

11
030622oj.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

UNIDAD ACADEMICA DE LOS CICLOS PROFESIONAL Y
DE POSGRADO
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMEDICAS

REARREGLO DE LOS GENES DE INMUNOGLOBULINAS Y DEL RECEPTOR PARA ANTIGENO DE CELULAS T EN LINFOMAS

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE

MAESTRO EN INVESTIGACION BIOMEDICA BASICA

P R E S E N T A :

VENANCIO RICARDO ORTEGA VELAZQUEZ



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 está 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.

INDICE

Resumen	1
I. Introducción	2
I.1 Origen molecular y celular de la diversidad de los linfocitos B	2
I.2 Ontogenia y diferenciación de linfocitos B	3
I.3 Organización y rearreglo de los genes de Ig	6
I.4 El receptor de linfocitos T	8
I.5 Ontogenia y diferenciación de linfocitos T	10
I.6 Selección del repertorio de linfocitos T	12
I.7 Organización genómica del RαT	14
II. Linfomas	16
II.1 Clasificación y estadificación de los linfomas	17
II.2 Linfomas de Bajo Grado	19
II.3 Linfomas de Alto Grado y de Grado Intermedio	20
II.4 Infecciones virales y linfomas	22
II.5 Aplicaciones clínicas del análisis del rearreglo de los genes de Inmunoglobulinas y del Receptor de células T en el diagnós- tico de los linfomas	24
Objetivos	27
Materiales y Métodos	28
Resultados	35

Discusión	43
Conclusiones	56
Bibliografía	58
Tablas y Figuras	81
Anexo I	
Anexo II	

RESUMEN

Durante el desarrollo y diferenciación de los linfocitos, los genes que codifican para receptores de antígeno son rearrreglados de varios segmentos en línea germinal. En los linfomas estos eventos son característicos para cada clona y pueden ser analizados mediante el uso de sondas moleculares de Ig y R α T, estableciendo su origen y estado de diferenciación. De esta manera fueron analizados molecularmente 64 linfomas. Treinta y cuatro fueron linfomas B, en donde nueve representan linfomas inmaduros pre-B y veinticinco son linfomas B maduros. Rearreglos para el R α T fueron detectados en 15 tumores, en donde existen rearrreglos similares para la subunidad β . En ocho linfomas hubo rearrreglos para Ig y R α T, y en 7 casos conservan sus genes en forma germinal. Aparentemente existe una tendencia de linfomas pre-B y bigenotípicos en individuos de edad avanzada. Por otro lado, las alteraciones en c-myc detectadas en cinco muestras, mostraron una heterogeneidad del tipo de translocación que sucede en los linfomas Burkitt. De esta manera, el análisis molecular permitió evaluar y acumular más información sobre las características genotípicas de diferentes tipos de linfomas, expandiendo así nuestro conocimiento de la biología de los linfomas malignos.

I. INTRODUCCION

El rearreglo de los genes de inmunoglobulinas (Ig) o del receptor de células T (RcT) es un paso obligatorio durante la diferenciación de células linfoides que están comprometidas hacia un linaje B o T, respectivamente. La identificación de tales rearreglos ha tenido un impacto importante en la determinación del estatus monoclonal, oligoclonal o policlonal de proliferaciones linfoides anormales. En el diagnóstico de linfomas y leucemias, ha permitido definir la extensión de la enfermedad y el monitoreo de la terapia. Durante los estadios iniciales del desarrollo de los linfocitos ha definido los eventos genéticos que tienen lugar durante la ontogenia de células B o T y los defectos que resultan de errores en la maduración de precursores de células B o T, y por último, en la búsqueda de un posible papel en la transformación maligna de translocaciones cromosómicas específicas, involucrando genes de Ig o del RcT y genes celulares (por ejemplo, proto-oncogenes).

I. 1. Origen molecular y celular de la diversidad de los linfocitos B.

El repertorio de anticuerpos o inmunoglobulinas en el sistema inmune es creado por los linfocitos B. La especificidad de una Ig por un antígeno está determinada por tres zonas denominadas regiones determinantes de complementariedad (CDRs) en la región variable de cadena pesada (P) y ligera (L) (1). Cada linfocito sólo tiene una combinación de cadena P y L con un juego único de CDRs, de los millones de posibles

combinaciones en el repertorio total de moléculas de Ig.

A nivel molecular, la diversidad de las regiones variables de Ig es generada por rearrreglos sucesivos y por eventos de reemplazo en ambos alelos del loci P y L, así como también de la inserción de nucleótidos adicionales (region N, en cadena pesada) que son introducidos durante la reacción de unión (1). En cada paso de la generación de esta diversidad, al parecer un linfocito B determina si tiene un rearrreglo productivo o no productivo por la deposición del producto funcional del gen rearrreglado en la superficie de la membrana.

A nivel celular, la proliferación y diferenciación de células progenitoras B ocurre en íntimo contacto con un microambiente suministrado por el órgano linfoide primario en la cual ésta diversidad es generada. Elementos de este microambiente, conocido como el estroma, incluyen células adventicias, células reticulares, células endoteliales, fibroblastos, macrófagos, adipositos y una matriz extracelular. La influencia de células del estroma sobre progenitores B es fundamental para el desarrollo de linfocitos B (2) y se ejerce a través del contacto célula-célula y a través de citocinas secretadas por células del estroma bajo el contacto con los linfocitos.

1. 2. Ontogenia y diferenciación de linfocitos B.

El desarrollo, activación, proliferación y diferenciación de los linfocitos B están regulados a múltiples niveles por una compleja interrelación de tipos celulares y factores solubles de crecimiento hematopoyéticos. Aunque la regulación de las etapas tardías de

la ontogenia es mejor comprendida (3, 4), las señales que controlan la proliferación y maduración de precursores de células B (PsCB) durante los estadios tempranos del desarrollo del linaje B permanece incierta.

Los linfocitos B son derivados de una células tronco pluripotencial que también da lugar al linaje mieloide, eritroide, y a linfocitos T (5). El compromiso del linaje B o T de linfocitos ocurre antes de que los PsCB entren al órgano primario de diferenciación linfocítica. El primer descendiente de la célula tronco pluripotencial que está comprometida hacia el linaje B es denominada célula pro-B (Figura 1). Esta célula pro-B no expresa marcadores de linaje B específicos y no ha iniciado todavía el rearreglo de los genes de Ig (6, 7).

Una serie de eventos moleculares y propiedades celulares definen diferentes estadios del desarrollo de células B. Por ejemplo, los PsCB no sólo son caracterizados por el inicio de una cascada de rearreglos de los genes de Ig (1), sino también, por la adquisición coordinada y pérdida de antígenos de diferenciación de linaje B. A la fecha, más de 20 antígenos bioquímicamente distintos han sido identificados. Mientras algunos (tales como CD10, CD45 y CD73) representan enzimas asociadas a la membrana, otros (como CD19, CD22 y B7) probablemente representen receptores para ligandos, que pueden jugar un papel importante en las interacciones célula-célula durante el desarrollo de células B en el microambiente de la médula ósea (8, 9).

Los modelos propuestos de la ontogenia de linfocitos B están basados en estudios realizados en PsCB de pacientes con leucemia linfoblástica aguda (LLA). De acuerdo a

éstos modelos, el antígeno CD19 representa el determinante más temprano de linaje B y la expresión de antígenos de diferenciación procede en la siguiente forma: CD19 > CD24 > CD10 > CD20 > CD22 > C μ > CD21 > sig > CD23 (10). Sin embargo, los fenotipos de células leucémicas pueden ser alterados por evolución clonal durante y/o después de la transformación maligna. Además, varios fenotipos aberrantes han sido observados en LLA, incluyendo linajes mixtos o bigenotípicos (11).

A diferencia de la expresión de antígenos de diferenciación en células leucémicas CD19 > CD10, en células normales de médula ósea ambos antígenos son expresados al mismo tiempo (12). Cuando se cultivan PsCB de hígado fetal in vitro, células CD10⁺CD19⁺ son halladas en gran número, y adquieren el antígeno CD19 in vitro, y su progenie tiene un fenotipo más inmaduro que la progenie CD10⁺CD19⁺ (13). Con este modelo, los PsCB más inmaduros (estadio 0) expresan TdT nuclear y CD10 en la superficie pero pierden antígenos específicos CD19, CD22 e Ig citoplasmática y de superficie. Durante los subsecuentes estadios del desarrollo, los PsCB TdT⁺CD10⁺ se comprometen hacia el linaje B y expresan CD22 en el citoplasma (estadio 1). La adquisición de CD19 identifica el próximo estadio de diferenciación (estadio 2). Las células precursoras TdT⁺CD10⁺CD19⁺CD22⁺ posteriormente pierden CD10 dando lugar a células en estadio 3, TdT⁺CD10⁺CD19⁺CD22⁺. Los PsCB en estadio 2, así como en estadio 3 pueden diferenciarse hacia linfocitos pre-B (estadios 4a y 4b), las cuales son identificadas por la expresión de la cadena μ en el citoplasma (Figura 1). La mayoría de PsCB en el hígado fetal son estadio 0/1 y estadio 2, mientras que el 1% son estadio 3. Las células

linfoides PsCB en médula ósea comprende el 21% en estadio 3. Los patrones de la adquisición secuencial de antígenos de linaje B durante el desarrollo, en diferentes órganos hematopoyéticos, puede no ser el mismo. Las diferencias observadas indican que el hígado fetal puede ser el sitio original para los eventos tempranos de la ontogenia de linfocitos B durante el desarrollo fetal. Sin embargo, múltiples rutas pueden existir y el inmunofenotipo dominante puede depender sobre la presión selectiva de un microambiente dado.

El desarrollo de linfocitos B ha sido tradicionalmente dividido en dos fases (Figura 1). La primera fase se piensa que es independiente del antígeno y termina cuando Ig son expresadas de genes rearmados de cadenas P y L en la superficie de células B inmaduras. En este punto, las células B con Ig específicas para antígenos propios son, ya sea, deletados (14) o inactivados (15). En la segunda fase, dependiente del antígeno, las células slg^+ restantes puede ser seleccionadas positivamente en la circulación periférica y colonizar los órganos secundarios. Dependiendo sobre la naturaleza del antígeno, estas células pueden ser estimuladas independientemente de linfocitos T o con la ayuda de células T cooperadoras (16).

I. 3. Organización y rearmado de los genes de Ig.

La estructura de los genes de Ig que codifican las cadenas P y L consisten de segmentos variables (V), de diversidad (D en el caso de P), de unión (J) y constantes (C) (Figura 2). El enorme número de genes requeridos para codificar la región variable

de Ig, específicos para cada antígeno, son generados por el ensamble de rearrreglos secuenciales de estos segmentos en un proceso conocido como recombinación V(D)J (1, 17).

El primer evento de recombinación en P es la unión D-J, lo cual ocurre en ambos cromosomas. Posteriormente un alelo DJ se combina con una región V, y si el rearrreglo es productivo se producirá cadena μ siendo detectable en el citoplasma. Una célula en este estado es un linfocito pre-B. Sin embargo, si el rearrreglo no es productivo, a causa de una unión fuera de fase, el otro alelo será rearrreglado, el cual puede ser o no productivo (18). Un rearrreglo productivo VDJ en P permite y activa el rearrreglo de L (Kappa antes de Lambda) (19, 20). Por otro lado, ha sido posible correlacionar la recombinación de un locus con su transcripción y sensibilidad a la DNasa I, sugiriendo que la recombinación puede ser modulada por la transcripción y configuración de la cromatina (21). Una característica importante de los linfocitos B es que cada célula expresa únicamente el producto de un alelo de P y L en el anticuerpo. Esto es el resultado de la exclusión alélica (expresión de un sólo alelo por locus) y exclusión isotípica (expresión de un sólo tipo de L) (17).

El complejo enzimático específico de la recombinación involucrado en estos rearrreglos del DNA no ha sido aislado, sin embargo, el mecanismo por el cual éste se realiza ha sido bien estudiado. La recombinasa reconoce secuencias conservadas que se localizan en el extremo 3' de los segmentos V, el extremo 5' del segmento J y en los extremos 3' y 5' de los segmentos D. Cada secuencia consiste de un palíndromo

heptamérico y un nonámero rico en AT, separados por un espacio de 12 o 23 pb cada uno, lo que determina que dos secuencias sean unidas correctamente (22). Si las secuencias de los dos segmentos a ser unidos tienen la misma polaridad en el cromosoma, las secuencias intermedias son unidas en un círculo y deletadas. Si tienen polaridad opuesta, la parte correspondiente de el locus es invertida (23).

Poco se conoce acerca de los factores que participan en la recombinación V(D)J. Recientemente dos genes RAG-1 y RAG-2, específicos de células linfoides, han sido identificados los cuales juegan un papel crucial en el proceso (24, 25). La coexpresión de RAG-1 y RAG-2 es necesaria y suficiente para inducir la recombinación de substratos en fibroblastos, y su expresión correlaciona con la actividad de recombinación en líneas celulares linfoides (24-26).

Hasta ahora, la enzima deoxinucleotidil terminal transferasa (TdT) ha sido la única implicada en el proceso de recombinación V(D)J, donde adiciona nucleótidos en forma no germinal (region N) en P entre las uniones D y J o V y DJ, generando una mayor diversidad (27). Un mecanismo adicional para la diversidad es la hipermutación somática, que ocurre en los genes que codifican la región variable de las Ig (28).

1. 4. El receptor de linfocitos T.

