targeted against the tumor cells. This is probably due to the role of Tregs in modulating tumor growth through different mechanisms. It is well-known that these cells are able to suppress the activity of antigen-presenting T-cells. Our findings showing that the number of Treg cells has a positive influence in the response to antibiotic therapy raise the possibility of a suppressive influence of these Tregs on the T-cell population responsible of tumor growth maintenance through the presentation of *H. pylori* antigens.

We also analyzed the impact of treatment on the kinetics of FOXP3+, CD3+ and CD20+ cells determined by immunohistochemistry in gastric tissue. Our MALT lymphoma patients were treated according to current standard practice but some of our cases were treated with drugs such as fludarabine or bendamustine, with or without rituximab, in the context of clinical trials [28–29]. We observed a deep depletion of FOXP3+ cells at gastric tissue in patients responding to eradication therapy and to fludarabine or bendamustine, with or without rituximab, achieving its lowest values at months 6–12 and maintaining at the same magnitude during follow-up. Interestingly, depletion of T reg cells was slightly slower in patients treated with antibiotics than in those

cases treated with purine analog structure drugs. In a recent published study in a similar population, an increase in density of FOXP3+ cells after treatment with oral fludarabine until a CR was documented [30]. With regard to CD3+ cells, we observed a modest reduction of these cells at gastric tissue after treatment with eradication therapy in responding cases. However, unexpectedly, the number of CD3+ cells at the gastric tissue was not reduced at after treatment with fludarabine or bendamustine, even though these patients had intense lymphocytopenia in the peripheral blood (data not shown). Similar results were observed by de Boer et al [30]. Therefore, these observations highlights the fact that different type treatments influence T cells at peripheral blood and at gastric tissue in a very different way.

Through the quantification of CD20+ tumor cells, we have observed a remarkable different pattern in the kinetics of these cells depending on whether the administered treatment was antibiotics or chemotherapy. Both treatments achieved a profound elimination of tumor cells, but whereas in patients treated with chemotherapy this is achieved immediately after treatment, in patients treated with antibiotics occurred much more slowly over several months. Our findings show that some remissions can occur several months after finishing therapy and are in line with the clinical recommendation to wait several months in patients treated with antibiotics before starting a new therapy, unless a clinical relapse occurs [31].

In summary, our results show that gastric MALT lymphoma patients with high number of tumor infiltrating FOXP3+ cells have better response to eradication therapy. Kinetics of both infiltrating FOXP3+ cells and tumor CD20+ cells were strongly dependent on the treatment administered, showing different patterns between cases treated with antibiotics and those treated with immunochemotherapy.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: MG SS A. Salar. Performed the experiments: MG. Analyzed the data: FG-P. Contributed reagents/materials/analysis tools: BB. Wrote the paper: MG SS A. Salar. Included patients to the study; BS-G EG CB. Did the endoscopy and took the tissue samples: LEB A. Seoane. Conducted immunohistochemical, immunophenotypic and FISH studies: AT AF FS. Conducted molecular studies: BB.

References

- Cavalli F, Isaacson PG, Gascoyne RD, Zucca E (2001) MALT lymphomas. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*; 241–50.
- Hori S, Nomura T, Sakaguchi S (2003) Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. *Science* 299:1057–61.
- Sakaguchi S, Yamaguchi T, Nomura T, Ono M (2008) Regulatory T cells and immune tolerance. *Cell* 133:775–87.
- Jiang H, Chess L (2006) Regulation of immune responses by T cells. *The New England journal of medicine* 354:1666–76.
- Beyer M, Schultze JL (2006) Regulatory T cells in cancer. *Blood* 108:304–11.
- Yang ZZ, Novak A, Ziesmer SC, Witzig TE, Ansell SM (2007) CD70+ non-Hodgkin lymphoma B cells induce FOXP3 expression and regulatory function in intratumoral CD4+CD25+ T cells. *Blood* 110:2537–44.
- Mital S, Marshall NA, Duncan L, Culligan DJ, Barker RN, et al. (2008) Local and systemic induction of CD4+CD25+ regulatory T-cell population by non-Hodgkin lymphoma. *Blood* 111:5359–70.
- Tiemessen MM, Jagger AL, Evans HG, van Herwijnen MJ, John S, et al. (2007) CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T cells induce alternative activation of human monocytes/macrophages. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104:19446–51.
- Farinha P, Al'Furrah A, Gill K, Klasa R, Connors JM, et al. (2010) The architectural pattern of FOXP3-positive T cells in follicular lymphoma is an independent predictor of survival and histologic transformation. *Blood* 115:289–95.
- Dave SS, Wright G, Tan B, Rosenwald A, Gascoyne RD, et al. (2006) Prediction of survival in follicular lymphoma based on molecular features of tumor-infiltrating immune cells. *N Engl J Med* 351:2159–69.
- Glas AM, Knoops L, Delahaye L, Kersten MJ, Kibbelaar RE, et al. (2007) Gene-expression and immunohistochemical study of specific T-cell subsets and accessory cell types in the transformation and prognosis of follicular lymphoma. *J Clin Oncol* 25:390–8.
- Lee AM, Clear AJ, Calaminici M, Davies AJ, Jordan S, et al. (2006) Number of CD4+ cells and location of forkhead box protein 3-positive cells in diagnostic follicular lymphoma tissue microarrays correlates with outcome. *J Clin Oncol* 24:5052–9.
- Ahavo T, Lejeune M, Salvadó MT, Lopez C, Jaén J, et al. (2006) Immunohistochemical patterns of reactive microenvironment are associated with clinicobiologic behavior in follicular lymphoma patients. *J Clin Oncol* 24:5350–7.
- Cameras J, Lopez-Guillermo A, Fox BC, Colomo I, Martínez A, et al. (2006) High numbers of tumor-infiltrating FOXP3-positive regulatory T cells are associated with improved overall survival in follicular lymphoma. *Blood* 108:2957–64.
- Tzankov A, Meier C, Hirschmann P, Went P, Pileri SA, et al. (2008) Correlation of high numbers of intratumoral FOXP3+ regulatory T cells with improved survival in germinal center-like diffuse large B-cell lymphoma, follicular lymphoma and classical Hodgkin's lymphoma. *Haematologica* 93:193–200.
- Kim WY, Jeon YK, Kim TM, Kim JE, Kim YA, et al. (2009) Increased quantity of tumor-infiltrating FOXP3-positive regulatory T cells is an independent predictor for improved clinical outcome in extranodal NK/T-cell lymphoma. *Annals of Oncology* 20:1688–96.
- Ahavo T, Lejeune M, Salvadó MT, Bosch R, García JF, et al. (2005) Outcome in Hodgkin's lymphoma can be predicted from the presence of accompanying cytotoxic and regulatory T cells. *Clin Cancer Res* 11:1467–73.
- Gjerdrum LM, Woenmann A, Odum N, Hother C, Henrik-Nielsen R, et al. (2007) FOXP3+ regulatory T cells in cutaneous T-cell lymphoma: association with disease stage and survival. *Leukemia* 21:2512–18.

