

11201
43



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MÉXICO**

HOSPITAL DE ESPECIALIDADES
"DR. BERNARDO SEPÚLVEDA G."
CENTRO MEDICO NACIONAL SIGLO XXI
DEPARTAMENTO DE ANATOMIA PATOLÓGICA

IDENTIFICACIÓN DE LA t(11:18) MEDIANTE HIBRIDACION
IN SITU FLUORESCENTE EN NUCLEOS EN INTERFASE EN
BIOPSIAS DE GLANDULA SALIVAL MENOR CON Y SIN
LESION LINFOEPITELIAL DE PACIENTES
CON SÍNDROME DE SJÖGREN PRIMARIO.

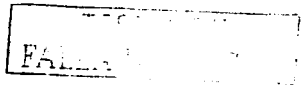
T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
ESPECIALISTA EN ANATOMIA PATOLOGICA

PRESENTA
DRA. BRICIA ARACELI DEL ROSARIO TAMAYO

ASESORES
DR. ENRIQUE BLANCO LEMUS
DR. CARLOS RIEBELING NAVARRO



MEXICO, D.F. 2003





Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

DELEGACION SUROESTE
CENTRO MEDICO NACIONAL SIGLO XXI
HOSPITAL DE ESPECIALIDADES
3 1 MAR 2003
H/ ESPECIALIDADES

Dr. Antonio Castellanos Olivares
Jefe de División de Educación Médica e Investigación
"Centro Médico Nacional Siglo XXI"
Hospital de Especialidades
"Dr. Bernardo Sepúlveda G"

Dra. Ma. de Lourdes Cabrera Muñoz
Jefe del Servicio de Anatomía Patológica
Centro Médico Nacional Siglo XXI
Hospital de Especialidades
"Dr. Bernardo Sepúlveda G"

DELEGACION SUROESTE
CENTRO MEDICO NACIONAL SIGLO XXI
HOSPITAL DE ESPECIALIDADES
3 1 MAR 2003
H/ ESPECIALIDADES

Dr. Enrique Bianco Lemus
Médico Adscrito al Servicio de Anatomía Patológica
Centro Médico Nacional Siglo XXI
Hospital de Especialidades
"Dr. Bernardo Sepúlveda G"

DEDICATORIAS

Con todo mi amor y agradecimiento eterno a mis padres.

Con admiración, gratitud y respeto al Dr. Enrique Blanco Lemus.

A mis maestros del Hospital de Especialidades.

TESIS CON
FALLA DE CALIFICACION

ENCLOSURE

INTRODUCCION:

El Síndrome de Sjogren (SS) es una enfermedad autoinmune caracterizada por una infiltración linfocitaria de las glándulas salivales y lagrimales. Clínicamente se manifiesta por sequedad ocular (queratoconjuntivitis seca) y bucal (xerostomía) El 90% de los pacientes son mujeres entre los 35 y 45 años¹

Se denomina Síndrome de Sjogren primario (SSP) cuando se presenta en forma aislada. y Síndrome de Sjogren secundario (SSS) cuando se asocia a otras enfermedades autoinmunes, como la artritis reumatoide^{1,2}

El infiltrado linfocitario presente en las glándulas salivales y lagrimales está formado fundamentalmente por células T colaboradoras CD4+ y células B entre ellas células plasmáticas que secretan localmente anticuerpos. Aproximadamente el 75% de los pacientes tienen Factor Reumatoide positivo, exista o no artritis reumatoide asociada. El 50-80% tienen anticuerpos antinucleares (ANA) y otros anticuerpos tanto específicos como no específicos de órgano. De ellos, los más importantes son los dirigidos contra dos antígenos RNP: SSA (Ro) y SS-B (La) detectables en el 90% de los pacientes. Al igual que otras enfermedades autoinmunitarias, el SS se asocia a determinados alelos HLA. Existe una relación entre la forma primaria y los loci HLA-B8, HLA-DR3 y DRW 52³

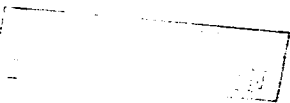
El diagnóstico del SS requiere de correlación histopatológica con hallazgos serológicos, sialográficos, orales y oftalmológicos. Histológicamente el primer hallazgo es la infiltración linfocitaria periductal y perivascular en las glándulas salivales mayores y menores. Posteriormente, esta infiltración se hace masiva y pueden encontrarse folículos linfoides con centros germinales. Se han propuesto un número de criterios para el diagnóstico del SS, y común a todos ellos es el examen histopatológico de las glándulas salivales labiales. La presencia de más de un foco con 50 o más linfocitos en 4 mm² de tejido glandular salival constituye un criterio diagnóstico para el SS. Un gran porcentaje de tejido glandular muestra reemplazo de su parénquima por un infiltrado linfocitario con destrucción y metaplasia de los conductos que incluye la formación de las denominadas islas mioepiteliales. Este conjunto de hallazgos histológicos se le ha nombrado lesión linfoepitelial benigna (LLE) o sialoadenitis mioepitelial (MESA). En el pasado, la presencia de LLE era un criterio de benignidad, sin embargo, hoy en día, estas lesiones son consideradas como parte importante de los linfomas MALT. De esta forma, se ha

reconocido que la LLE es un factor de riesgo para el desarrollo de linfoma de la glándula salival, especialmente cuando se asocia a SS y otras enfermedades del tejido conectivo.^{3,4}

A pesar de que las glándulas salivales mayores son un sitio poco común para el origen de un linfoma, ya que representa solo el 1.7% de las neoplasias malignas asentadas en este órgano. Kassa y cols¹⁴ encontraron que el riesgo de desarrollar linfoma es 44 veces mayor para pacientes con SS comparado con un grupo control durante un lapso de 8 años. Estudios recientes han mostrado que alrededor del 6% de los pacientes con SS desarrollan linfoma, generalmente de localización extraganglionar que incluye glándulas salivales, lagrimales y pulmones.⁵⁻⁷

En un 80-90%, el linfoma que se desarrolla en los pacientes con SS corresponde a linfoma de células B de bajo grado, derivado del tejido linfóide asociado a mucosas (MALT). Generalmente, su curso clínico es indolente, y permanecen localizados por mucho tiempo, sin embargo, algunas veces pueden transformarse en linfomas de células grandes de alto grado que son más agresivos.⁸

Histológicamente, el linfoma tipo MALT presenta una población de células tipo centrocito, que es el componente más constante y distintivo, lesión linfoepitelial y formación de folículos linfoides con centros germinales reactivos.⁹ Sin embargo, morfológicamente es difícil determinar cuando un infiltrado linfóide en la MESA ha progresado a linfoma, por lo que debe hacerse énfasis en métodos de inmunohistoquímica y moleculares para su reconocimiento temprano.^{3,6}





ANTECEDENTES.

El organismo humano contiene grandes cúmulos de tejido linfóide no encapsulado localizado principalmente en mucosas, como el anillo de Waldeyer, el tracto gastrointestinal, el tracto respiratorio y glándulas salivales, lagrimales, páncreas y mama. Este tejido linfóide se denomina tejido linfóide asociado a las mucosas (MALT), y en contraste con el ganglio linfático, carece de capsula y sinusoides "

Se ha determinado que el MALT constituye el mayor compartimiento del sistema inmune, con mas linfocitos presentes que en todas las demas zonas anatomicas combinadas incluyendo ganglios linfáticos. Se estima que la poblacion de células T encontrada en el epitelio intestinal representa cerca del 60% de todas las células T en el organismo.