El sistema inmune es capaz de montar una respuesta altamente específica contra cualquier antígeno extraño por medio de receptores en los linfocitos B y T. En la superficie de los linfocitos T el receptor existe en dos formas heterodiméricas, R α T α/β

(29) y R_cT γ/δ (30). El R_cT está asociado no covalentemente con un complejo molecular, denominado CD3, necesario para la expresión del heterodímero en la membrana y que sirve para transmitir la señal generada por el R_cT al interior de la célula y cumplir su función efectora (31). Los antígenos reconocidos por el R_cT γ/δ están siendo definidos todavía, mientras que los R_cT α/β se unen a fragmentos de antígenos que han sido intracelularmente degradados (de 10 a 20 aa), conocido esto como procesamiento de antígeno, y que son presentados por moléculas clase I o II del Complejo Principal de Histocompatibilidad (32). El reconocimiento del antígeno por el R_cT α/β , además, es facilitada por moléculas accesorias CD4 y CD8, expresadas en forma mutuamente exclusiva en células T maduras (33). Los correceptores CD4 y CD8 se unen a determinantes no polimórficos de moléculas clase II y clase I, respectivamente, e incrementan la avidéz de los linfocitos T por el blanco (34, 35).

A diferencia de los linfocitos B, lo cuales parecen funcionar de la misma manera (modulando solamente la clase de anticuerpo que ellos producen), muchos linfocitos T funcionalmente distintos coexisten en la periferia:

- Linfocitos T cooperadores (T_h), son generalmente restringidos por moléculas clase II del CPH (identificados por el marcador CD4) y que son necesarios para muchas de las respuestas de linfocitos B, actuando por medio de la secreción de factores de diferenciación y crecimiento. Este tipo de células lleva la forma heterodimérica α/β del R_cT.
- Linfocitos T citotóxicos (T_c), actúan directamente destruyendo células anormales

o infectadas por virus y usualmente reconocen moléculas clase I del CPH (a menudo son CD8⁺). Estas células llevan también el heterodímero α/β en su superficie.

- Células dendríticas de epidermis (DEC), un tipo de células T recientemente descrito y localizadas en la piel (36), de función desconocida pero con capacidad citotóxica. Estas células son negativas tanto para CD4 y CD8 y son claramente identificadas por llevar el heterodímero γ/δ .

- Células Asesinas Naturales (NK) tienen receptores γ/δ en algunos casos (37), aunque no siempre. Como su nombre lo indica, tienen propiedades no específicas de "destruir". Estas células son también CD4⁻CD8⁻.

- Linfocitos T supresoras (T_s) se cree que son una clase de células T especiales en regular disminuyendo la respuesta inmune. Hasta la fecha, no se ha identificado un receptor específico a favor de este tipo de célula.

I. 5. Ontogenia y diferenciación de linfocitos T.

Los precursores de timocitos son derivados de una célula tronco hematopoyética multipotencial en el hígado fetal y posteriormente en médula ósea (5). No hay un marcador específico para estas células, aunque células pro-T son CD7⁺ y CD3⁺ citoplásmica. Bajo la influencia de quimioattractantes derivados del epitelio tímico, que incluyen β_2 -microglobulina, células pro-T inicialmente se localizan en la unión córtico-medular y subcápsula, e inician cambios fenotípicos que incluyen la adquisición de receptores para antígeno, receptores para hormonas, y antígenos de diferenciación (38-

41).

Después de mucha controversia, se está de acuerdo que la diferenciación de muchas células T procede como se muestra en la Figura 3. Los linfocitos pro-T CD7⁺ sin moléculas CD4 y CD8 en su superficie o "dobles negativos" (40, 41) representan alrededor del 5% del total de timocitos, y en este estado comienza el rearreglo de los genes del R α T, en cualquiera de sus subunidades β , γ o δ (42). Un pregunta mayor sin resolver es donde ocurre la diversificación del R α T α/β y γ/δ . Es obvio que como primer evento existen células comprometidas α/β y γ/δ , y que éstas no derivan unas de otras. Así, las células α/β no surgen de arreglos no funcionales γ/δ , propuesto inicialmente, debido a la aparición temprana en el timo fetal (día 15) de células γ/δ y posteriormente la aparición de células α/β (día 17) (42). La evidencia más fuerte es el hallazgo en el timo de DNA circular con secuencias germinales del R α T δ , aparentemente producidas por la unión V α \rightarrow J α C α , indicándonos que células rearreglando R α T α previamente no han rearreglado R α T δ (43).

Las únicas células en esta etapa que tienen R α T:CD3 en su superficie son: células γ/δ , cerca del 10%, que pueden ser completamente maduras y emigrar hacia la periferia (44), y alrededor de un 10% de células α/β CD4⁺CD8⁻. Hay evidencias que indican una breve transición de células CD8⁺CD3⁻ (45), antes de entrar a la categoría de células mayoritaria en el timo (80%), el estado de "doble positivas" CD4⁺CD8⁺CD3⁻ (40, 41). El 50% de estas células tienen un bajo nivel de R α T α/β -CD3 en su superficie y virtualmente todas han rearreglado R α T α . En esta etapa de diferenciación la selección de un receptor

específico tiene lugar. Hasta este punto, las células han sido confinadas a la región córtica, pero como las células $CD4^+CD8^+$ maduran, estas aparecen como "sólo positivas" $CD4^+$ o $CD8^+$ RcT- $CD3^+$ en la médula (el 20% del total). La expresión del RcT es ahora de aprox. 40,000 moléculas por célula, y son capaces de emigrar. Mientras que la mayoría de células $T\alpha/\beta$ están en la periferia (95%), células $\gamma\delta$ son predominantes en el tejido linfoide del intestino y la piel (46).

I. 6. Selección del repertorio de linfocitos T.

Una cantidad significativa de células T mueren (entre un 95% y 99%) en el timo, particularmente en el estado $CD4^+CD8^+$ (47). Algunas de las muertes de estas células es debido a un arreglo deficiente del receptor (por ejemplo, uniones fuera de fase de V y J), y en otras es parte del proceso de selección mediante la muerte programada (o apoptosis) (48). Esta selección permite la eliminación clonal y/o inactivación de células T reactivas contra antígenos propios (llamada selección negativa) antes de que puedan montar una respuesta inmune (49-55). Ejemplos de este fenómeno han sido obtenidos por la introducción de genes rearrregados α y β de células T específicas y que pueden ser entonces colocados en un fondo genético en donde el sustrato antígeno y la molécula del CPH son ambos expresados. Experimentos realizados con receptores específicos para el antígeno HY y moléculas clase I D^b del CPH fueron introducidos en ratones que llevan este tipo de haplotipo, y ratones machos (que expresan este antígeno) y hembras (que no lo expresan) fueron comparados (51). En los ratones machos hubo una delección

masiva de timocitos mientras que en las hembras no sucedió. Otros tipos de ensayos, describen la delección de células T llevando V β específicos, aparentemente en base a la reactividad de antígenos propios (o super-antígenos) solamente conocidos por designaciones genéticas como mis 1, 2, o 3, así como también aquellas que interactúan con un grupo de entorotóxicas de estafilococos (52, 53).

El proceso de selección positiva es mucho más difícil de comprender. Sin embargo, esto permite y facilita la diferenciación y exporte de células T que pueden interactuar con antígenos extraños más moléculas propias del CPH, requiriendo la unión de sus receptores a moléculas propias del CPH en el epitelio del timo en la ausencia de antígeno (56-58). Inicialmente se sugirió, que había un fenómeno (a menudo referido como educación tímica) por el cual de alguna manera el repertorio del RcT era capaz de interactuar con moléculas propias del CPH (59). En experimentos más recientes, ratones transgénicos con receptores específicos que derivan de un tipo de CPH dado, se diferencian completamente, y son exportados desde el timo más eficientemente en ratones con el mismo tipo de CPH (57, 58).

La selección en el timo no es el único mecanismo por el cual el repertorio de células T se lleva a cabo. Ciertos antígenos propios pueden estar restringidos en la periferia y la tolerancia a estos antígenos por células T específicas podría requerir un mecanismo extratímico. De esta manera, la tolerancia puede ser generada a través de la inducción de anergia clonal, con una regulación disminuida del RcT α/β y CD8, y por la eliminación clonal de células T maduras con receptores reactivos a antígenos propios

(60, 61). A pesar de estos hallazgos, falta por elucidar donde y cómo son eliminadas estas células autorreactivas.

1. 7. Organización génomica del R_{CT}.

Al igual que las inmunoglobulinas, los genes del R_{CT} están arreglados en segmentos específicos de regiones variables (V), de diversidad (D, en el caso de R_{CT} B y R_{CT}), de unión (J) y constantes (C) (Figura 2). Al parecer las combinaciones de estos segmentos esta mediada por secuencias similares a aquellas que controlan el rearreglo de los genes de Ig (secuencias conservadas de heptameros y nonameros separadas por 12 o 23 nucleótidos) (22). Esto indica que los genes del R_{CT} y de Ig pueden usar o compartir las mismas enzimas de recombinación, demostrado por los experimentos en que líneas celulares pre-B pueden rearreglar secuencias D_B→J_B y elementos D_P→J_P (62). Así, el proceso de recombinación parece ser muy similar para R_{CT} e Ig, tanto con la formación de la asa y delección de las secuencias intermedias, como por inversión, dependiendo de la orientación de las secuencias a ser unidas (23).

Aproximadamente se estima que existen 100 segmentos V_B en el hombre, agrupados en una docena de familias (63). Hay dos regiones C altamente conservadas separadas aproximadamente por 10 Kb, el gen C 5' es designado C_{B1} y el gen 3' designado C_{B2}. Alrededor de 4 Kb 5' de cada región C hay un grupo de segmentos J, J_{B1} y J_{B2} cada uno con seis genes funcionales. Teóricamente es posible las combinaciones VJ y DD, expandiendo quizás la diversidad de los productos (64).

El locus $RcT\gamma$ es menos diverso (Figura 2), con un número total de 11 segmentos $V\gamma$, cinco segmentos J y dos regiones constantes, arreglados como $J\gamma 1-C\gamma 1$ y $J\gamma 2-C\gamma 2$ (65).

El locus α/δ es muy peculiar. Muchos de los segmentos del $RcT\delta$ están localizados dentro de los segmentos V y J del gen α (66). Otro evento interesante de este locus es que el gen α excede en un gran número (>50) los segmentos J . Hay una sola región $C\alpha$ y $C\delta$, tres segmentos $J\delta$ y dos $D\delta$ (67).

Aunque la organización básica del loci del RcT es muy similar al de las Ig , la diversidad en las uniones V - J (la región equivalente $CDR3$) excede al de las Ig , tanto en $RcT\alpha/\beta$ y $RcT\gamma/\delta$. Varios eventos contribuyen a la diversidad de esta región:

- La adición de regiones N se realiza en los cuatro polipéptidos del RcT , la cual sólo ocurre en P .
- Hay un gran número de regiones J (50 $J\alpha$ y 12 $J\beta$) comparadas con las 4 - 6 de L y P , respectivamente.
- La habilidad de utilizar ambas regiones D ($VD1D2J$) en $RcT\delta$ y el hecho de que la adición de la región N ocurre en tres diferentes posiciones (68).

A causa de que el RcT "ve" fragmentos de antígenos embebidos en moléculas del CPH , se ha propuesto que esta diversidad de $CDR3$ es la responsable para la unión del antígeno, mientras que el resto del heterodímero hace contacto con las moléculas del CPH .

II. LINFOMAS

Durante los últimos años grandes avances han sido realizados en la biología, patología y tratamiento de los linfomas. Tales investigaciones se han enfocado en correlacionar la citogenética, histopatología y el curso clínico de la enfermedad.

Actualmente los linfomas son considerados expansiones monoclonales de células linfoides y de sus precursores que han sufrido transformación neoplásica (69). Hasta hace poco, su clasificación y estudio de estos tumores estaba basado principalmente en observaciones morfológicas y correlaciones clínicas. La identificación de marcadores de superficie celular y genes específicos de diferentes poblaciones de linfocitos ha permitido comprender mejor la diferenciación y reclasificación de estos tumores linfoides en base a su linaje.

Muchos de los linfomas son de origen B y, con una frecuencia menor de origen T. Los tumores se desarrollan y localizan en ganglios linfáticos, sin embargo, un número considerable puede surgir fuera de estos sitios principalmente en individuos inmunosuprimidos (70, 71). Los linfomas retienen, en una mayor o menor extensión, ciertas características de su contraparte normal y el patrón de afección tisular (folicular o difuso), la morfología de las células (grandes o pequeñas con o sin núcleo hendido, o una mezcla de éstas) y la extensión del órgano involucrado predicen el comportamiento biológico del tumor.

II. 1. Clasificación y estadificación de los linfomas.

Más de diez variedades de linfomas pueden ser identificados por sus manifestaciones clínicas y morfológicas. Diversas clasificaciones patológicas han sido utilizadas en delinear la historia natural, pronóstico y respuesta a la terapia. Sin embargo, en algunos casos, distintas entidades morfológicas pueden estar relacionadas clínicamente y/o biológicamente, mientras que otras entidades morfológicamente similares pueden ser distintas (72, 73).

En 1982 una nueva clasificación fue propuesta con una terminología más precisa y con mayor relevancia clínica (74) (Tabla 1). Tres grupos con diferente pronóstico son identificados: histologías de bajo grado, de grado intermedio y de alto grado. La supervivencia reportada para estos pacientes es de 7, 3 y 1 años, respectivamente (Figura 4A). Aunque es probable que las curvas de supervivencia no han cambiado significativamente, el porcentaje de curación se ha incrementado para histologías de alto grado e intermedio (Figura 4B).