19. De Jong D, Koster Ad, Hagenbeek A, Raemaekers J, Veldhuizen D, et al. (2009) Impact of the tumor microenvironment on prognosis in follicular lymphoma is dependent on specific treatment protocols. *Haematologica* 94:70–7.
20. Craig VJ, Cogliatti SB, Arnold I, Gerke C, Balandat JE, et al. (2010) B-cell receptor signaling and CD40 ligand-independent T cell help cooperate in Helicobacter-induced MALT lymphomagenesis. *Leukemia* 24:1186–96.
21. Isaacson PG, Chott A, Nakamura S, Müller-Hemerling HK, Harris NL, et al. Extranodal marginal zone lymphoma of mucosa-associated lymphoid tissue (MALT lymphoma). In: Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, Jaffe ES, Pileri SA, Stein H et al., eds. *World Health Organization Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues*. IARC Press: Lyon. 2008:214–17.
22. Rohatiner A, d'Amore F, Coiffier B, Crowther D, Gospodarowicz M, et al. (1994) Report on a workshop convened to discuss the pathological and staging classifications of gastrointestinal tract lymphoma. *Ann Oncol* 5:397–400.
23. Cheson BD, Horning SJ, Coiffier B, Shipp MA, Fisher RI, et al. (1999) Report of an international workshop to standardize response criteria for non-Hodgkin's lymphomas. NCI sponsored International Working Group. *J Clin Oncol* 17:1244–53.
24. Copie-Bergman C, Gaulard P, Lavergne-Slove A, Brousse N, Flejou JF, et al. (2003) Proposal for a new histological grading system for post-treatment evaluation of gastric MALT lymphoma. *Gut* 52:1656.
25. Salar A, Bellosillo B, Serrano S, Beses C (2005) Persistent residual disease in t(11;18)(q21;q21) positive gastric mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma treated with chemotherapy or rituximab. *J Clin Oncol* 23:7361–2.
26. Lenz G, Wright G, Dave SS, Xiao W, Powell J, et al. (2008) Stromal gene signatures in large B-cell lymphomas. *N. Engl. J Med* 359: 2313–23.
27. Dave SS, Wright G, Tan B, Rosenwald A, Gascoyne RD, et al. (2004) Prediction of survival in follicular lymphoma based on molecular features of tumor-infiltrating immune cells. *N. Engl. J Med* 351: 2159–69.
28. Salar A, Domingo-Domenech E, Estany C, Canales MA, Gallardo F, et al. (2009) Combination therapy with rituximab and intravenous or oral fludarabine in the first-line, systemic treatment of patients with extranodal marginal zone B-cell lymphoma of the mucosa-associated lymphoid tissue type. *Cancer* 115:5210–7.
29. Santón A, García-Cosío M, Bellosillo B, Rodríguez P, Cristóbal E, et al. (2008) Persistent monoclonality after histological remission in gastric mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma treated with chemotherapy and/or surgery: influence of t(11;18)(q21;q21). *Leuk Lymphoma* 49:1516–22.
30. de Boer JP, Raderer M, van Tinteren H, Aleman BM, Boot H, et al. (2011) Treatment of extranodal marginal zone lymphoma of mucosa-associated lymphoid tissue with fludarabine: effect on tumor microenvironment. *Leuk Lymphoma* 52(12):2262–9.
31. Ruskone-Fourmestraux A, Fischbach W, Aleman BMP, Boot H, et al. (2011) EGHLS consensus report: Gastric extranodal marginal zone B-cell lymphoma of MALT. *Gut* 60:747–58.