El sistema MALT tiene características unicas en lo que al tránsito de linfocitos se refiere. Los mecanismos moleculares que coordinan la migracion de células B sensibilizadas desde el MALT hacia los tejidos secretores mas alla del intestino son poco conocidos. Existen evidencias indirectas que sugieren que la diseminacion de las células precursoras sensibilizadas tiene lugar en el anillo de Waldeyer hacia los sitios secretores efectores, incluyendo las glándulas salivales, lagrimales y la mucosa nasal ¹⁰.

En determinadas circunstancias, el MALT puede mostrar una proliferación clonal neoplásica catalogada como linfoma. Estas proliferaciones han sido agrupadas por el Grupo Internacional de Estudio sobre Linfomas en la clasificación revisada Europeo-Americana (REAL) dentro del grupo de linfomas de la zona marginal ¹⁵. El grupo está conformado por tres desórdenes distintos, los linfomas primarios del ganglio linfático, los linfomas primarios del bazo y los linfomas extraganglionares del MALT. A pesar de que estos desórdenes comparten el fenotipo B CD5 positivo y CD10 negativo, existen diferencias morfológicas sutiles y comportamiento clínico distinto entre ellos, lo que sugiere una patogenia diferente ^{11, 12}. Los linfomas de la zona marginal del MALT constituyen el subtipo mas frecuente de linfoma primario extraganglionar, y representan del 5-10% de todos los linfomas no Hodgkin ¹³.

Estos linfomas pueden mostrar afectación multicéntrica extraganglionar, incluyendo el tracto gastrointestinal, pulmon, tiroides, glándula mamaria, glándulas salivales y lagrimales. La mayoría de los linfomas MALT se originan en el entorno de un proceso



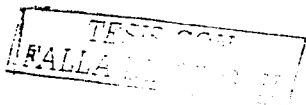
inflamatorio crónico y son desencadenados por una infección o proceso autoinmune. En este sentido, el SS se caracteriza por infiltración linfocitaria y linfoproliferación. Las glándulas salivales y lagrimales son los sitios iniciales de la infiltración por linfocitos B y T, con destrucción posterior glandular. Una de las complicaciones más significativas en los pacientes con SS es el desarrollo de un linfoma. Algunos reportes señalan que el riesgo de linfoma en estos pacientes es 44 veces mayor que el de la población general y se ha sugerido que la terapia inmunosupresora podría asociarse con incremento en el riesgo de hasta 100 veces¹⁴. Se han propuesto varios criterios para el diagnóstico de un linfoma en el contexto de la LLE o MESA, sin embargo, es difícil reconocer cambios linfomatosos tempranos en bases exclusivamente morfológicas.

La utilización de técnicas moleculares en los linfomas MALT indica la presencia de rearrreglos en los genes de las inmunoglobulinas y por lo tanto poblaciones clonales de células B en la fase de lesión linfoepitelial¹⁵. De forma interesante, los rearrreglos en las cadenas ligeras son predominantemente del tipo kappa y no lambda, y desde hace más de 20 años se observó que los linfomas de pacientes con SS por lo general muestran restricción de cadenas kappa más que de lambda¹⁶. Recientemente ha surgido evidencia con respecto a que el suero de pacientes con síndrome de Sjogren a menudo tiene factores reumatoide (FR) y que los linfomas relacionados con frecuencia utilizan la misma región VκIIIb-FR asociada a la leucemia linfocítica crónica. En este sentido, Martin *et al* demostraron que las inmunoglobulinas producidas por las células B neoplásicas fueron factores reumatoide en dos pacientes. Estos datos de genética molecular sugieren que el SS puede ser un modelo útil para el estudio de la progresión neoplásica. La lesión linfoepitelial temprana posee una expansión clonal de un tipo distintivo de células B. Estas clones podrían ser sujetas a proliferación continua dando oportunidad a que ocurran alteraciones genéticas que se relacionan a la alta incidencia de linfoma en el SS^{14, 15}.

Actualmente, los mecanismos genéticos que originan la aparición de un linfoma tipo MALT han sido objeto de numerosos estudios. La t(11;18) es la anomalía estructural caracterizada en este tipo de neoplasias, particularmente en aquellos de localización extraganglionar, por lo que su expresión en tejido de GSM en pacientes con SSP podría constituir un marcador molecular temprano de la progresión a un linfoma^{20, 21}.

Por otro lado, la capacidad para controlar el orden de los eventos ocurridos en el ciclo celular es importante para el mantenimiento de la estabilidad genómica y prevenir mutaciones que pueden alterar el control del crecimiento normal. El gen p53 está localizado en el cromosoma 17 y su función es la regulación del proceso de proliferación celular. Su activación está asociada con la patogenia de enfermedades autoinmunes como artritis reumatoide en humanos y SS en ratones.

Hoy en día, se sabe que las mutaciones del p53 constituyen la alteración genética más común observada en las neoplasias malignas. Se han publicado estudios en donde se reporta una sobre-expresión de p53 en pacientes con Síndrome de Sjogren y se han detectado mutaciones del gen en pacientes con SS y linfoma no Hodgkin, por lo que estos hallazgos sugieren un posible papel del p53 en la patogénesis tanto del SS como del linfoma no Hodgkin que desarrollan estos pacientes.²⁷



TESIS CON
FALLA

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA:

Recientemente se ha puesto atención a la relación entre los linfomas MALT de la glándula salival, el SS y las lesiones histopatológicas precursoras como la sialoadenitis mioepitelial y la lesión linfoepitelial. Los linfomas tipo MALT que surgen de este tipo de lesión tisular podrían tener una expresión morfológica sutil. Las células neoplásicas pueden infiltrar de forma aislada o en pequeños grupos y constituir una LLE, la cual frecuentemente es interpretada como parte del componente inflamatorio. Con estos antecedentes, la identificación de la t (11:18) en las biopsias de GSM podría constituir un marcador molecular temprano de la progresión a linfoma en pacientes con SS.

HIPOTESIS:

La presencia de LLE en las biopsias de GSM de pacientes con SSP puede asociarse a la t (11:18)

OBJETIVOS:

- 1.- Determinar la presencia de LLE en biopsias de GSM de pacientes con SSP.
- 2.- Determinar la presencia de la t (11:18) en el tejido de GSM con LLE de pacientes con SSP.
- 3.- Determinar la expresión de p53 en biopsias de GSM de pacientes con SSP y correlacionarla con la presencia o ausencia de LLE.
- 4.- Determinar el inmunofenotipo del infiltrado linfocitario en las biopsias de GSM mediante los anticuerpos anti-CD20 y anti-CD45RO.

MATERIAL Y METODOS:

DISEÑO DEL ESTUDIO

Estudio descriptivo, transversal, observacional y no experimental.