A pesar de que la nueva clasificación ha aclarado la reproducibilidad y definición de subtipos histológicos, aún quedan problemas significativos, particularmente en los linfomas T. No es sorprendente que los patólogos utilicen diversas clasificaciones para estas entidades. Por otro lado, los eventos clínicos y morfológicos de nuevas entidades tales como los linfomas extraganglionares asociados a mucosa y linfomas de células grandes anaplásicas que están siendo más redefinidos (75), así como también, tomar en cuenta las características fenotípicas y genotípicas de los linfomas, es necesario

reevaluar la última clasificación, por lo menos para uso clínico.

Una vez que el diagnóstico de linfoma ha sido establecido, la estadificación clínica invasiva debe ser evaluada. La gran mayoría de los pacientes con linfoma tienen enfermedad diseminada al inicio y frecuentemente involucra sitios extralinfáticos. Sin embargo, la estadificación permite identificar un pequeño grupo de pacientes con enfermedad localizada que pueden ser curados sólo con radioterapia.

Los criterios propuestos por la Ann Arbor y el sistema TNM para linfomas T cutáneos (76, 77) son los más aceptados para la estadificación de los linfomas (Tabla 2). Es importante conocer los patrones característicos de diseminación de los diferentes tipos de linfomas para plantear las estrategias óptimas en la estadificación y en algunos casos, por ejemplo, donde existe una alta probabilidad de afectar SNC, designar las estrategias del tratamiento.

El examen físico a fondo es importante en la evaluación del paciente con linfoma. De particular importancia es la presencia o ausencia de síntomas sistémicos (por ejem. fiebre, sudor nocturno o pérdida de peso), la evaluación de todas las zonas ganglionares, y la presencia de órganos afectados. La tomografía axial computarizada ha hecho posible detectar adenopatías abdominales y obtener una imagen intratorácica más precisa (78). La evaluación del tracto gastrointestinal todavía requiere de estudios con Bario, mientras que la linfografía es raramente utilizada.

A pesar de la marcada heterogeneidad en la presentación clínica y pronóstico, los linfomas tienen muchos eventos en común. Son proliferaciones monoclonales de

linfocitos B o T por el análisis molecular; hay rearrreglos clonales de genes de Ig o del RCT; algunas translocaciones cromosómicas específicas pueden ser asociadas con ciertos tipos histológicos, y la clasificación en grupos de pronóstico permite el desarrollo de estrategias para el tratamiento.

II. 2. Linfomas de Bajo Grado.

De acuerdo a la nueva clasificación hay tres subtipos histológicos de linfomas de bajo grado: linfoma de linfocitos pequeños (LLP), linfoma folicular de células pequeñas hendidas (LFCPH) y el linfoma folicular mixto (LFM) (74). Estos linfomas son generalmente indolentes en su comportamiento biológico y de estado avanzado en el diagnóstico (III o IV). La invasión a médula ósea es más común en LLP y menos frecuente en LFM. Cuando se determina un plan terapéutico, primero es importante identificar aquellos pacientes con enfermedad localizada (estadios I y II) potencialmente elegibles para radiación local (79). La sobrevida sin enfermedad se puede lograr en tales pacientes particularmente en gente más joven de los 40 años. Sin embargo, para la mayoría, el involucramiento linfomatoso es extenso.

El manejo de los estadios sistémicos III y IV continua siendo controversial debido a que los protocolos no son totalmente curativos a pesar de sus altos rangos de remisión completa. La remisión se puede alcanzar sólo con agentes alquilantes, combinaciones de quimioterapia o la combinación de quimioterapia/radiación (80). Un evento importante en la recaída de linfomas de bajo grado es la aparición de un comportamiento clínico

más agresivo con una transformación histológica hacia los grados intermedios o de alto grado (81).

Otra estrategia en el manejo inicial ha sido detener la terapia sistémica hasta que sea necesaria (82). La mayoría de los pacientes son asintomáticos sin enfermedad amenazante en el diagnóstico, y la terapia apropiada deberá ser llevada a cabo cuando la enfermedad se vuelve progresiva (82).

Están surgiendo modificadores de la respuesta biológica (MRB) como agentes importantes en la terapia de los linfomas de bajo grado. Anticuerpos monoclonales (83), interferón recombinante (84) e interleucina 2 (IL-2) (85) han sido estudiados solos o en combinación con otros MRB. Cada uno de estos modificadores tiene la ventaja de un mecanismo de acción único, y ensayos preliminares han demostrado una respuesta buena, aunque transitoria.

II. 3. Linfomas de Alto grado y de grado Intermedio

Siete subtipos histológicos son considerados agresivos (Tabla 1) y requieren inequívocamente terapia intensiva en el diagnóstico. La curva de supervivencia para estas enfermedades muestra una rápida caída (compuesta de pacientes con una respuesta parcial o ninguna) y entonces una meseta (compuesta de pacientes en respuesta completa) (Figura 4B).

La estadificación debe ser a fondo pero con rapidez, reconociendo el crecimiento de estas neoplasias. Los linfomas linfoblásticos y de células pequeñas no hendidas

tienen altos índices de diseminación meníngea, requiriendo examen del líquido cefalorraquídeo y profilaxis a SNC (86).

Haciendo a un lado los anteriores linfomas, los otros cinco subtipos histológicos de linfomas agresivos son tratados muy similarmente. Enfermedad regional (estadios I y II) es tratada con combinaciones de quimioterapia, con o sin radiación. El tratamiento de elección para pacientes en estado avanzado son combinaciones intensivas de quimioterapia y los rangos de respuesta completa parecen depender sobre la intensidad relativa del régimen de droga empleada (87), reportándose hasta un 80% de pacientes en remisión completa cuando se usan de drogas de tercera generación.

Las combinaciones de CHOP, M-BACOD, ProMACE-CytaBOM y MACOP-B tienen las más altas dosis relativas en intensidad de cualquiera de las drogas utilizada actualmente (88), siendo alternadas con ciclos de drogas mielotóxicas y no mielotóxicas que permitan la mielosupresión. La toxicidad ha sido relacionada a mucositis y severa supresión de la médula ósea y las complicaciones letales se han presentado en el 2% personas más jóvenes de 60 años y en 13% de gente de más de 60 años.

No todos los subtipos histológicos agresivos alcanzan una remisión duradera con MACOP-B (88). Los linfomas foliculares de células grandes (LFCG), linfoma difuso de células pequeñas hendidas (LDCPH) y LFM (un linfoma de bajo grado) alcanzan altos rangos de respuesta completa, aunque su recaída es frecuente. El linfoma linfoblástico y de células pequeñas no hendidas son a menudo tratados con protocolos intensivos tipo leucemia aguda usando profilaxis a sistema nervioso central (86).

Recientemente se ha utilizado el trasplante autólogo de médula ósea (89). Si se realiza mientras está en la primera o segunda remisión, este procedimiento (utilizando altas dosis de ciclofosfamida mas irradiación corporal total) puede alcanzar una remisión más duradera arriba de las dos terceras partes de los pacientes.

II. 4. Infecciones virales y linfomas.

El papel de los virus en la etiología de las leucemias y linfomas ha sido quizás la más difícil de caracterizar. Sin embargo, hay varias circunstancias en las cuales existe la asociación de un virus. En ciertas regiones de Africa en donde el linfoma de Burkitt es endémico, parece que la infección crónica con el virus Epstein-Barr (EB) estimula continuamente una proliferación excesiva de linfocitos B, incrementando la posibilidad de que ocurran translocaciones cromosómicas específicas y dar lugar a una clona neoplásica (90). En otras partes del mundo, EB y otros virus pueden jugar un papel similar en la patogénesis de los linfomas B, surgiendo en individuos cuyo sistema inmune ha sido severamente dañado por terapia inmunosupresiva (91) o por el desarrollo del Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida (92). El virus EB también puede ser importante en la patogénesis de otras anormalidades linfoides, incluyendo la enfermedad de Hodgkin (93) y en linfomas T (94).

En Japón y otras regiones, el virus de leucemia T humana (HTLV-I) parece tener un efecto comparable en el desarrollo de la leucemia/linfoma T adulta (LLAT) (95), al menos en parte por la activación de células T al inducir la expresión del receptor de

Interleucina 2 (96).

La LLTA es un linfoma raro de células T CD4+, con la asociación de anticuerpos contra HTLV-I y una abrupta presentación clínica diseminada con un desenlace rápido (97). Los subtipos histológicos, sin ningún significado pronóstico, pueden ser de bajo, intermedio y alto grado. Con un pronóstico más predecible es la presencia de anticuerpos contra el retrovirus, el estado general, la elevación de la deshidrogenasa láctica, células atípicas circulantes, hipercalcemia y la invasión a santuarios (98).

Los linfomas asociados al virus de Inmunodeficiencia Humana (VIH) son neoplasias agresivas B de tipo LIB, LDCG o LCPNH (99). En los tumores se han encontrado incorporado el genoma del virus EB, la translocación t(8;14) y arreglos del oncogen c-myc (100-102). La presentación clínica es un rápido crecimiento tumoral a menudo en sitios raros o en múltiples sitios extraganglionares, tales como el cerebro, músculo y tracto gastrointestinal (103). En la mayoría de los pacientes, el pronóstico es malo con una supervivencia de 6 a 9 meses. Sin embargo, se puede alcanzar una respuesta completa con combinaciones de quimioterapia en pacientes con una adecuada inmunidad celular (medido por el ratio T4:T8) y sin infecciones serias. Para aquellos pacientes con un estado inmune malo e historia de infecciones, es usualmente recomendada radiación paliativa y quimioterapia con un sólo agente (104).

II. 5. Aplicaciones clínicas del análisis del rearrreglo de los genes de Inmunoglobulinas y del Receptor de células T en el diagnóstico y caracterización de los linfomas.

El diagnóstico del linfoma maligno depende de la evaluación histológica de las biopsias de tejido. Sin embargo, distinguir entre una neoplasia maligna y benigna en ganglios linfáticos y otros tejidos linfoides por microscopía de luz, es una de las tareas más difíciles para los patólogos. En gran parte, la causa biológica de esta dificultad es que los linfocitos estimulados pueden ser morfológicamente semejantes a los linfocitos neoplásicos. Por el contrario, los linfocitos neoplásicos bien diferenciados pueden ser indistinguibles citológicamente de linfocitos normales no estimulados. Hay también casos en los cuales condiciones reactivas pueden coexistir (por ejem. el infiltrado de linfocitos T en los linfomas B) dificultando la interpretación histológica. Además, en ocasiones el carcinoma metastásico o el melanoma puede ser confundidos con linfomas. Así, la discriminación entre una expansión linfoide clonal versus policlonal obviamente tiene importancia clínica.

Algunos estudios importantes que contribuyen al diagnóstico de linfoma son los siguientes:

- 1) Análisis inmunohistoquímico en que marcadores de células B y T son identificados con anticuerpos monoclonales (105, 106).
- 2) Análisis inmunogenético en el que el rearrreglo de genes de Ig o del RcT demuestran que son de origen monoclonal (107-111).

- 3) **Análisis por cariotipo, en el que algunas translocaciones pueden ser identificadas (112).**
- 4) **Métodos en biología molecular para la localización de los puntos de ruptura en las translocaciones, rearreglo de proto-oncogenes e identificación de sus productos (113-115).**

Varios marcadores han sido utilizados para establecer el origen clonal de los linfomas, cada uno con sus propias limitaciones intrínsecas. Los marcadores cromosómicos pueden ser útiles, pero no siempre están presentes. El análisis de la enzima Glucosa 6-Fosfato Deshidrogenasa (G6PD) es válido sólo en aquellos pacientes femeninos heterocigotas para esta enzima. Otro método es el uso de anticuerpos monoclonales contra marcadores de superficie o citoplasmáticos, principalmente en la expresión isotípica de cadenas ligeras (105, 106). Un problema con el uso de estos anticuerpos es que no existe un marcador para los linfocitos T que sea universalmente aceptado como un indicador de monoclonalidad (116). Por lo tanto, el análisis de los genes de Ig o del RcT han ayudado en determinar la clonalidad y linaje en el diagnóstico de expansiones linfoides donde el fenotipo es difícil o incierto de asignar (107-111).

Una población policlonal de células B o T tiene muchos rearreglos diferentes de genes de Ig o RcT, respectivamente, cada uno generando fragmentos de restricción de diferente tamaño. Al ser analizados, ninguno de estos rearreglos pueden ser detectados por el método de "Southern Blot". Sin embargo, si una expansión monoclonal está presente (alrededor del 1% de la población), la cual representa una sola progenie de

células, tendrá un patrón único de rearrreglo en el DNA específico de esa población e identificable como un nuevo fragmento(s) de tamaño que difiere de la línea germinal.

Una vez que un patrón particular de rearrreglo de Ig o R_{CT} ha sido establecido, este puede servir como un marcador altamente sensible y específico del tumor, mejorando la habilidad de identificar células tumorales que persisten después de la terapia y ayudar en la temprana detección de la recurrencia (117, 118).

Es importante tener en cuenta que nonoclonalidad no necesariamente es igual a un fenotipo maligno para la población celular en estudio, debido a que proliferaciones monoclonales benignas pueden existir para linfocitos B o T (119, 120).

Los estudios del rearrreglo usando sondas para los genes de Ig y del R_{CT} son útiles para la detección de poblaciones clonales en procesos linfoproliferativos, y en asociación con el curso clínico, ayudan a distinguir condiciones linfoides reactivas de proliferaciones clonales malignas. El uso de estas sondas, en asociación con la inmunohistoquímica, debería permitir la asignación de muchos de los desórdenes linfoides clonales de linaje B o T, y pueden también proveer información acerca del posible estado de diferenciación del cual la clona tumoral emerge. Estas sondas moleculares son especialmente útiles para el análisis de neoplasias linfoides en el que anticuerpos monoclonales contra marcadores de superficie son incapaces de definir una población clonal. Algunos de estos desórdenes pueden ser el resultado de anomalías en células derivadas de los estadios tempranos del desarrollo de linfocitos antes de comprometerse hacia un linaje.