UNIVERSO DE TRABAJO:

El presente estudio se realizó en el HE del CMN Siglo XXI IMSS en el periodo comprendido de marzo del 2002 a febrero del 2003. Los pacientes tuvieron diagnóstico establecido de SSP de acuerdo a los criterios de San Diego (anexo 1).

TECNOLOGIA
FALLA

DESCRIPCION OPERATIVA DE LAS VARIABLES:

SINDROME DE SJOGREN PRIMARIO

Es una enfermedad autoinmune sistémica que se caracteriza por una infiltración de linfocitos y células plasmáticas al tejido glandular, originando diferentes patrones de daño tisular que se manifiesta por xerostomía, xeroftalmia e inflamación de glándulas salivales y lagrimales no asociada a otra enfermedad autoinmune.

LESION LINFOEPITELIAL.

Lesión histologica caracterizada por una infiltración linfocitaria en grupos de 3 o más linfocitos B al epitelio ductal de la glandula salival, con o sin proliferación mioepitelial.

EXPRESION DE p53

Inmunorreactividad nuclear positiva o negativa en GSM, evaluada mediante la tecnica de inmunoperoxidasa utilizando el anticuerpo primario anti-p53 (anexo 4)

DETERMINACION DE LA t (11:18) MEDIANTE LA TECNICA DE *Hibridación In Situ Fluorescente* (FISH).

Presencia o ausencia de colocalización para las sondas marcadas con fluorocromos correspondientes a las secuencias complementarias de los cromosomas 11 y 18 de acuerdo a la metodología referida en el anexo 5.

TAMAÑO DE LA MUESTRA:

24 pacientes.

SELECCIÓN DE LA MUESTRA:

CRITERIOS DE INCLUSIÓN:

- Pacientes con diagnóstico establecido de SSP de acuerdo a los criterios de San Diego (anexo 1) que cuentan con biopsia de GSM.

CRITERIOS DE EXCLUSIÓN:

- Pacientes que reciben tratamiento inmunosupresor.
- Pacientes con seropositividad a antígenos de hepatitis B y/o C.

CRITERIOS DE NO INCLUSIÓN:

- Pacientes con SS secundario
- Pacientes con neoplasias primarias de otro sitio.

TES
FALLA

PROCEDIMIENTOS:

Los pacientes fueron seleccionados para su evaluación a través de la consulta externa del Servicio de Reumatología del HE del CMN Siglo XXI. IMSS. Se realizó historia clínica completa y se aplicaron los criterios de San Diego (anexo 1) para la determinación de un diagnóstico de SSP. Se les invito a participar en el proyecto con aceptación mediante una hoja de consentimiento (anexo 2) Se realizaron los siguientes estudios de laboratorio: biometría hemática completa, química sanguínea, examen general de orina, pruebas de funcionamiento hepático, factor reumatoide, anticuerpos antinucleares, anticuerpos anti-Ro/SSA y anti-La/SSB, crioglobulinas, velocidad de sedimentación globular, proteína C reactiva, anticuerpos anti-VIH, hepatitis B y C.

Se procedió a la evaluación de las biopsias de GSM determinando la densidad del infiltrado inflamatorio por microscopía de luz en cortes teñidos con hematoxilina y eosina mediante la escala de Greenspan (anexo 1) y la presencia o ausencia de lesión linfocitaria. Se determinó la expresión de linfocitos CD20+ y CD45RO+ mediante inmunohistoquímica (anexo 4), la expresión de p53 mediante inmunohistoquímica (anexo 4) y la expresión de la t(11:18) mediante la técnica de FISH en dos casos con LLE y dos sin LLE. En cada preparación se analizaron 100 células en interfase conservadas, de forma individual y que tuvieran señales fluorescentes claramente visibles. Se consideró como criterio de presencia de la t(11:18) cuando se observaron señales colocalizadas o fusionadas una verde limón y otra roja (tono amarillo) (anexo 5).

CONSIDERACIONES ETICAS

El proyecto de investigación se ajustó a las normas éticas internacionales, la Ley General de Salud en materia de investigación en seres humanos y la Declaración de Helsinki.

RECURSOS HUMANOS

Médico adscrito y residente del servicio de Anatomía Patológica y médico adscrito del servicio de Reumatología.

RESULTADOS:

Se estudiaron 24 pacientes con una edad media de 51 años. Hubo un claro predominio del sexo femenino (23 mujeres y 1 hombre) y la duración promedio de la enfermedad fue de 6.4 años.

Las manifestaciones glandulares, extraglandulares, parámetros serológicos e inmunorreactividad para p53 se muestran en la tabla 1.

Los estudios serológicos que se asociaron con la presencia de LLE fueron: factor reumatoide, anticuerpos antinucleares, velocidad de sedimentación globular, anticuerpos anti-Ro, y anti-La, inmunoglobulinas G y A. En todos los casos se observó infiltrado inflamatorio predominantemente linfocitario intersticial, con grados variables de atrofia acinar y afectación ductal (figura 1), con organización sugestiva de folículos linfoides periductales (figura 3) y la presencia de lesión linfoepitelial por linfocitos B (CD20+) en ocho casos (figura 4). La determinación de la expresión de p53 demostró inmunorreactividad predominante en el epitelio ductal y en linfocitos aislados del infiltrado inflamatorio, en el 85% de los casos con lesión linfoepitelial (figura 2)



TEC
FALLA 7

TABLA 1. Manifestaciones clínicas y serológicas de pacientes con SSP en presencia o ausencia de lesión linfoepitelial. Inmuno-reactividad para p53 en biopsias de GSM.

VARIABLES	Con LLE	n=8	Sin LLE	n=16
Sexo (f/m)	8		16	
Xerostomia	8		16	
Xeroftalmia	8		16	
Duración de la enfermedad (mas de 5 años)	2		6	
Crecimiento parotideo	4		7	
Linfadenopatía	2		5	
Involucro articular	3		6	
Vasculitis cutánea	2		5	
Xerodermia	5		15	
Migraña	4		5	
Cardiopatía	0		1	
Sinusitis	3		2	
Nefropatía tubulo-intersticial	0		1	
Biopsia de GSM con Greenspan 3-4	8		15	
AAN positivo	7		6	
FR positivo	5		8	
Ac Anti-Ro positivo	5		8	
Ac Anti-La positivo	3		5	
PCR aumentada	6		13	
VSG aumentada	6		6	
Crioglobulinas	0		1	
Ig G aumentada	4		7	
Ig A aumentada	4		6	
Ig M aumentada	1		3	
Gamopatía monoclonal sérica	1		0	

FALLA



FIG. 1. CORTE HISTOLÓGICO DE UN SEÑOR PADRE DE 60 AÑOS CON SÍNDROME DE SJOGRÉN (TRÁQUEA INFILTRADA) PERDIDA LA C. INTERSTICIAL CON ATROFIA DE LAS UNIDADES ACINARIAS (H&E X200).



FIG. 2. CORTE HISTOLÓGICO QUE MUESTRA LA POSITIVIDAD NUCLEAR PARA P53 EN LOS NÚCLEOS DE LAS CELULAS DEL EPITELIO DUCTAL Y LINFOCITOS AISLADOS DEL COMPONENTE INFLAMATORIO (X200).