OBJETIVOS

- 1) **Analizar y determinar el linaje celular en muestras de linfoma por medio de sondas moleculares para los genes de inmunoglobulinas y del receptor de células T.**
- 2) **Establecer el estado de diferenciación de dichas muestras de linfoma en base al rearreglo detectado en cada una de las subunidades, y determinar si existe alguna correlación histológica.**
- 3) **Determinar las posibles alteraciones de c-myc y establecer si existe alguna translocación con las cadenas de inmunoglobulinas.**
- 4) **Investigar si existen secuencias virales del HTLV-I y del virus de EB en el genoma celular de estas muestras.**

MATERIALES Y METODOS

Pacientes.

Sesenta y tres pacientes con linfoma procedentes de cuatro hospitales diferentes de la ciudad de México fueron incluidos en el estudio. De estos 63 pacientes, 39 fueron mujeres y 24 fueron hombres con edades de 5 a 90 años. El diagnóstico histológico de las muestras fué realizado en conjunto por un grupo de patólogos utilizando la última clasificación propuesta (74). El tejido se obtuvo por medio de biopsias y se congeló a -80 °C hasta el análisis del DNA y RNA.

Aislamiento del DNA de alto peso molecular.

El DNA fué aislado de las muestras tumorales de acuerdo a métodos establecidos (121). El tejido se congeló en nitrógeno líquido y se pulverizó con un mortero. Se adicionaron 10 volúmenes de solución de lisis (10 mM Tris-Cl pH 8.0, 0.1 M EDTA, 0.5% SDS, 20 µg/ml de RNAsa pancreática) y se incubó durante 1 Hr a 37 °C. Posteriormente se adicionó Proteínasa K a una concentración final de 100 µg/ml y se incubó a 50 °C durante 18 Hr. Se realizaron extracciones con fenol, fenol-cloroformo (1:1) y cloroformo-alcohol isoamílico (24:1) para eliminar las proteínas, y el DNA se precipitó con 2.5 volúmenes de etanol absoluto. Después de colectar el precipitado con un pipeta Pasteur, con el extremo en forma de U, se lavó con etanol al 70% dos veces. El DNA se resuspendió en 10 mM Tris-Cl pH 8.0, 1 mM EDTA pH 8.0 y su concentración se

determinó mediante la lectura de la absorbancia a 260 y 280 nm.

Extracción del RNA.

El RNA se extrajo por el método de Chomczynski y Sacchi (122). El tejido se homogenizó, a temperatura ambiente, con 2 ml de solución D (4 M isotiocianato de guanidina, 25 mM de citrato de sodio pH 7.0, 0.1 M de β -mercaptoetanol, 0.5 % de sarcosyl) en un politrón. Secuencialmente se añadió 0.2 ml de 2 M acetato de sodio, pH 4.0, 2 ml de fenol (saturado con agua), y 0.4 ml de cloroformo-alcohol isoamílico (49:1), mezclando a fondo por inversión después de la adición de cada reactivo. La suspensión fue vigorosamente agitada por 10 seg y enfriada en hielo por 15 min. Las muestras fueron centrifugadas a 10000 rpm por 20 min a 4 °C. La fase acuosa fue transferida a un tubo limpio, mezclada con 2 ml de isopropanol y colocadas a -20 °C por lo menos 1 Hr para precipitar el RNA. Nuevamente se centrifugó a 10000 rpm por 20 min y la pastilla de RNA se resuspendió en 0.3 ml de solución D, y precipitada con 1 volumen de isopropanol a -20 °C durante 1 Hr. Después de centrifugar por 10 min a 4 °C en una microcentrifuga, la pastilla se lavó con etanol al 75% y el RNA se resuspendió en agua estéril (tratada con dietil pirocarbonato). Su concentración se determinó por la lectura de la absorbancia a 260 y 280 nm.

Digestión del DNA genómico y transferencia a filtros de nitrocelulosa.

Diez microgramos de DNA de alto peso molecular fue digerido usando 30 U de

diferentes enzimas de restricción (EcoRI, BamHI, HindIII, BglII, XbaI, PvuII). Los productos de la digestión fueron separados por electroforesis en geles horizontales de agarosa al 0.8%. La electroforesis se realizó durante 18 Hr a 2 volts/cm para una resolución mejor de los fragmentos de alto peso molecular. Una vez concluida la electroforesis, el gel fué tratado con 0.25 M HCl durante 15 min, para una hidrólisis parcial del DNA mejorando la transferencia de fragmentos mayores de 10 Kb. El DNA fué desnaturizado 1 Hr con una solución de 1.5 M NaCl, 0.25 M NaOH a temperatura ambiente. Posteriormente se neutralizó con 1.5 M NaCl, 1 M Tris-Cl pH 8.0 durante 1 Hr a temperatura ambiente. El DNA fué transferido a filtros de nitrocelulosa por el método de Southern (123).

Desnaturalización y transferencia del RNA.

El fraccionamiento adecuado de las moléculas de RNA fué realizado en geles de agarosa conteniendo formaldehído (124). Veinte microgramos de RNA fueron precipitados y resuspendidos en 2.4 μ l de 1X HEPES/EDTA (10X es 0.5 M HEPES pH 7.8, 0.01 M EDTA), 2 μ l de formaldehído (al 37%) y 5 μ l de formamida desionizada. Las muestras se calentaron a 70 °C por 10 min y enfriadas en hielo inmediatamente. Las muestras fueron sometidas a electroforesis en geles de agarosa al 1.2% en 1X HEPES/EDTA y 6% de formaldehído. Después de la electroforesis el gel se equilibró con 20X SSC (3 M NaCl, 0.3 M citrato de sodio) durante 1 hr a temperatura ambiente y posteriormente fueron transferido a filtros de nitrocelulosa (125).

Hibridación del DNA y RNA con sondas radiactivas.

Los filtros de DNA y RNA fueron incubados a 42 °C durante 18 hr en 50 % de formamida desionizada, 5X SSPE (20X es 3.6 M NaCl, 0.2 M fosfato de sodio pH 7.7, 0.02 M EDTA), 5X solución Denhardt (50X es 1% albúmina bovina, 1% ficoll, 1% polivinil pirrolidona), 0.1% SDS y 100 µg/ml de DNA de esperma de salmón. Los insertos purificados fueron marcados radiactivamente con ³²P por medio del método de "random primer" (126) y se adicionaron a la mezcla anterior, incubándose con los filtros por otras 18 Hr. Los filtros fueron lavados en 2X SSC, 0.1% SDS a temperatura ambiente por 15 min, en dos ocasiones, y en 0.1X SSC, 0.1% SDS a 55 °C por 30 min también en dos ocasiones. Los filtros fueron expuestos a películas de rayos X (X-OMAT K) para obtener las autorradiografías.

Aislamiento y purificación de plásmidos.

Los plásmidos se aislaron por medio de lisis alcalina (121) de la siguiente manera: una colonia de bacterias, con el plásmido de interés, se incubó en 150 ml medio Luria a 37 °C durante toda la noche. Después de centrifugar las bacterias a 5000 rpm durante 15 min a 4 °C, se resuspendió la pastilla en 10 ml de solución I (50 mM glucosa, 25 mM Tris-Cl, pH 8.0, 10 mM EDTA, pH 8.0) y 1 ml de lisosima (preparada a 10 mg/ml en 10 mM Tris-Cl, pH 8.0). Posteriormente se agregaron 20 ml de solución II (0.2 N NaOH, 1% SDS) y se mezcló suavemente incubándose a temperatura ambiente por 10 min. Quince mililitros de solución III (3 M acetato de sodio, pH 5.2) fueron adicionados y la mezcla se

incubó en hielo durante 10 min. El precipitado se centrifugó a 10000 rpm durante 30 min a 4 °C y al sobrenadante se le adicionó 0.6 volúmenes de isopropanol, incubándose durante 10 min a temperatura ambiente. Nuevamente se realizó una centrifugación a 10000 rpm durante 15 min a temperatura ambiente y la pastilla se resuspendió en 1 ml de TE (10 mM Tris-Cl pH 8.0, 1 mM EDTA pH 8.0). El plásmido fue tratado con 50 µg/ml de RNasa durante 1 Hr a 37 °C. Posteriormente se adicionó 400 µl de polietilén glicol (13% de polietilén glicol 8000, 1.6 M NaCl) para precipitar el plásmido. Esta mezcla se incubó en hielo durante 1 Hr y después se centrifugó 5 min a 4 °C en una microcentrífuga. Se eliminó el sobrenadante y la pastilla se resuspendió en TE, se realizaron extracciones con fenol, fenol-cloroformo (1:1) y cloroformo-alcohol isoamílico (24:1). El plásmido se precipitó con 2 volúmenes de etanol, y se resuspendió en TE para determinar su concentración. Los plásmidos fueron digeridos con las enzimas de restricción apropiadas para obtener los insertos, y éstos fueron aislados durante la electroforesis con membranas de DEAE-celulosa (121).

Sondas moleculares.

Varias sondas fueron utilizadas durante el análisis de los linfomas:

A) Sondas para genes de inmunoglobulinas.

i) Cadena pesada. Un fragmento de 6 Kb BamHI-HindIII de la región J (127) fue utilizado como sonda, la cual detecta un fragmento en forma germinal de 17 Kb en la digestión con BamHI y de 16 Kb en la digestión con EcoRI.

ii) Cadena ligera Kappa. Un fragmento EcoRI de 2.5 Kb de la región constante (128) fué utilizado para detectar el rearreglo en las digestiones del DNA con BamHI. Esta sonda detecta un fragmento en forma germinal de 12 Kb.

iii) Cadena ligera Lambda. La sonda consistió de un fragmento de 3.5 Kb EcoRI-HindIII de la región constante C λ 2 (129), y detecta un polimorfismo de 8, 14, 16, 18 y 21 Kb en la digestión con EcoRI.

B) Sondas para las subunidades del R α T.

i) R α T β . El rearreglo de la cadena β fué analizada con un cDNA de 300 pb BglII (64) como sonda para la región constante (C β 1 y C β 2), detectando en las digestiones con BamHI un fragmento de 24 Kb, y de 11 y 4 Kb con EcoRI en forma germinal.

ii) R α T γ . Para analizar el rearreglo de la subunidad γ se utilizó un cDNA de 1.6 Kb obtenido de linfocitos T de sangre periférica que contiene secuencias V (familia V γ 2), J, C (C γ 1) clonado en el sitio EcoRI de pUC12 (130). Esta sonda detecta en forma germinal cinco fragmentos de restricción en la digestión con BamHI.

iii) R α T δ . En el análisis de la cadena δ se utilizó un cDNA de 1.5 Kb de timocitos humanos que comprende la región C δ (66) y detecta en forma germinal un fragmento de 14 Kb con BamHI.

C) Sondas para c-myc. Un fragmento de 3.5 Kb HindIII-XbaI del primer exón (131) fué utilizado en el análisis de la región 3', primer exón/intrón de c-myc. El plásmido pRyC 7.4 que contiene el II exón (60%) y el III exón (132) se utilizó en el análisis de la expresión de myc.

D) Sondas para Virus. La presencia del genoma de los virus de Epstein-Barr y del HTLV-I fué investigado con las sondas de 2.6 Kb BstEII que contiene el fragmento oriP (133) y el fragmento de 8.25 Kb SacI que contiene el genoma completo (134), respectivamente. Como control positivo para la presencia de EB se utilizó el DNA de la línea celular Raji (135), y para HTLV-I se utilizó la línea celular HUT102 (136).

RESULTADOS

La organización de los genes de Ig, del R α T, de c-myc y la presencia de secuencias virales de Epstein-Barr y HTLV-I fué analizada en 64 muestras de linfoma de diferente tipo histológico. Dieciocho casos fueron diagnosticados histológicamente como linfomas de alto grado, 13 casos de grado intermedio y 5 casos como linfomas de bajo grado. Una serie de pacientes con micosis fungoides y otros linfomas de difícil clasificación fueron incluidos en el grupo de linfomas misceláneos (Tabla 3).

Rearreglo de genes de Inmunoglobulinas.

La detección de un rearreglo para los genes de Ig o del R α T, fué evidente por la presencia de fragmentos adicionales o la pérdida del fragmento en forma germinal, la cual fué determinada utilizando células mononucleares de sangre periférica de individuos normales o de tumores no hematológicos (por ejemplo, seminomas).

El DNA de los linfomas fué digerido con las enzimas de restricción Bam HI y Eco RI, y analizados con la sonda para cadena pesada (región J). En 34 linfomas de diferente tipo histológico se detectaron rearreglos con esta sonda, y la intensidad de los fragmentos rearreglados fué variable en cada muestra analizada. En veintún casos, se identificaron dos o más rearreglos, al parecer por rearreglar ambos cromosomas, y en trece casos únicamente se detectó un fragmento rearreglado (Tabla 4).

Al observar el patrón de rearreglo de cadena pesada en algunas muestras, éstas

mostraban un barrido de la línea germinal con rearrreglos muy tenues. Esto nos puede indicar la existencia de una pequeña fracción de células tumorales o en su defecto de un proceso reactivo. Por otro lado, en cinco casos se detectó más de dos fragmentos rearrreglados, debido posiblemente a la existencia de dos o más clonas en el mismo tumor.