FALLA

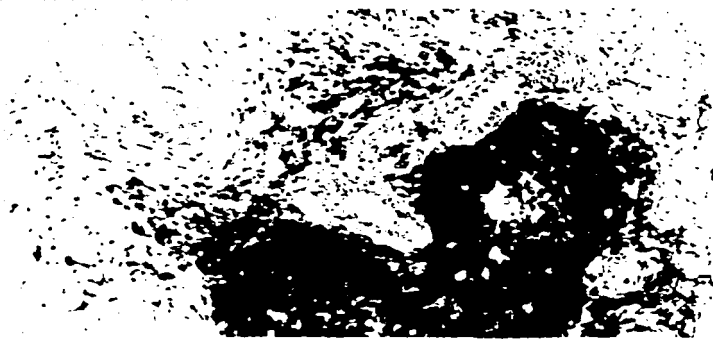


FIG. 3. BROSIA DE GMSI CON SU ESTRUCTURA INTRINSECA POR CILINDROS Y ANILLOS DE S₂ O₂ CON FORMACIONES DE PORCULOS INCLUSOS.

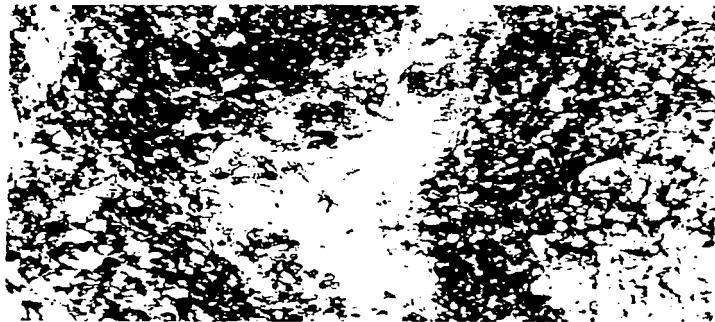
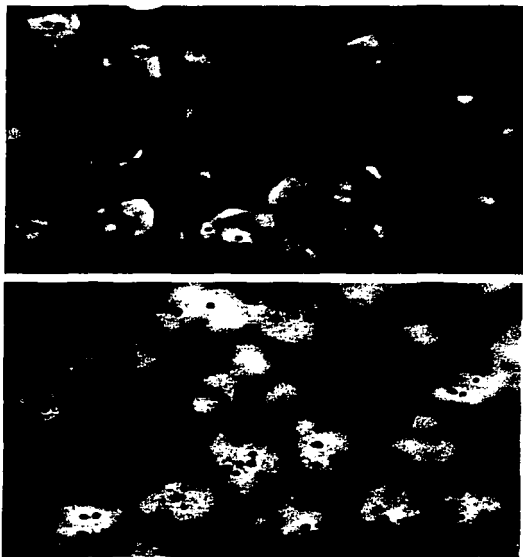


FIG. 4. BROSIA DE GMSI CON EL EFECTO DE UN DÓNDE SE VE EVIDENCIA DE LA INCLUSIÓN Y DAÑO AL EPITELIO DE C₁ S₁.

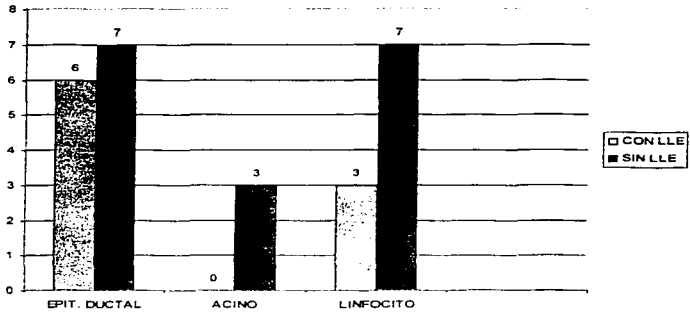
FAL



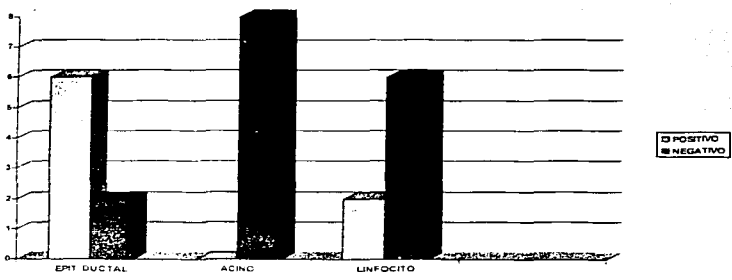
Imágenes de FISH en núcleos en interfase de linfocitos de GSM de pacientes con SSP con lesión linfoepitelial, no se observan señales de colocalización o fusión indicadoras de la t(11;18) (ver figura 3 en el anexo 6 para detalles)

FALLA

INMUNORREACTIVIDAD POSITIVA DE p53 EN BIOPSIAS DE GSM DE PACIENTES CON SSP CON O SIN LLE

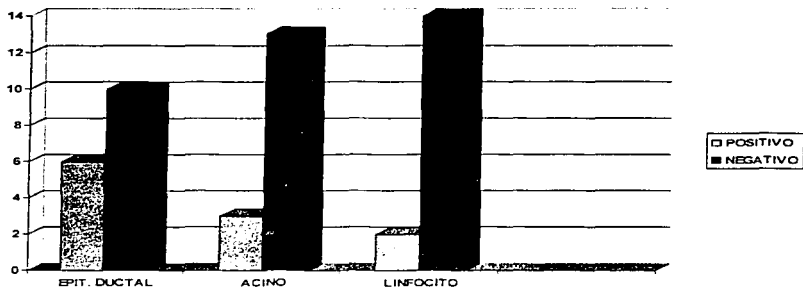


INMUNORREACTIVIDAD DE p53 EN BIOPSIAS DE GSM DE PACIENTES CON SSP CON LLE (N=8)



OF
FALLA

INMUNORREACTIVIDAD DE p53 EN BIOPSIAS DE GSM EN PACIENTES DE SSP SIN LLE (n=16)



CONCLUSIONES:

- 1 - La LLE se presentó en el 33% de las biopsias de GSM de pacientes con SSP.
- 2.- La presencia de LLE se correlacionó con el desarrollo de manifestaciones clínicas extraglandulares.
- 3.- La presencia de positividad a los AAN se correlacionó con la presencia de LLE.
- 4 - Los núcleos de las células del epitelio ductal de la GSM de pacientes con SSP expresan inmunorreactividad para p53 en relación a la presencia de LLE (85%)
- 5.- Los linfocitos que infiltran el epitelio ductal de la GSM en pacientes con SSP mostraron un inmunofenotipo de linfocitos B (CD 20 +, CD 45 RO negativos).
- 6 - Ninguno de los 4 casos estudiados mediante FISH mostró t(11;18)
- 7 - Ninguna de las biopsias de GSM de pacientes con SSP presentó linfoma MALT u otro tipo de linfoma.