Cuando no fué posible detectar rearrreglos para cadena pesada en las digestiones con Eco RI, Bam HI o Hind III, fué utilizada la enzima Bgl II. Esta enzima digiere aproximadamente 300 pb 5' de J1 y 1 Kb de J6, y podría detectar rearrreglos dentro de esta región. Con esta enzima se logró identificar rearrreglos en los linfomas L9, L11, y L22.

El análisis de las cadenas ligeras fue realizado con las sondas para la región C_k y C_λ , en las digestiones del DNA con BamHI y EcoRI, respectivamente. Cabe mencionar que la evaluación del patrón de rearrreglo en C_λ debe ser meticuloso debio al polimorfismo que presenta este locus (129, 137). En 25 muestras, que han rearrreglado previamente cadena pesada, se logró detectar rearrreglos para C_k y/o C_λ . Hay una preferencia por rearrreglar principalmente C_k (20 casos), quizás como un reflejo del orden al rearrreglar cadenas ligeras.

Así, el rearrreglo de los genes de Ig establece el origen B y el estado de diferenciación de los linfomas. Aquellos que sólo han rearrreglado cadena pesada (9 casos) representan linfomas pre-B, mientras aquellos que han rearrreglado ambas cadenas (25 casos) representan linfomas B maduros (Tabla 4). En el grupo de linfomas

pre-B existe una ligera tendencia de pacientes mayores de 50 años con histologías de alto grado e intermedio, mientras que en los linfomas B maduros se presentan en pacientes jóvenes y de edad avanzada con histologías de alto, intermedio y bajo grado.

La Figura 5 presenta algunas muestras representativas de linfomas B.

Rearreglo de las subunidades del R_cT en linfomas.

Quince muestras presentaron rearrreglos en las diferentes subunidades del R_cT (Tabla 5). De esta manera, el rearrreglo de las subunidades del R_cT en las muestras analizadas permite asignarlos como linfomas T e identifica poblaciones clonales en estos tumores. La Figura 6 muestra un panel representativo de linfomas T que han rearrreglado R_cT β , o .

- R_cT β . El DNA de los tumores fué digerido con Bam HI y Eco RI, y analizados con un cDNA que identifica ambas regiones constantes, C β 1 y C β 2. En la digestión con Bam HI se puede detectar rearrreglos que involucran cada una de las regiones C β 1 y C β 2 en un fragmento de aproximadamente 23 Kb. Esto crea alguna dificultad en la resolución de grandes fragmentos de restricción, sin embargo, este problema fué solucionado realizando la electroforesis en bajos porcentajes de agarosa y a 2 volts/cm durante 48 hr, permitiendo así detectar pequeñas diferencias en tamaño en la región de 20 Kb. Con la enzima Eco RI se genera una banda de 11 y 4 Kb. Del mapa de restricción del R_cT β la banda de 11 Kb contiene la región C β 1 mientras que la banda de 4 Kb contiene la región C β 2. En las quince muestras analizadas todas presentaron

rearrreglos para esta subunidad. En la mayoría de los linfomas el rearrreglo afecta la región C β 1, debido a que el fragmento de 11 Kb con EcoRI está alterado (Figura 6A).

En el análisis con esta sonda fué importante comparar la intensidad de las bandas en la digestión con Eco RI. En aquellas células que no son linfocitos T las bandas son de igual intensidad. Una disminución de la intensidad del fragmento de 11 Kb, puede ser debida a la presencia de poblaciones de linfocitos T policlonales los cuales han rearrreglado o deletado al azar C β 1. Otra razón para la disminución de la intensidad de la banda de 11 Kb es que hay una población clonal en la cual C β 1 ha sido deletada en un cromosoma y no han rearrreglado el otro cromosoma. Esto puede ser determinado evaluando la estructura de C β 2 con Bam HI (Figura 7B I).

Patrones similares de rearrreglo en RCT β .

El tamaño de los fragmentos rearrreglados de la subunidad β en varias muestras de linfomas son muy similares. En los casos L40, L55 y L58 fragmentos del mismo tamaño fueron detectados con dos enzimas diferentes. Con Bam HI y Eco RI los tamaños rearrreglados son de 6.4 y 6 Kb, respectivamente. Además, el L55 presenta delección del fragmento de 23 Kb y un fragmento rearrreglado de 13 Kb con Bam HI; mientras que con Eco RI hay otro fragmento de 11.5 Kb y una menor intensidad de los fragmentos germinales de 11 y 4 Kb. En el L40 además existe un fragmento de 2.3 Kb con Bam HI y disminución del fragmento germinal de 11 Kb con Eco RI (ver Figura 7B I). En los otros linfomas existen rearrreglos similares, de diferente tamaño, detectados sólo con una enzima (12 casos con Bam HI y 11 casos con Eco RI) (Tabla 6).

- R α T γ . La sonda utilizada para el análisis de ésta subunidad fué un cDNA obtenido de linfocitos de sangre periférica el cual contiene secuencias V γ 2JPC γ 1, y el patrón de rearrreglo fué determinado en las digestiones del DNA con Eco RI. Con esta sonda se pueden identificar cinco fragmentos de restricción en forma germinal, correspondientes a los tres exones de C γ 1 y a la región variable (ver Figura 6B). En 6 de 15 muestras que tienen rearrreglos en R α T β , se observó rearrreglo para esta subunidad y en el caso L8 hay delección de los fragmentos de 1.8 Kb y de 2.3 Kb.

- R α T δ . La organización de la cadena δ , en los casos en donde se pudo realizar el análisis, fué determinado mediante la digestión del DNA con Bam HI y una sonda para la región C δ . Todas las muestras mantienen su configuración en forma germinal (Tabla 5). La falta de rearrreglos en estos linfomas probablemente sea debido a la sonda empleada (ver Discusión). Sin embargo, en algunos linfomas (6 casos) la intensidad de la banda germinal fue menor al del control (Figura 6C). Esta posible delección podría ser consecuencia del rearrreglo de la cadena α , debido a su localización dentro de este locus.

Rearreglos simultáneos de genes de Ig y del R α T en linfomas.

Durante el análisis de los linfomas con las diferentes sondas para Ig y del R α T se logró identificar un grupo de ocho linfomas que presentan rearrreglos en ambos loci (Tabla 7).

En los casos L40, L66 y N6 tienen rearrreglos en P y R α T β , mientras que los

linfomas N5 y N9 mostraron rearrreglos para cadena pesada y ligera de Ig, además de rearrreglos en R α T β . Posiblemente los primeros representen linfomas inmaduros en donde coexisten rearrreglos simultáneos, mientras que los segundos representen linfomas B maduros con rearrreglos anormales en R α T β . Por otro lado, los linfomas L9, L55 y L58 han rearrreglado cadena pesada y ligera de Ig, y diferentes subunidades del R α T (Figura 7). La intensidad de las bandas rearrregladas en estos últimos casos es diferente, y posiblemente representen poblaciones celulares distintas en estos tumores. Sorprendentemente, la mayoría de los pacientes son de edad avanzada.

Linfomas con genes en línea germinal.

De los 64 casos analizados con las sondas para Ig y del R α T, sólo siete (L21, L25, L31, L54, L61, N1 y N19) muestras mantuvieron su configuración germinal con cualquiera de las sondas empleadas. Además, en ninguna se observó un barrido de la línea germinal que fuera indicativo de algún proceso reactivo. Histológicamente todas representan linfomas agresivos de alto grado e intermedio, con una gran cantidad de células neoplásicas.

Ateraciones moleculares de c-myc en linfomas.

La translocación t(8;14) es una de las más frecuentes que ocurre en los linfomas Burkitt y en linfomas difusos. En ella están involucradas algunas regiones de la cadena pesada de Ig y el gen c-myc, por lo que se decidió analizar nuestros linfomas en

búsqueda de esta translocación. En todas las muestras analizadas, excepto cinco, no se encontraron alteraciones de c-myc (por ejemplo, rearrreglo, amplificación o mutaciones).

Las muestras con alteraciones en c-myc son histológicamente de tipo Burkitt (L3, M13, M19 y M20, de pacientes menores de 15 años) y de células pequeñas con núcleo no hendido (L15, de 45 años de edad). Los casos L3 y L15 tienen rearrreglos en cadena pesada (linfomas pre-B) y en M13, M19 y M20 existen rearrreglos en ambas cadenas, siendo linfomas B maduros (Figura 8A).

El análisis de c-myc fué realizado con las enzimas Eco RI y Hind III, y una sonda para el primer exón. Estas enzimas generan fragmentos de 13 y 12 Kb que abarca los tres exones, y alteraciones que caen dentro de este gen o en la proximidad de sus extremos pueden ser detectadas. Así, en los linfomas L3, L15 y M13 se detectaron alteraciones con esta sonda (Figura 8 B). Además, en L15 el fragmento alterado de c-myc comigra con uno de los rearrreglos de la region J, indicándonos que la translocación ha ocurrido en ésta zona de la cadena pesada.

Para determinar el sitio de rompimiento en c-myc, se utilizó una serie de enzimas que se localizan en la región 5', primer exón y primer intrón. En las digestiones con Xba I y Sac I un nuevo fragmento es detectado en las muestras L15 y M13, mientras que con Pst I está en forma germinal. Por lo tanto, el rompimiento se localiza entre los sitios Sac I y Pst I del extremo 5'. En cambio, en el L3 la digestión con estas enzimas no reveló alteraciones, por lo que el rompimiento, quizás se localice en su extremo 3' (Figura 9).

En los linfomas M19 y M20 la translocación al parecer cae fuera de los sitios EcoR

I y Hind III, ya que el patrón de restricción fue similar al control (ver Figura 8B). Sin embargo, en estos linfomas se encontraron mutaciones que afectan el sitio Pvu II. Un nuevo fragmento de 1.7 Kb es detectado en ambas muestras, indicando que el sitio PvuII dentro del primer exón ha sido perdido (Figura 10). De igual manera, este tipo de alteración también fue encontrado en el caso L3. Por otro lado, en el M13 se detectó un fragmento rearreglado de 2.8 Kb. Para descartar que existe un polimorfismo de esta enzima, se analizaron varias muestras de linfoma B y T, así como neoplasias no hematológicas y controles, y en todos ellos no se encontró ningún fragmento adicional (dato no mostrado). Estas alteraciones en c-myc, tal vez, contribuyen a una desregulación en la expresión del RNAm, la cual se vio incrementada en los linfomas L15, M19 y M20 al ser analizada por medio de "Northern Blot" (ver Figura 11).

Detección de las secuencias virales de EB y HTLV-I.

La presencia del virus de EB y HTLV-I fue analizada cualitativamente por "slot Blot" en todas las muestras de linfoma. Secuencias de EB fueron detectadas en 10 linfomas B (3 pre-B y 7 B), en 3 linfomas T y en un linfoma bigenotípico, con intensidades diferentes para cada muestra, debido al número de copias presentes en cada tumor (dato no mostrado).

En ninguna de las muestras fue posible detectar secuencias de HTLV-I, sin embargo, en un paciente con SIDA (L49) se encontraron anticuerpos contra el retrovirus.

DISCUSION

El rearreglo de los genes de inmunoglobulinas o del receptor de células T es un paso obligatorio durante la diferenciación de células linfoides comprometidas hacia un linaje B o T, respectivamente. Este rearreglo en el DNA es el resultado del ensamble de genes funcionales y está asociado con cambios en su estructura que altera la configuración original, y con el uso de sondas moleculares para Ig o el RcT, se puede establecer el origen celular y estado de diferenciación de gran un número de neoplasias linfoides.

El objetivo de la presente investigación fue caracterizar a nivel molecular muestras obtenidas de pacientes con linfoma, para la identificación del tipo celular (B o T), el estado de diferenciación, y establecer una correlación entre los hallazgos moleculares e histopatológicos. Esto fué realizado utilizando sondas específicas para detectar el evento de recombinación en cadena pesada y ligera de las Ig, y para las subunidades β , γ y δ del RcT. Por otro lado, también se investigó si existían alteraciones de c-myc y la asociación de los virus EB y HTLV-I en el DNA tumoral.

En la mayoría de las muestras (53%) se detectaron rearreglos para los genes de Ig. El rearreglo en las diferentes cadenas permitió asignarlos como linfomas pre-B (9 de 34) y linfomas B maduros (25 de 34). Tanto rearreglos de cadena pesada y ligera fueron detectados en todos los tipos histológicos de linfoma, sugiriendo que incluso en los

linfomas de alto grado (por criterio histológico) son derivados de células que han madurado más allá del estado pre-B. La correlación entre los datos moleculares y el tipo histológico muestra una ligera tendencia de linfomas pre-B, con histologías de alto grado, en pacientes mayores de 50 años.

En estos linfomas B, al parecer un alto porcentaje (62%) de los tumores exhiben rearrreglos de ambos alelos de cadena pesada, detectados con la sonda J_H. Este porcentaje es considerablemente más alto al de varios reportes publicados (107, 138), sin embargo, es comparable al de sistemas murinos en donde la gran mayoría de las células B rearreglan ambos cromosomas de cadena pesada (139). Esto sugiere que el proceso del rearreglo en cadena pesada en estos linfomas es relativamente ineficiente, requiriendo dos intentos antes de que sea productivo. Por otro lado, ya que varios de los tumores muestran un sólo rearreglo en cadena pesada, perdiendo también rearrreglos en cadena ligera, es posible que en ciertos casos representen rearrreglos DJ más que rearrreglos VDJ.