COMENTARIOS:

Una característica común a los órganos afectados en el SSP es la infiltración linfocitaria progresiva. Estos infiltrados pueden causar los cambios funcionales y las diversas manifestaciones clínicas de esta enfermedad. La lesión linfocitaria parece representar tanto la proliferación como la infiltración intraglandular por células linfoides y es claro que este es un proceso dinámico. Estos cambios ocurren de forma importante en las glándulas parótidas, sin embargo, las glándulas salivales menores se encuentran igualmente involucradas. Los hallazgos de presencia de LLE en el presente estudio sugieren que los cambios en la GSM pueden ser un reflejo del proceso en las glándulas parótidas, al menos desde el punto de vista histológico. Al respecto, se ha demostrado que una respuesta de expansión clonal mediada por antígenos tiene lugar dentro de las glándulas salivales en estos pacientes, y se ha caracterizado la presencia de rearrreglos en los genes de la inmunoglobulina en las lesiones linfocitarias^{21,24}. Estos hallazgos podrían asociarse con el aumento en la incidencia de linfomas observada en el síndrome de Sjogren.

Hasta hace poco tiempo, el conocimiento de la genética molecular en los linfomas MALT era limitado. En este sentido, la identificación de la t(11 18)(q21,q21) como una lesión genética recurrente en aproximadamente el 50% de los linfomas MALT de bajo grado ha sido un avance importante. Esta translocación está asociada con rearrreglos en el gen API2 en el cromosoma 11 y el gen MALT1 en el cromosoma 18, lo que genera RNA mensajeros que codifican para una proteína de fusión API2-MLT. API2 es un miembro de la familia de proteínas inhibitorias de la apoptosis (IAP) que actúan a través de la inhibición de caspasas, el papel de fisiológico de MLT se desconoce. La función de API2-MLT no es clara, sin embargo, probablemente está relacionada a la apoptosis en vista de la estructura y función de su contraparte normal²⁵. El presente trabajo muestra la ausencia de la t(11.18)(q21,q21) en los casos estudiados. No obstante su número limitado, los hallazgos mostrados para este marcador molecular de linfoma en el tejido de glándula salival han sido negativos en la mayoría de los pacientes en varios estudios^{29,26}. Lo anterior plantea la posibilidad de mecanismos genéticos alternativos en la linfomagenesis. Al respecto, se ha caracterizado a la t(1.14)(p22,q32) como anormalidad cromosómica recurrente, pero infrecuente, en varios linfomas MALT. De forma similar, se han descrito alteraciones alternativas como la trisomía 3 y mutaciones en el gen p53, pero su papel no ha sido determinado en la progresión a linfoma. La determinación de sobreexpresión de p53 en el presente estudio y su correlación con la presencia de lesión

TR
RA

linfopitelial en el 85% de los casos podría ser un indicador indirecto de la participación de otros componentes genéticos. Es importante comentar que la sobreexpresión de p53 en relación al epitelio ductal en estos casos podría reflejar mecanismos de reparación celular mas que la progresión a una neoplasia epitelial. La sobreexpresión de p53 en el tejido linfoide, en relación o no a la presencia de lesión linfopitelial, podría indicar (en el caso de mutaciones) un estado de progresión neoplásica. Ambos aspectos se proponen como pregunta para un estudio posterior

Por otra parte, se ha planteado la posibilidad de que la expresión restringida del repertorio de genes VH de inmunoglobulinas, con preferencia de utilización de segmentos del gen V1-69, sea un mecanismo altamente selectivo de clonas en los linfomas MALT de glándula salival en pacientes con SS, a diferencia de otros linfomas MALT en sitios distintos, además, se ha observado que algunos de los anticuerpos codificados de esta manera pueden tener actividad de factor reumatoide. El repertorio de genes VH altamente restringido y el análisis mutacional indican que las Ig tienen un papel importante en el desarrollo y expansión subsecuente de las clonas asociadas a MESA. Al respecto, se ha propuesto un modelo en el que los linfocitos B con estructuras VH apropiadas son seleccionadas para su expansión mediante la estimulación por Ig de superficie por la unión a un antígeno común. En algún momento probablemente ocurra un evento genético en una de las clonas en expansión y que le confiere una ventaja de crecimiento sobre las otras clonas y es interesante que el desarrollo de clonalidad puede ser facilitado en el entorno de una enfermedad autoinmune. Se ha establecido que no todas las linfoproliferaciones monoclonales se comportan de forma maligna. Por lo tanto, es probable que se requiera de eventos oncogénicos adicionales después de la emergencia de monoclonalidad en la MESA antes de que se adquiera el comportamiento maligno. Al respecto se ha asociado la presencia de mutaciones en el gen p53 con la progresión histológica de algunos linfomas MALT.

A pesar de que el punto exacto del establecimiento de un linfoma MALT no se ha definido con precisión, nuestros datos sugieren que es más probable encontrar clonas no malignas en las lesiones linfopiteliales de aspecto histológico benigno. No obstante, la determinación de estos parámetros en la GSM podría no reflejar la totalidad del proceso que incluye de forma importante a las glándulas parótidas. La búsqueda de marcadores moleculares tempranos en células de parótida obtenidas mediante biopsia por aspiración con aguja delgada podría ayudar en el estudio de esta interrogante.



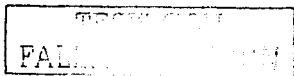
ANEXO 1

CRITERIOS DE SAN DIEGO PARA EL SINDROME DE SJOGREN

- I. Síndrome de Sjogren primario:
 - A. Síntomas y signos objetivos de sequedad ocular.
 1. Prueba de Schirmer menor de 8 mm durante 5 minutos.
 2. Tincion positiva en la prueba de rosa de Bengala o fluoresceina en la córnea o la conjuntiva compatible con queratoconjuntivitis seca.
 - B. Síntomas y signos objetivos de boca seca.
 1. Disminucion del flujo parotideo usando copas de Lashley u otro método.
 2. Biopsia de glandulas salivales anormal (mas de 2 focos inflamatorios en cuatro lobulos evaluables)
 - C. Demostracion de un trastorno autoinmunitario sistémico.
 1. Factor reumatoide elevado ($\geq 1/320$)
 2. Anticuerpos antinucleares a titulo alto ($\geq 1/320$)
 3. Presencia de anticuerpos anti-SS-A (Ro) o anti-SS-B (La).
- II. Síndrome de Sjogren secundario Signos y sintomas característicos del síndrome de Sjogren segun se define en el punto I, mas datos clinicos suficientes para el diagnóstico de artritis reumatoide, lupus eritematoso generalizado, polimiositis, escleroderma o cirrosis biliar
- III. Exclusiones Sarcoidosis, linfoma preexistente, SIDA, y otras causas conocidas de síndrome seco o crecimiento de las glandulas salivales

Fox, Rl. Systemic diseases associated with dry eye. Internacional Ophthalmology Clinics, 1994, 34: 71-87

El síndrome de Sjogren definido requiere de la presencia demostrada de sequedad de la mucosa oral y ocular, y un proceso autoinmunitario sistémico, incluyendo biopsia característica de glandulas salivales menores.



ANEXO 2

CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA LA PARTICIPACIÓN EN PROYECTOS DE INVESTIGACIÓN.