Los linfomas B, al igual que otros tumores, se piensa que derivan de expansiones monoclonales de una sola célula progenitora transformada, en donde no deberían de tener más de dos configuraciones de rearreglos para los genes de Ig, es decir, un rearreglo por cada uno de los dos alelos. Sin embargo, los hallazgos de rearreglos distintos en diferentes poblaciones de células tumorales (purificadas del mismo linfoma en base a su expresión idiotípica) ha suministrado evidencia adicional que los linfomas pueden tener un origen oligoclonal, mas que monoclonal (140, 141). En general, la

oligoclonalidad puede ser sospechada de los datos del rearreglo genómico cuando dos o más rearreglos son detectados por una sola sonda, debido a que cada clona individual muestra un rearreglo característico.

Otra explicación para estos hallazgos se basa en que algunas neoplasias B sufren una hipermutación somática en los genes de Ig, que pueden alterar la expresión idiotípica dentro del tumor monoclonal y dar la apariencia de oligoclonalidad (142, 143). Todavía otra explicación para estos fenómenos, es de que clonas únicas pueden continuar sufriendo rearreglos, por ejemplo, cambios de clase, reemplazo de regiones VD previamente rearregladas por regiones V 5' (en ciertas líneas murinas pre-B), y/o simples deleciones 3' a la región J_H (144, 145), en donde afectan los sitios de restricción en o alrededor de genes de Ig rearreglados, dando lugar a bandas adicionales.

En cinco muestras de linfomas B se detectaron más de dos fragmentos rearreglados con J_H, con diferentes intensidades, lo que indicaría que más de una clona existe en el tumor. A pesar de los rearreglos en cadena pesada, no se identificaron más de dos rearreglos para cadena ligera (Tabla 4). Sin embargo, los linfomas L2 y L70, histológicamente representan una mezcla de tipos celulares (mixtos de células grandes y pequeñas), en donde posiblemente exista una población inmadura con rearreglos sólo para J_H, y otra más madura con rearreglos para ambas cadenas. En los linfomas restantes (L3, L15 y L6), la presencia del fragmento adicional es incierta. Pensar que la mutación somática es una de las causas para la presencia de bandas extras en estos linfomas, es improbable, debido a que se presenta con una mayor frecuencia en los

linfomas foliculares maduros (142, 143) y nuestras muestras representan linfomas difusos inmaduros. Alternativamente, en estos linfomas puede haber ocurrido reemplazos de sus elementos VDJ previamente rearrreglados, como sucede en los precursores pre-B de LLA (145), o que dos clonas están relacionadas a través de una célula pre-B común en las cuales han elegido un gen de cadena pesada y que todavía no eligen cadena ligera, o que definitivamente surjan de dos clonas transformadas independientemente. Una estrategia para determinar el origen del fragmento sería clonar y secuenciar los fragmentos y establecer si están o no relacionados.

Quince tumores fueron clasificados como linfomas T al tener rearrreglos en algunas de las subunidades del R α T. Rearreglos y/o deleciones para R α T β/γ fueron detectados en todas las muestras, excepto en ocho linfomas en donde sólo existen rearrreglos para R α T β . No se detectaron rearrreglos para R α T δ , sin embargo, la intensidad del fragmento germinal es menor, posiblemente debido al rrereglo que sufre la subunidad α .

Aunque estas sondas moleculares son valiosas en el establecimiento de la clonalidad, su utilidad en la definición del linaje requiere cuidadosa consideración. Por ejemplo, aunque el rearrreglo completo (VDJ) de P y R α T β son buenos indicadores de linaje B y T, respectivamente, el primer rearrreglo D y J de P y R α T β pueden encontrarse en neoplasias linfoides pertenecientes a linajes B y T, y en leucemias mieloides (146-148). Por otro lado, el rearrreglo de R α T γ/δ no es exclusivo de linaje T. Un gran número de leucemias B inmaduras, linfomas B e incluso leucemias mieloides han rearrreglado R α T γ y/o T α R δ (149-152). Estos estudios sugieren, sin embargo, que el patrón de

rearrreglos del locus γ/δ en conjunto con el rearrreglo de RCT β e Ig germinales sólo es visto en tumores linfoides con un fenotipo T.

A través del estudio de células tumorales y líneas celulares, se ha determinado el orden en el cual los genes de Ig son rearrreglados durante la diferenciación de los linfocitos B (18-20). En los linfocitos T, 4 genes sufren rearrreglo somático, y sin embargo, el orden en el cual esto sucede y la especificidad del rearrreglo en definir el linaje (principalmente con RCT γ/δ) no han sido bien establecido. En hibridomas derivados de hígado y timo fetal de ratón, rearrreglos de los genes de RCT γ fueron detectados en células de hígado así como también en el timo, aunque rearrreglos de RCT β y RCT α ocurre principalmente o exclusivamente en el timo (153). Por ello, se sugiere que rearrreglos de RCT γ ocurren en una alta frecuencia durante la diferenciación temprana de linfocitos T. Además, el análisis de las subunidades del receptor en neoplasias linfoides T apoya esta jerarquía de rearrreglos RCT $\delta > \text{RCT } \gamma \geq \text{RCT } \beta + \alpha$ (149-152), con algunas excepciones, en donde pueden haber rearrreglos sin que previamente hayan rearrreglado otras cadenas (154-156). Estos hallazgos indican que el rearrreglo de RCT γ/δ y su expresión puede no ser siempre necesaria para la diferenciación y funciones antígeno-específicas de un pequeño número de células T.

El rearrreglo de las subunidades del RCT en nuestros linfomas T no siguen totalmente el orden secuencial propuesto anteriormente. Existen rearrreglos solamente para RCT β (8 casos), rearrreglos para RCT γ/β (6 casos) y el RCT δ esta en forma germinal. Una de las razones de no haber encontrado rearrreglos de RCT γ , es que estos

linfomas hayan utilizado C γ 2 durante el proceso de recombinación, lo cual es muy común entre neoplasias de origen T (157, 158), y por lo tanto, no ser detectadas con nuestra sonda debido a que es homóloga a la región C γ 1. En cuanto a la subunidad δ , la falta de rearrreglos también es atribuible a la sonda empleada. Rearreglos de R α T δ no pueden ser detectados porque existen segmentos adicionales J entre los sitios Bam HI, J δ 3 y la región constante (159). Sin embargo, no hay que descartar la posibilidad de que estos patrones sean característicos de una población diferente de linfocitos T, y que rearrreglos preferenciales correlacionan con receptores de superficie responsables para el "homíng" a sitios específicos, con manifestaciones clinopatológicas distintas (160, 161).

Patrones similares de rearrreglo de R α T β parecen ocurrir en diferentes pacientes. Por ejemplo, en 11 casos existen rearrreglos muy similares (Tabla 6). Estos hallazgos sugieren que hay, ya sea, un repertorio limitado de posibles rearrreglos o una asociación entre el desarrollo de linfoma y patrones específicos de rearrreglo. El número limitado de patrones puede ser debido a un pequeño número de rearrreglos posibles. Esto es improbable porque en clonas funcionales de células T muestran un amplio rango de rearrreglos. Otra explicación para el limitado número de rearrreglos vistos en pacientes con linfoma es que de alguna manera la generación de rearrreglos pueden jugar un papel en el desarrollo del linfoma, en donde clonas con ciertas regiones variables son más susceptibles de sufrir transformación. Más evidencia de que rearrreglos de genes del R α T β son en efecto idénticos o de importancia en linfoma son necesarios. Esto puede ser obtenido a través del uso de otras enzimas de restricción (como en los linfomas L40, L55

y L58, Figura 7B I), el estudio de un gran número de pacientes, el aislamiento de los fragmentos rearrreglados o por medio de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para amplificar las regiones variables utilizadas por estos linfomas.

Interesantemente, en linfomas de pacientes con edad avanzada (mayores de 60 años) fueron detectados rearrreglos simultáneos de genes de Ig y del RcT. La presencia de estos rearrreglos podría evaluarse mediante la intensidad de los fragmentos detectados. Es decir, si la intensidad de las bandas rearrregladas es diferente para Ig y RcT, podrían existir dos poblaciones en el tumor. Por otro lado, si la intensidad es igual indicaría que estos rearrreglos ocurren en una población de igual tamaño. Así, el concepto de un rearrreglo de linaje mixto dentro de la misma clona de linfocitos es atractivo. En la Tabla 7 se indican las posibles poblaciones que existen en estos tumores.

De estos datos surgen algunas preguntas interesantes relacionadas a la regulación de los genes de Ig y del RcT durante los estadios tempranos de la diferenciación de los linfocitos, la fidelidad de estos eventos, reflejadas en clonas linfoides, y la posible contribución de rearrreglos inapropiados en la propia linfomagénesis. Nuestros hallazgos en células tumorales cuestionan si rearrreglos combinados de Ig y de RcT representan una consecuencia de la transformación neoplásica (que es más evidente en la vejez), o que pueden ocurrir durante la diferenciación linfóide normal. En el primero de los casos, es posible que el genotipo dual es un evento relacionado a la transformación, que se refleja en la desregulación de la maquinaria genética que controla la diferenciación en las células neoplásicas. Varios estudios demuestran que leucemias inmaduras T

frecuentemente tienen rearrreglos clonales de genes de P, y que neoplasias linfoides de linaje B (con una frecuencia mayor a las de linaje T), similarmente tienen rearrreglos clonales de R α T B y γ (149-152, 162). Así, estas neoplasias linfoides bigenóticas podrían representar ejemplos de infidelidad de linaje linfoide. Alternativamente, el genotipo dual puede ocurrir en células normales, como se ha demostrado en varios reportes donde el rearrreglo de la cadena pesada y su expresión ocurre en timocitos y linfocitos T citotóxicos (163, 164).

La explicación de los rearrreglos de linaje cruzado reside en el control del mecanismo por el cual la recombinasa y la secuencias necesarias son expuestas o disponibles. Transcritos en forma germinal de P (163) o del R α T B (165) pueden encontrarse en células linfoides normales o leucémicas de linaje inapropiado. Estos resultados indican algún grado de cromatina abierta con suficiente accesibilidad para la RNA polimerasa y a las secuencias en células linfoides en la ausencia de, o anterior a, rearrreglos detectables. Además, la configuración de la cromatina y el grado de metilación podría promover esta accesibilidad a la recombinasa rearrreglando genes de Ig y del R α T (166).

Otra posible explicación sería la existencia de dos poblaciones clonales en el tumor. Existe evidencia que clones separadas de linfocitos B y T pueden desarrollarse en los linfomas, como consecuencia de la transformación de una célula pluripotencial capaz de generar ambos linajes, o que factores externos (por ejemplo, el efecto carcinogénico de la quimioterapia o condiciones autoinmunes) pueden influir en el

desarrollo de estas clonas (167).

El mayor criterio inmunofenotípico para la definición de malignidad en los linfomas ha sido la expresión de Ig citoplásmica o de superficie por clonas B, con una restricción de un sólo tipo de cadena ligera. Además, el uso de sondas moleculares ha permitido establecer el estatus clonal en estos tumores. Sin embargo, se han descrito con cierta frecuencia linfomas malignos con genes en configuración germinal (138, 123, 168, 169). En nuestra serie de linfomas siete muestras retienen sus genes en configuración germinal. Esto podría deberse a problemas metodológicos o que los tumores tengan pocas células neoplásicas (menos del 1%) para ser detectados con las sondas. Sin embargo, nosotros hemos detectado rearrreglos clonales de Ig y RcT en 32 casos de linfomas (ver Anexo I, 170), y los tumores histológicamente tienen un gran número de células neoplásicas. Una explicación biológica sería la que asigna a los linfomas en diferentes estados de diferenciación de células B o T. Así, linfomas con genes de Ig o RcT germinales pueden representar expansiones clonales de células B muy inmaduras o células T congeladas en un estado de prerrearreglo de la diferenciación. Otra manera de discutir el genotipo nulo de los linfomas es considerar las características clínicas de tal categoría. En un reporte reciente, este tipo de linfomas agresivos inmaduros muestra un rápido crecimiento, enfermedad extensiva, afección extraganglionar y un buen pronóstico después de quimioterapia intensiva (171). Al parecer nuestro grupo de linfomas que cae en esta categoría muestra ciertas características de los linfomas antes mencionados.

Las translocaciones cromosómicas en leucemias y linfomas, frecuentemente, pero no siempre, involucran genes de Ig o del RcT. Como resultados de errores en la recombinación, una variedad de genes celulares son yuxtapuestos dentro de estos loci, con una aparente desregulación transcripcional del gen celular translocado. Varios de los genes activados codifican para proteínas del tipo helice-asa-helice (HLH). Estas proteínas comparten una secuencia característica, la cual promueve la unión al DNA y la dimerización con miembros heterólogos, jugando un papel esencial en la regulación con la unión a potenciadores de la transcripción. MYC es la proteína prototipo HLH oncogénica, y recientes reportes de su secuencia específica de unión a DNA y el aislamiento de su compañero para la dimerización apoyan un papel importante en el control transcripcional (172, 173). Por ello, las diferencias cualitativas o cuantitativas en la expresión de genes celulares seleccionados, resultan en niveles inapropiados de productos génicos comparados con células normales en estados equivalentes de diferenciación, promoviendo la progresión hacia, o la salida de, el ciclo celular.

En la translocación t(8;14), una de las más frecuentes en los linfomas Burkitt, c-myc y los genes de cadena pesada de Ig están involucrados (174). El sitio de ruptura es dentro o adyacente a c-myc, mientras que en el cromosoma 14 se localiza en en los genes de la cadena pesada en cualquiera de las regiones J o S (switch). La localización del rompimiento se ha relacionado al origen geográfico del tumor, con características fenotípicas y probablemente con la presencia o ausencia del virus de Epstein-Barr (175-177). Diferencias en los patrones de los sitios de rompimiento pueden también reflejar,

y quizás son, una consecuencia de diferencias en el estado de diferenciación de las células en los cuales la translocación ocurre.