Lugar y fecha _____

Por medio de la presente doy mi autorización para participar en el proyecto de investigación titulado: IDENTIFICACION DE LA t (11-18) MEDIANTE TECNICA DE FISH EN BIOPSIAS DE GLANDULA SALIVAL MENOR CON Y SIN LESION LINFOEPITELIAL DE PACIENTES CON SINDROME DE SJOGREN PRIMARIO

Registrado ante el comite local de Investigacion con el número _____

El objetivo de este estudio es

- 1 - Determinar la presencia de LLE en biopsias de GSM de pacientes con SSP
 - 2 - Determinar la presencia de la t (11 18) en el tejido de GSM de pacientes con SSP
- Se me ha explicado que mi participacion consistira en
- 1 - Toma de 5 cc de sangre para realizacion de estudios sero-inmuniticos
 - 2 - Toma de biopsia de glandula salival como parte de la evaluacion clinica de la enfermedad si no cuenta con ella o si la tomada previamente no es uti!
 - 3.- Asistir a citas de control a la consulta externa de Reumatologia del HE CMN SIGLO XXI

Declaro que se me ha informado que los posibles riesgos inconvenientes molestias y beneficios derivados de mi participacion en el estudio son los siguientes

- 1 - Infeccion en el sitio de venopuncion
- 2 - Infeccion en el sitio de toma de la biopsia de glandula salival menor

El investigador principal se ha comprometido a darme informacion oportuna sobre cualquier procedimiento alternativo adecuado que podria ser benefico para el tratamiento, asi como a responder a cualquier duda que plantee o cualquier otro asunto relacionado con la investigacion o con su tratamiento.

Entiendo que conservo el derecho a retirarme del estudio en cualquier momento en lo que considere conveniente sin que ello afecte la atencion medica que recibo del Instituto. El investigador principal ha dado seguridades de que no se me identificara en las presentaciones o publicaciones que deriven de este estudio y que los datos relacionados con su privacidad seran manejados en forma confidencial. Tambien se ha comprometido a proporcionarme informacion actualizada que obtenga durante el estudio, aunque esta pudiera hacerme cambiar de parecer respecto mi permanencia en el mismo

Nombre y firma del paciente _____

Nombre y firma del investigador(es) _____

Nombre y firma del testigo 1 _____

Nombre y firma del testigo 2 _____



ANEXO 3
ESCALA DE GREENSPAN

GRADO

DESCRIPCION

(Linfocitos y células plasmáticas por mm²)

0	Ausente
1	Infiltrado leve
2	Infiltrado moderado ó menos de un foco por 4 mm ²
3	Un foco por 4 mm ²
4	Más de un foco por 4 mm ²

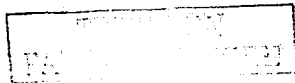
Un foco de células inflamatorias esta constituido por 50 o más linfocitos, células plasmáticas o histiocitos.

Greenspan JS. et al. Oral Surgery 1974; 37:217-229.



ANEXO 4
PROCEDIMIENTO DE INMUNOHISTOQUIMICA

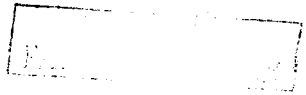
- 1.- Se utilizaron tejidos fijados en formol amortiguados al 10% durante 24-48 h e incluidos en parafina
- 2- Se cortaron en microtomo a 2-6 micrometros
- 3.- Se colocaron en laminillas tratadas con adhesivo (poli-L-lisina o silano); dos cortes de tejido en estudio (uno sirvió como control negativo y uno como problema) y una corte de tejido positivo conocido como control (control positivo-cáncer de mama)
- 4.- Las laminillas con los cortes se metieron al horno a 60 grados C durante 30 minutos.
- 5.- Se desparafinaron e hidrataron de la siguiente forma:
 - Xilol durante 2 minutos (dos veces)
 - Alcohol absoluto durante dos minutos
 - Alcohol al 96% durante 2 minutos (2 veces)
 - Agua comun 3 cambios
 - Agua destilado durante 2 minutos
- 6 - Se enfriaron hasta temperatura ambiente
- 7 - Se lavaron con PBS durante 5 minutos
- 8 - Se bloqueo con peroxidasa endogena con peróxido de hidrógeno al 3% durante 15 minutos a temperatura ambiente
- 9 - Se decantaron
- 10 - Se lavaron con PBS durante 5 minutos
- 11 - Se les adiciono suero Bovino fetal e incubaron a 10 minutos
- 12 - El corte problema y el control positivo se incubaron en cámara húmeda toda la noche a temperatura ambiente con el anticuerpo p53 (IgG2b, kappa, clone DO-7, code No M 7001 Lot 108) diluido a 1 50
- 13 - Se decanto
- 14 - Se lavo con PBS a chorro
- 15 - Se lavo con PBS durante 5 minutos
- 16 - Se adiciono a todos los cortes el segundo anticuerpo (biotilnado) y se incubó a 20 minutos
- 17 - Se lavo con PBS durante 5 minutos.
- 18 - Se les adicionó el complejo enzimático (estreptavidina) y se incubó 20 minutos.



- 19.- Se lavaron con PBS durante 5 minutos.
- 20.- Se les agregó el cromógeno (DAB-diaminobencidina)
- 21.- Se observó al microscopio hasta obtener el control positivo la reacción requerida.
- 22.- Se pusieron en agua destilada
- 23.- Se contrastaron con hematoxilina de Harris hasta obtener el contraste adecuado.
- 24.- Se lavaron con agua común
- 25.- Se viraron con agua amoniacal
- 26.- Se deshidrataron de la siguiente forma:
 - Se pasaron por alcohol al 96% durante 2 minutos (2 veces)
 - Se pasaron por alcohol absoluto durante 2 minutos (2 veces)
 - Se pasaron por xilol durante 2 minutos (2 veces)
- 27.- Se cubrieron con resina y cubreobjetos adecuados.

DETERMINACION DE INMUNOFENOTIPO B ó T MEDIANTE ANTICUERPOS MONOCLONALES ANTI-CD 20 Y ANTI-CD45

- 1.- Se colocaron cortes histológicos de GSM de 5 mm embebidos en parafina sobre portaobjetos silanizados y se procedió a quitar el exceso de parafina en una estufa a 60 oC por 2 horas
- 2.- Se pasaron por 6 baños de xileno por 5 min. Cada uno
- 3.- Se pasaron por tres baños de etanol al 96% y tres al 100% por 2 min cada uno.
- 4.- Inmersión en solución de peróxido de hidrógeno al 3% por 5 min.
- 5.- Se aplicó una solución de albumina sérica bovina y PBS por 1 min para bloquear la tinción de fondo en la laminilla
- 6.- Las laminillas con cortes histológicos se colocaron en cámaras húmedas. Los tejidos fueron incubados con suero supresor no-inmune de caballo anti-ratón a dilución 1:20 en solución de albumina sérica bovina (BSA)/PBS al 2% por 20 min.
- 7.- Se retiró el exceso de suero supresor del tejido cuidando que no se secan y se aplicó el anticuerpo primario (anti-CD20 1:200 o anti-CD45RO 1:150) según el caso diluidos en BSA/PBS y se incubaron a temperatura ambiente por 1 hora.
- 8.- Se procedió a lavar con PBS en tres ocasiones
- 9.- Se procedió a aplicar el anticuerpo secundario biotinilado anti-ratón IgG diluido 1:400 en BSA/PBS al 2% por 30 min. Se lavaron los tejidos con PBS en tres ocasiones.



- 10.- Se incubaron los tejidos con el conjugado de streptavidina-peroxidasa a dilución de 1:800 en BSA/PBS al 0.5% por 30 min a temperatura ambiente
- 11.- Se lavaron las laminillas secuencialmente en PBS al 0.01% en tres ocasiones.
- 12.- Se aplicó la solución de sustrato cromógeno (diaminobenzidina al 0.06% en PBS y peróxido de hidrógeno al 30%) por 2 min
- 13.- Se lavaron los tejidos con agua destilada y se realizó contratinción con hematoxilina modificada de Harris, enjuagando con agua corriente, agua con carbonato de litio y agua corriente.
- 14.- Se procedió a deshidratar en alcohol etílico 96% (dos baños) y alcohol absoluto (dos baños), aclaración con xileno (dos baños), y se montaron con cubreobjetos y resina histológica (Entellan).

REPRODUCCIÓN DE ESTE DOCUMENTO
ESTÁ PERMITIDA SIN GASTO ALGUNO

ANEXO 5

Procedimientos de la técnica de Hibridación in situ fluorescente (FISH).

I. Preparación de los tejidos. Aislamiento de los núcleos en interfase de cortes de tejido de GSM embebidos en parafina.

Reactivos:

- EDTA, 0.5 M.
- Alcohol etílico absoluto.
- Formaldehído al 37%.
- Filtro Nyal HD 55 (70 micras).
- 1X PBS (Fosfato bufer salino).
- Proteínasa K (EM Science, Gibbstown, Cat. 24568).
- Solución de NaCl 0.9%, 5M.
- Tris HCl, pH 7.5
- Xileno.
- Agua esteril

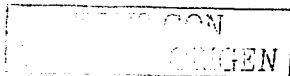
Preparación:

- Proteínasa K
Proteínasa K 0.005 g.
Agua esteril 908 µl.
Tris HCl pH 7.5 50 µl.
0.5 M EDTA 20 µl.
5 M NaCl 2 µl.
- 1% formaldehído/PBS:
Formaldehído 2.7 ml.
1X PBS 97.3 ml.



Procedimiento:

- 1 Se removió el exceso de parafina incubando las laminillas con cortes histológicos de 20 micras a 65°C por 2 h.
- 2 Se transfirieron inmediatamente a un recipiente con xileno a temperatura ambiente en dos cambios de 10 minutos cada uno.
- 3 Se lavaron en etanol al 100%, 86% y 70% por 5 minutos en cada uno.
- 4 Se lavaron en NaCl 0.9% dos veces por dos minutos cada una
- 5 Se transfirieron los cortes a una caja de Petri y se fragmentó el tejido con tijeras.



6. Los fragmentos se transfirieron a un tubo de Eppendorf con solución de proteinasa K y se incubaron por 30 minutos a 37°C.
7. Se filtró la suspensión usando el filtro Nylal y se lavó el filtro con 4 ml de 1X PBS.
8. Centrifugación por 8 minutos a 1000 rpm.
9. Lavado con 2 ml de 1X PBS y centrifugación por 8 min a 1000 rpm.
10. Resuspensión del sedimento con 20 µl de 1X PBS y se colocó la solución en una laminilla histológica silanizada limpia.
11. Se desecó a 37°C y despues a temperatura ambiente toda una noche.
12. Lavado de las laminillas en PBS. Fijación en formaldehido/PBS 1% por 5 minutos y lavado con PBS
13. Se drenó el excedente de liquido y se deshidrató en alcoholes graduales (70, 90, 100%) y se dejó secar al aire.
14. Se aplico la solución de hibridación y se cubrió la laminilla.
15. Desnaturalización a 85°C por 5 minutos e hibridación a 37°C por 16 horas.

II. Marcaje mediante hibridación fluorescente in situ (FISH).

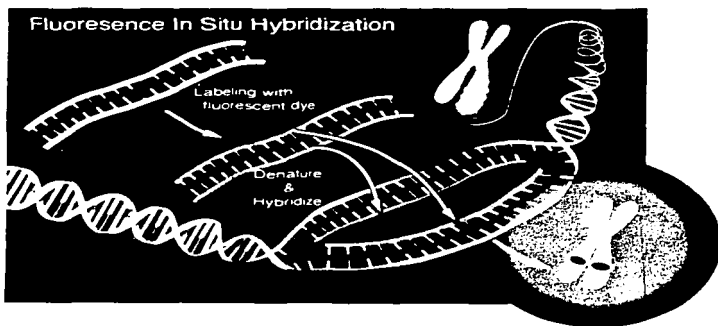
Se realizo marcaje del ADN con biotina-dUTP (cromosoma artificial P1 [CAP] 59N7) y digoxigenina-dUTP (CAP 166G16) (ambos de Roswell Park Memorial Institute Library, NY) por nick translation de acuerdo al metodo descrito por Dierlamm J. et al (Genes Chromosom Cancer 1996, 16 261-264) (DIG-Nick Translation Mix [1745816], Biotin-Nick Translation Mix [1745824], Nick Translation Mix [1745808], dNTP set [1277049], Fluoresceina-12-dUTP [1373242] y tetrametilrodamina-5-dUTP [1534378] de Roche Applied Science) Para cada preparacion se procedió a disolver 80 ng de CAP59N7, 50 ng de CAP 166G16, y 11 µg de Cot-1 ADN en 5µL de mezcla para hibridación y se aplicaron cubreobjetos de 13 mm. se realizaron las observaciones mediante microscopia de fluorescencia

CAP 59N7 contiene secuencias genomicas derivadas contiguas al gen MLT1 Este marcador es translocado al cromosoma 11 (figura 1) La clona CAP 166G16 se extiende aproximadamente 100 kb y contiene tanto el gen API2 como el gen homólogo API1, telomerico con respecto a API2 (7kb) (figura 2).

La disrupcion del gen API2 por la t(11;18) da lugar ya sea a la hibridación para CAP 166G16 con tres señales localizadas en los cromosomas derivados 11 y 18 o, de forma alternativa en el caso de una delección concomitante de las secuencias 11q, a la presencia de dos señales de hibridación, una retenida en el cromosoma derivado 11 y

la otra localizada en el cromosoma 11 normal. En ambos casos, se observan señales de fusión o colocación de ambos CAP en los cromosomas derivados de la t(11;18). En nuestro estudio, se consideró este hecho como indicador de la t(11;18)/fusión API2-MLT (figura 3).

El valor de corte para diagnosticar la t(11;18) fue del 4% de las células en interfase de acuerdo a un control negativo. Las células control positivo utilizadas en este estudio fueron obtenidas de un linfoma MALT de bajo grado gástrico y procesadas de forma simultánea con las células problema.