De los linfomas analizados, cinco muestras tienen alteraciones moleculares en c-myc, sugiriendo que en ellas llevan la translocación t(8;14), aunque en dichas muestras no se realizó el cariotipo. El análisis de c-myc demuestra que los linfomas tipo Burkitt (por criterio histológico) en México, el rompimiento se localiza en el primer exón/intrón (como en el caso del L15 y M13) e involucra la región J_H (L15), o reside en su extremo 3' (como en el linfoma L3). Este tipo de translocación es la descrita para la variedad esporádica. Por otro lado, sin embargo, también existe la translocación endémica que cae fuera de c-myc (como sucede en M19 y M20). Si la heterogeneidad en el tipo de translocación de estos tumores tienen alguna relevancia en la patogénesis, falta por ser determinada. A pesar de ello, tal vez en nuestra población ciertos aspectos genéticos y socioeconómicos juegan un papel importante en la presentación de dichas translocaciones. Además, la elevada expresión de c-myc puede ser una de los múltiples factores involucrados en la patogénesis de estos tumores.

La posibilidad de que los linfomas tuvieran una etiología viral, resultó de las investigaciones realizadas por Epstein y sus colaboradores en 1964, al identificar partículas virales en células cultivadas in vitro de un paciente con un linfoma Burkitt. Además, EBV ha sido asociado con linfomas B que surgen de una variedad de estados inmunodeficientes congénitos y adquiridos (178). Aunque estos datos apoyan fuertemente la idea de que EBV está íntimamente involucrado en la patogénesis de estos linfomas,

otras observaciones sugieren que factores adicionales deben estar involucrados, y por ende, sólo sea un virus pasajero. Primero, la infección por EBV no está limitada a los lugares geográficos donde el linfoma de Burkitt es endémico, y además es un virus ubicuo que asintóticamente infecta a casi todos los adultos en el mundo entero. Segundo, se conoce que EBV es el causante de la mononucleosis infecciosa, caracterizada por una proliferación policlonal de células B infectadas, en donde una respuesta eficaz del sistema inmune es crítica para el mantenimiento y control de la infección. Finalmente, aunque EBV inmortaliza células B in vitro, éstas células no adquieren un fenotipo transformado, o forma tumores cuando son inyectados en ratones (179).

Nuestro interés sólo se enfocó en determinar la frecuencia de EBV en los tumores y que significado podrían tener dichos hallazgos. Todos los linfomas fueron analizados por medio de "slot blot", encontrando que catorce casos llevan secuencias de EBV con diferentes intensidades (en cinco de ellos la intensidad es más fuerte), debido quizás al número de copias en cada tumor. Esta baja frecuencia de EBV en los linfomas nos hace pensar en infecciones previas, y que no existe una asociación con el desarrollo de linfomas. Sería interesante investigar si en las muestras positivas para EBV, éste se encuentra en forma clonal o episomal, mediante el análisis del extremo de su forma lineal intermediaria, la cual contiene un número variable de repetidos en tandem (180), y establecer si la infección ha ocurrido antes o después del desarrollo de la expansión clonal de los linfomas, y si EBV tiene un papel importante en el desarrollo de las mismas

(181).

Una nueva familia de retrovirus humanos, los virus linfotópicos de células T humanas (HTLV), que incluye el HTLV-I, HTLV-II y VIH-1 o 2, han sido asociados con neoplasias humanas (182). El tipo I está etiológicamente unido a la leucemia/linfoma adulta de células T (LLAT) y a la paraparesis tropical espástica, y ha sido aislado frecuentemente de pacientes con SIDA. EL VIH, es el responsable del SIDA, que es una enfermedad fatal con una severa depleción de linfocitos T cooperadores, lo cual permite una variedad de infecciones oportunistas y/o neoplasias, particularmente sarcoma de Kaposi y linfomas. Ninguno de los linfomas analizados contienen secuencias de HTLV-I. Sin embargo, en una paciente con SIDA y un linfoma B, que también lleva secuencias de EBV, se encontraron anticuerpos contra HTLV-I. En el Anexo II se describe el análisis realizado en este caso.

En resumen, el análisis molecular fué llevado a cabo para evaluar y acumular más información sobre las características genotípicas de diferentes tipos de linfomas, expandiendo así nuestro conocimiento de la biología de los linfomas malignos.

CONCLUSIONES

Los rearrreglos para los genes de Ig y del RCT que fueron detectados en los linfomas, y en asociación con el curso clínico, ayudan a distinguir condiciones linfoides reactivas de proliferaciones clonales malignas. Las sondas moleculares, en asociación con la inmunohistoquímica (cuando ésta es disponible), permite la asignación del linaje B o T en un gran número de estas neoplasias, y pueden también proveer información acerca del posible estado de diferenciación del cual la clona tumoral emerge. Estos rearrreglos son especialmente útiles para el análisis de los linfomas en donde anticuerpos monoclonales contra marcadores de superficie son incapaces de definir una población clonal. Varios de estos linfomas pueden ser el resultado de anomalías en células derivadas de los estadios tempranos del desarrollo de linfocitos antes de comprometerse hacia un linaje.⁶

Así, en la mayoría de los linfomas B analizados, es necesario que sucedan dos eventos de recombinación en cadena pesada para continuar el rearrreglo en cadenas ligeras, principalmente en Kappa. Algunos linfomas B pueden ser oligoclonales, presentándose en formas inmaduras o en aquellos que representan una mezcla celular. Además, es evidente que en individuos de edad avanzada existe una tendencia de presentar linfomas pre-B y bigenotípicos, quizás como un reflejo de la actividad transformante que se incrementa más en esta etapa de la vida. Por otro lado, el tipo de translocación y la expresión elevada de c-myc, pueden ser factores adicionales

importantes en la patogénesis de un cierto tipo de linfomas B agresivos.

Si en los linfomas T hay un uso restringido de regiones variables V β 's, obviamente tienen implicaciones en el desarrollo, diagnóstico y terapia de estos tumores. Por lo que, es necesario analizar y determinar que regiones son preferencialmente utilizadas en estos linfomas T, lo que podría explicar el patrón de rearrreglos similares detectados con la sonda para R α T β .

BIBLIOGRAFIA

1. Tonegawa S. Somatic generation of antibody diversity. *Nature* 1983; 302: 575-581.
2. Kincade PW, Lee G, Pietrangeli CE, Hayashi SI, Gimble JM. Cells and molecules that regulate B lymphopoiesis in bone marrow. *Ann Rev Immunol* 1989; 7: 111-1143.
3. Kishimoto T, Yoshizaki K, Kimoto M, et al. B cell growth and differentiation factors and mechanism of B cell activation. *Immunol Rev* 1984; 78: 97-118.
4. Cooper MD. Current concepts B lymphocytes normal developmental and function. *N Engl J Med* 1987; 317: 1452-1456.
5. Smith LG, Weissman IL, Heimfeld S. Clonal analysis of hematopoietic stem cell differentiation in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; 88: 2788-2792.
6. Davidson WF, Pierce JH, Rudikoff S, Morse HC. Relationships between B cell and myeloid differentiation. Studies with a B lymphocyte progenitor line, HAFTL-1. *J Exp Med* 1988; 168: 389-407.
7. Muller-Sieburg CE, Whitlock CA, Weissman IL. Isolation of two early B lymphocytes progenitors from mouse marrow: a committed pre-pre-B cell and clonogenic thy-1^b hematopoietic stem cell. *Cell* 1986; 44: 653-662.
8. Clark EA, Ledbetter JA. Structure, function, and genetics of human B cell-associated surface molecules. *Adv Cancer Res* 1989; 52: 81-149.
9. Zola H. The surface antigens of human B lymphocytes. *Immunol Today* 1987; 8:

308-315.

10. Nadler LM. B cell/Leukemia panel workshop: summary and comments. In: Leukocyte typing II, vol. 2 Human B lymphocytes. Reinherz EL, Haynes BF, Nadler BF, Bernstein ID, ed. New York, Ny, Springer-Verlag. pp 3.
11. Graves MF, Chan LC, Furlley AJW, Watt SM, Molgaard HV. Lineage promiscuity in hematopoietic differentiation and leukemia. *Blood* 1986; 67: 1-11.
12. Locken MR, Shah VO, Dattilio KL, Civin CI. Flow cytometric analysis of human bone marrow. II. Normal B lymphocyte development. *Blood* 1987; 70: 1316-1324.
13. Uckun FM, Ledbetter JA. Immunobiologic differences between normal and leukemic human B-cell precursors. *Proc Natl Acad Sci USA* 1988; 85: 8603-8607.
14. Nemazee DA, Bürki K. Clonal deletion of B lymphocytes in a transgenic mouse bearing anti-MHC class I antibody genes. *Nature* 1989; 337: 562-566.
15. Goodnow CC, Crosbie J, Jorgensen H, Brink RA, Basten A. Induction of self-tolerance in mature peripheral B lymphocytes. *Nature* 1989; 342: 385-391.
16. Melchers F. The many roles of immunoglobulin molecules in the development and growth control of the B-lymphocyte lineage. In: Immunoglobulin genes. Honjo T, Alt FW, and Rabbits TM, eds. New York, Ny, Academic Press, pp. 23-44.
17. Alt FW, Blackwell TK, Yancopoulos GD. Development of the primary antibody repertoire. *Science* 1987; 238: 1079-1087.
18. Alt FW, Yancopoulos GD, Blackwell TK, et al. Ordered rearrangement of immunoglobulin heavy chain variable region segments. *EMBO J* 1984; 3: 1209-

1213.

19. Korsmeyer SJ, Hieter PA, Ravetch JV, Poplack DG, Waldmann TA, Leder P. Developmental hierarchy of immunoglobulin gene rearrangements in human leukemic pre-B-cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1981; 78: 7096-7100.
20. Korsmeyer SJ, Arnold A, Bakhshi A, et al. Immunoglobulin gene rearrangement and cell surface antigen expression in acute lymphocytic leukemias of T cell and B cell precursor origins. *J Clin Invest* 1983; 71: 301-313.
21. Yancopoulos GD, Alt FW. Developmentally controlled and tissue-specific expression of unrearranged V_H gene segments. *Cell* 1985; 40: 271-281.
22. Rathbun G, Berman J, Yancopoulos C, Alt FW. Organization and expression of the mammalian heavy-chain variable region locus. In: *Immunoglobulin genes*. Honjo T, Alt FW, and Rabbits TM, eds. New York, NY, Academic Press, pp. 63-90.
23. Alt FW, Baltimore D. Joining of immunoglobulin heavy chain gene segments: implications from a chromosome with evidence of three D- J_H fusions. *Proc Natl Acad Sci USA* 1982; 79: 4118-4122.
24. Schatz DG, Oettinger MA, Baltimore D. The V(D)J recombination activating gene, RAG-1. *Cell* 1989; 59: 1035-1048.
25. Oettinger MA, Schatz DG, Gorka C, Baltimore D. RAG-1 and RAG-2, adjacent genes that synergistically activate V(D)J recombination. *Science* 1990; 248: 1517-1523.
26. Turka LA, Schatz DG, Oettinger MA, et al. Thymocyte expression of RAG-1 and

- RAG-2: termination by T cell receptor cross-linking. *Science* 1991; 253: 778-781.
27. Landau NR, Schatz DG, Rosa M, Baltimore D. Increased frequency of N-region insertion in a murine pre-B-cell line infected with a terminal deoxynucleotidyl transferase retroviral expression vector. *Mol Cell Biol* 1987; 7: 3237-3243.
 28. Kim S, Davis M, Sinn E, Patten P, Hood L. Antibody diversity: somatic hypermutation of rearranged V_H genes. *Cell* 1981; 27: 573-581.
 29. Allison JP, Lanier LL. Structure, function, and serology of the T-cell antigen receptor complex. *Ann Rev Immunol* 1987; 5: 503-540.
 30. Brenner MB, Strominger JL, Krangel MS. The $\gamma\delta$ T cell receptor. *Adv Immunol* 1988; 43: 133-175.
 31. Clevers H, Alarcon B, Wileman T, Terhorst C. The T cell receptor/CD3 complex: a dynamic protein ensemble. *Ann Rev Immunol* 1988; 6: 629-662.
 32. Bjorkman PJ, Saper MA, Samraoui B, Bennett WS, Strominger JL, Wiley DC. The foreign antigen binding site and T cell recognition regions of class I histocompatibility antigens. *Nature* 1987; 329: 512-518.
 33. Littman DR. The structure of CD4 and CD8 genes. *Ann Rev Immunol* 1987; 5: 561-584.
 34. Gabert J, Langlet C, Zamoyska R, Parnes JR, Schmitt-Verhulst AM, Malissen B. Reconstitution of MHC Class I specificity by transfer of the T cell receptor and L γ -2 genes. *Cell* 1987; 50: 545-554.
 35. Dembic Z, Haas W, Weiss S, et al. Transfer of specificity by murine α and β T-cell

- receptor genes. *Nature* 1986; 320: 232-238.
36. Stingl G, Gunter KC, Tschachler E, et al. Thy-1⁺ dendritic epidermal cells belong to the T-cell lineage. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987; 84: 2430-2437.
 37. Moingeon P, Jitsukawa S, Faure F, et al. A γ -cadin complex forms a functional receptor on cloned human lymphocytes with natural killer-like activity. *Nature* 1987; 325: 723-726.
 38. Howe RC, Lowenthal JW, MacDonald HR. Role of interleukin 1 in early T cell development: LyT-2⁺L3T4⁺ thymocytes bind and respond in vitro. *J Immunol* 1986; 137: 3195-3200.
 39. Scollay R, Bartlett P, Shortman K. T cell development in the adult murine thymus: changes in the expression of the surface antigens Ly2, L3T4 and B2A2 during development from early precursor cells to emigrants. *Immunol Rev* 1984; 82: 79-103.
 40. Fowkes BJ, Pardoll DM. Molecular and cellular events of T cell development. *Adv Immunol* 1989; 44: 207-264.
 41. von Boehmer H. The developmental biology of T lymphocytes. *Ann Rev Immunol* 1988; 6: 309-326.
 42. Pardoll DM, Fowkes BJ, Bluestone JA, et al. Differential expression of two distinct T-cell receptors during thymocyte development. *Nature* 1987; 326: 79-81.
 43. Winoto A, Baltimore D. Separate lineages of T cells expressing the $\alpha\beta$ and $\gamma\delta$ receptors. *Nature* 1989; 338: 430-432.