REPRESENTACION ESQUEMATICA DE LA TECNICA DE FISH

T
FALLA

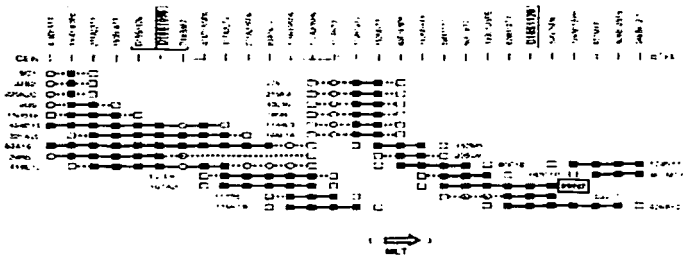


Figura 1. CAP 57N9 se hibridiza teloméricamente al punto de ruptura y es translocado al cromosoma 11 derivado, como resultado de la t(11;18). (Blood 96;2215-2218, 2000)

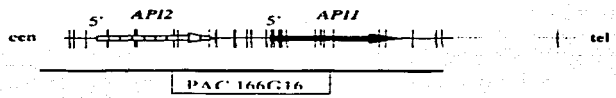
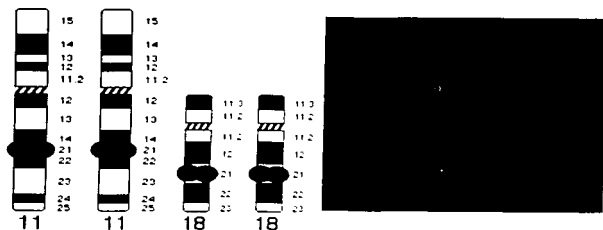


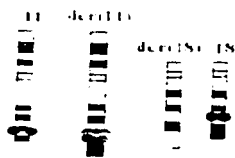
Figura 2. Estructura del gen API2 y del gen API1 adyacente en el cromosoma 11q22



A

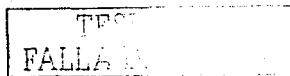


B



C

Figura 3. Determinación mediante hibridación in situ fluorescente de la t(11;18)(q21;q21) en núcleos en interfase. En A se observa la localización normal de los CAP 59N7 y 166G16. En B y C se observa que la t(11;18) da lugar a la fusión o colocalización de señales en ambas pruebas en el cromosoma 11 derivado



BIBLIOGRAFIA

1. Talal Norman. Sjogren's Syndrome: Historical Overview and clinical Spectrum of Disease. *Rheum Dis Clin North Am* 1992; 18:507-516
2. Fox RL, Ho-II Kang. Pathogenesis of Sjogren's Syndrome. *Rheum Dis Clin North Am* 1992; 18 517-538
3. Quintana PG, Silloo B, Bahler DW. Salivary Gland Lymphoid Infiltrates Associated With Lymphoepithelial Lesions: A Clinicopathologic, Immunophenotypic, and Genotypic Study. *Hum Pathol* 1997; 28 850-861
4. Campo E, Miquel R, Krenacs L, et al. Primary nodal marginal zone lymphomas of splenic and MALT type. *Am J Surg Pathol* 1999; 23 59-68
5. Roger B, Cazals-Hatem D, Agbalika F. Lymphomas in Patients with Sjogren's Syndrome are Marginal Zone B-Cell Neoplasms, Arise in Diverse Extranodal and Nodal Sites, and Are Not Associated With Viruses. *Blood* 1997; 90 766-775
6. Hyjek E, Smith WJ, Isaacson PG. Primary B-Cell Lymphoma of Salivary Glands and Its Relationship to Myoepithelial Sialoadenitis. *Hum Pathol* 1988; 19 766-776
7. Tumors of salivary glands. Ellis GL, Auclan PL. 3a series AFIP
8. Nowat AM, Viney JL. The anatomical basis of intestinal immunity. *Immunological Rev* 1997; 156 145-166
9. Guy-Grand D, Vasalli P. Gut intraepithelial T lymphocytes. *Curr Opin Immunol* 1993; 5 247-252
10. Harris NL, Jaffe ES, Stein H, et al. A revised European-american classification of lymphoid neoplasms: A proposal from the International Lymphoma Study Group. *Blood* 1994; 84 1361-1392
11. Campo E, Miquel R, Krenacs L, et al. Primary nodal marginal zone lymphomas of splenic and MALT type. *Am J Surg Pathol* 1999; 23:59-68
12. Nathwani BN, Anderson JR, Armitage JO, et al. Marginal zone B-cell lymphoma: a clinical comparison of nodal and mucosa-associated lymphoid tissue types. *J Clin Oncol* 1999; 2486-2492
13. Isaacson PG. Mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma. *Semin Hematol* 1999; 36 139-147
14. Kassan SS, Thomas TL, Moutsopoulos MT, et al. Increased risk of lymphoma in sicca syndrome. *Ann Intern Med* 1978; 89:888-892

15. Fishleder A, Tubbs R, Hesse B. Uniform detection of immunoglobulin gene rearrangement in benign lymphoepithelial lesions. *N Engl J Med* 1987; 316: 1118-1121
16. Zulman J, Jaffe R, Talal N, et al. Evidence that the malignant lymphoma of Sjogren's syndrome is a monoclonal B cell neoplasm. *N Engl J Med* 1978; 299:1215-1218
17. Fong S, Chen PP, Gilbertson TA, et al. Expression of three crossreactive idiotypes on rheumatoid factor autoantibodies from patients with autoimmune diseases and seropositive adults. *J Immunol* 1986; 137:122-125
18. Martin T, Weber JC, Levallois H, et al. Salivary gland lymphomas in patients with Sjogren's syndrome may frequently develop from rheumatoid factor B cells. *Arthritis Rheum* 2000; 43:908-916
19. Pablos JL, Carreira PE, Morillas L, et al. Clonally expanded lymphocytes in the minor salivary glands of Sjogren's syndrome patients without lymphoproliferative disease. *Arthritis Rheum* 1994; 37:1441-1444
20. Remstein ED, James DC, Kurtin PJ. Incidence and subtype specificity of API2-MALT1 fusion translocations in extranodal, nodal, and splenic marginal zone lymphomas. *Am J Pathol* 2000; 156:1183-1188
21. 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; 93:3601-3609.
22. Tapinos NI, Polihronis M, Moutsopoulos HM. Lymphoma development in Sjogren's syndrome. Novel p53 mutations. *Arth and Rheum* 1999; 42:1466-72
23. Stott D, Hiepe F, Hummel M, Berek C. Antigen-driven clonal proliferation of B cells within the target tissue of an autoimmune disease. *J Clin Invest* 1998; 102:938-946
24. Fishleder A, Tubbs R, Hesse B, Levine H. Uniform detection of immunoglobulin-gene rearrangement in benign lymphoepithelial lesions. *N Engl J Med* 1987; 316: 1118-21
25. Maes B, Wolf Peeter D. Marginal zone cell lymphoma. An update on recent advances. *Histopathology* 2002; 40: 117-126
26. Dierlamm J, Baens M, Hinz Kristina, et al. Detection of t(11:18) by interphase fluorescence in situ hybridization using API2 and MLT specific probes. *Blood* 2000; 96: 2215-2218
27. Miklos JM, Swerdlow SH, Bahler DW. Salivary gland mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma immunoglobulin VH genes show frequent use of V1-69 with distinctive CDR3 features. *Blood* 2000; 95: 3878-3884

FALLA

28.- Du M, Peng H, Singh N. The accumulation of p53 abnormalities is associated with progression of mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma. Blood 1995; 86:4587-93