44. Ferrini S, Bottino C, Blassoni R, et al. Characterization of CD3⁺CD4⁺CD8⁻ clones expressing the putative T cell receptor gene product. Analysis of the activation pathway leading to interleukin 2 production and triggering of the lytic machinery. *J Exp Med* 1987; 166: 277-282.
45. Guidos CJ, Weissman IL, Adkins B. Intrathymic maturation of murine T lymphocytes from CD8⁺ precursors. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989; 86: 7542-7546.
46. Groh V, Porcelli S, Fabbi M, et al. Human lymphocytes bearing T cell receptor / are phenotypically diverse and evenly distributed throughout the lymphoid system. *J exp Med* 1989; 169: 1277-1294.
47. Scollary RG, Butcher EC, Weissman IL. Thymus cell migration quantitative aspects of cellular traffic from the thymus to the periphery. *Eur J Immunol* 1980; 10: 210-218.
48. Smith CAA, Williams GT, Kingston R, Jenkinson EJ, Owen JJT. Antibodies to CD3/T-cell receptor complex induce death by apoptosis in immature T cells in thymic cultures. *Nature* 1989; 337: 181-184.
49. Sha WC, Nelson CA, Newberry RD, Kranz DM, Russell JH, Loh DY. Positive and negative selection of an antigen receptor on T cells in transgenic mice. *Nature* 1988; 336: 73-76.
50. Hengartner H, Odermatt B, Schneider R, et al. Deletion of self-reactive T cells before entry into the thymus medulla. *Nature* 1988; 336: 388-390.
51. Kisielow P, Bluthmann H, Staerz UD, Steinmetz M, von Boehmer H. Tolerance in

- T-cell-receptor transgenic mice involves deletion of nonmature CD4⁺8⁺ thymocytes. *Nature* 1988; 333: 742-746.
52. Kappler JW, Roehm N, Marrack P. T cell tolerance by clonal elimination in the thymus. *Cell* 1987; 49: 273-280.
 53. MacDonal HR, Schneider R, Lees RK, et al. T-cell receptor V β use predicts reactivity and tolerance to Mis^s-encoded antigens. *Nature* 1988; 332: 40-45.
 54. Ramsdell F, Lantz T, Fowikes BJ. A nondeletional mechanism of thymic self tolerance. *Science* 1989; 246: 1038-1041.
 55. Roberts JL, Sharrow SO, Singer A. Clonal deletion and clonal anergy in the thymus induced by cellular elements with different radiation sensitivities. *J Exp Med* 1990; 171: 935-940.
 56. Kisielow P, Teh HS, Blüthmann H, von Boehmer H. Positive selection of antigen-specific T cells in thymus by restricting MHC molecules. *Nature* 1988; 335: 730-733.
 57. Berg LJ, Pullen AM, Fazekas de St. Groth B, Mathis D, Benoist C, Davis MM. Antigen/MHC-specific T cells are preferentially exported from the thymus in the presence of their MHC ligand. *Cell* 1989; 58: 1035-1048.
 58. Kaye J, Hsu ML, Sauron ME, Jameson SC, Gascoigne NRJ, Hedrick SM. Selective development of CD4⁺ T cells in transgenic mice expressing a class II MHC-restricted antigen receptor. *Nature* 1989; 341: 746-749.
 59. Zinkernagel RM, Callahan GN, Althage A, Cooper S, Klein PA, Klein J. On the

- thymus in the differentiation of "H-2 self-recognition" by T cells: evidence for dual recognition? *J Exp Med* 1978; 147: 882-896.
60. Jones LA, Chin LT, Longo DL, Kruisbeek AM. Peripheral clonal elimination of functional T cells. *Science* 1990; 250: 1726-1729.
 61. Rocha B, von Boehmer H. Peripheral selection of the T cell repertoire. *Science* 1991; 251: 1225-1228.
 62. Yancopoulos GD, Blackwell TK, Suh H, Hood L, Alt FW. Introduced T cell receptor variable region segments recombine in pre-B cell: evidence that B and T cells use a common recombinase. *Cell* 1986; 44: 251-259.
 63. Toyonaga B, Mak TW. Genes of the T-cell antigen receptor in normal and malignant T cells. *Ann Rev Immunol* 1987; 5: 585-620.
 64. Yoshikai Y, Anatoniou D, Clark SP, et al. Sequence and expression of transcripts of the human T-cell receptor β -chain genes. *Nature* 1984; 312: 521-524.
 65. Hayday AC, Saito G, Gillies SD, et al. Structure, organization and somatic rearrangement of T cell gamma genes. *Cell* 1985; 40: 259-269.
 66. Takihara Y, Champagne E, Griesser H, et al. Sequence and organization of the human T cell δ chain gene. *Eur J Immunol* 1988; 18: 283-287.
 67. Hata S, Brenner MB, Krangel MS. Identification of putative δ human T cell receptor complementary DNA clones. *Science* 1987; 238: 678-682.
 68. Chien Y, Wettstein D, Kaplan K, Elliot JF, Born W, Davis MM. T cell receptors gene rearrangements in early thymocytes. *Nature* 1987; 330: 722-727.

69. Magrath I. Lymphocyte ontogeny: a conceptual basis for understanding neoplasia of the immune system. In: Magrath IT. The non-Hodgkin's lymphomas. Baltimore: Williams & Wilkins, 1990: 29-48.
70. Freeman C, Berg JW, Culter SJ. Occurrence and prognosis of extranodal lymphomas. *Cancer* 1972; 29: 252-260.
71. Penn I. Tumors of the immunocompromised patient. *Ann Rev Med* 1988; 39: 63-73.
72. Lennert K, Mohri N, Stein H, et al. The histopathology of malignant lymphoma. *Br J Hematol* 1975; 31 (suppl): 193-203.
73. Lukes RJ, Collins RD. Immununologic characterization of human malignant lymphomas. *Cancer* 1974: 1488-1503.
74. Rosenberg SA, Berard CW, Brown BN, et al. National Cancer Institute sponsored study of classifications of non-Hodgkin's lymphomas: Summary and description of a working formulation for clinical usage. The non-Hodgking's lymphoma pathologic calssification project. *Cancer* 1982; 49: 2112-2135.
75. van Krieken JHJM, Otter R, Hermans J, et al. Malignant lymphoma of the gastrointestinal trac and mesentery. A clinico-pathologic study of the significance of histologic classification. *Am J Pathol* 1989; 135: 281-289.
76. Carbone PP, Kaplan HS, Musshoff K, Smithers DW, Tubiana M. Report of the committee on Hodgkin's disease staging classification. *Cancer Res* 1971; 31: 1860-1861.

77. Bunn PA, Lamberg SI. Report of the committee on staging and classification of cutaneous T-cell lymphomas. *Cancer Treat Rep* 1979; 63: 725-728.
78. Khoury MB, Godwin JD, Halvorsen R, et al. Role of the CT in non-Hodgkin lymphoma. *Radiology* 1986; 158: 659-662.
79. Paryani SB, Hoppe RT, Cox RS, Colby TV, Rosenberg SA, Kaplan HS. Analysis of non-Hodgkin's lymphoma with nodular and favorable histologies, stages I and II. *Cancer* 1983; 52: 2300-2307.
80. Horning SJ, Rosenberg SA. The natural history of initially untreated low-grade non-Hodgkin's lymphoma. *N Engl J Med* 1984; 311: 1471-1475.
81. Hubbard SM, Chabner BA, DeVita VT, et al. Histologic progression in non-Hodgkin's lymphoma. *Blood* 1982; 59: 258-264.
82. Young RC, Longo DL, Glatstein E, Ihde DC, Jaffe ES, DeVita VT. The treatment of indolent lymphomas: Watchful waiting V aggressive combined modality treatment. *Semin Hematol* 1988; 25 (suppl 2): 11-16.
83. Meeker TC, Lowder J, Maloney DG, et al. A clinical trial of anti-idiotypic therapy of B-cell malignancy. *Blood* 1985; 65: 1349-1363.
84. Portlock CS. Alpha interferon and non-Hodgkin's lymphomas. *Curr Concepts Oncol* 1987; 9: 2-6.
85. Allison MA, Jones SE. Phase I-II trial of out-patient interleukin-2 (IL-2) and malignant lymphoma and chronic lymphocytic leukemia (Abstr). *Blood* 1987; 79 (suppl 1): 242.

86. Bernstein JI, Coleman CN, Strickler JG, Dorfman RF, Rosenberg SA. Combined modality therapy for adults with small noncleaved cell lymphoma (Burkitt's and non-Burkitt's types). *J Clin Oncol* 1986; 4: 847-858.
87. DeVita VT, Hubbard SM, Young RC, Longo DL. The role of chemotherapy in diffuse aggressive lymphomas. *Semin Hematol* 1988; 25 (Suppl 2): 2-10.
88. Connors JM, Klimo P. MACOP-B chemotherapy for malignant lymphomas and related conditions: 1987 update and additional observations. *Semin Hematol* 1988; 25 (Suppl 2): 41-46.
89. Gulati SC, Shank B, Black P, et al. Autologous bone marrow transplantation for patients with poor-prognosis lymphoma. *J Clin Oncol* 1988; 6: 1303-1313.
90. Epstein MA, Achong BG. The Epstein-Barr virus: recent advances. William Heinemann Books, London 1987.
91. Hanto DW, Gajl-Peczalska KJ, Frizzera G, et al. Epstein-Barr virus (EBV) induced polyclonal and monoclonal B-cell lymphoproliferative diseases occurring after renal transplantation. Clinical, pathologic, and virologic findings and implications for therapy. *Ann Surg* 1983; 198: 356-369.
92. Haluska FG, Russo G, Kant J, Andreef M, Croce CM. Molecular resemblance of an AIDS-associated lymphoma and endemic Burkitt lymphomas: implications for their pathogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989; 86: 8907-8911.
93. Weiss LM, Movahed LA, Warnke RA, Sklar J. Detection of Epstein-Barr viral genomes in Reed-Stenberg cells of Hodgkin's disease. *N Engl J Med* 1989; 320:

502-506.

94. Richel DJ, Lepoutre JM, Kapsenberg JG, et al. Epstein-Barr virus in a CD8-positive T-cell Lymphoma. *Am J Pathol* 1990; 136: 1093-1099.
95. Levine PH, Blattner WA, Clark J, et al. Geographic distribution of HTLV-I and identification of a new high-risk population. *Int J Cancer* 1988; 42: 7-12.
96. Yip MT, Chen ISY. Modes of transformation by the human T-cell leukemia viruses. *Mol Biol Med* 1990; 7: 33-44.
97. Broder S. T-cell lymphoproliferative syndrome associated with human T-cell leukemia/lymphoma virus. *Ann Intern Med* 1984; 100: 543-557.
98. Shimoyama M, Ota K, Kikuchi M, et al. Major prognostic factors of adult patients with advanced T-cell lymphomas/leukemia. *J Clin Oncol* 1988; 6: 1088-1097.
99. Knowles DM, Chamulak GA, Subar M, et al. Lymphoid neoplasia associated with Acquired Immunodeficiency Syndrome (AIDS): The New York University Medical Center experience with 105 patients (1981-1986). *Ann Intern Med* 1988; 108: 744-753.
100. Pelicci PG, Knowles DM, Arlin Z, et al. Multiple monoclonal B cell expansions and c-myc oncogene rearrangements in Acquired Immunodeficiency Syndrome-related lymphoproliferative disorders. Implications for lymphomagenesis. *J Exp Med* 1986; 164: 2049-2060.
101. Petersen JM, Tubbs RR, Savage RA, et al. Small noncleaved B cell Burkitt-like lymphoma with chromosome t(8;14) translocation and Epstein-Barr virus nuclear-

- associated antigen in a homosexual man with Acquired Immune Deficiency Syndrome. *Am J Med* 1985; 78: 141-148.
102. Groopman JE, Sullivan JL, Mulder C, et al. Pathogenesis of B cell lymphoma in a patient with AIDS. *Blood* 1986; 67: 612-615.
 103. Ziegler JL, Beckstead JA, Volberding PA, et al. Non-Hodgkin's lymphoma in 90 homosexual men. Relation to generalized lymphadenopathy and the Acquired Immunodeficiency Syndrome. *N Engl J Med* 1984; 311: 565-570.
 104. Kater SP, Riggs SA, Cabanillas F, et al. Aggressive non-Hodgkin's lymphomas in immunocompromised homosexual males. *Blood* 1985; 66: 655-659.
 105. Foon KA, Todd RF. Immunologic classification of leukemia and lymphoma. *Blood* 1986; 68: 1-31.
 106. Jaffe ES. The role of immunophenotypic markers in the classification of non-Hodgkin's lymphomas. *Sem Oncol* 1990; 17: 11-19.
 107. Arnold A, Cossman J, Bakhshi A, Jaffe ES, Waldmann TA, Korsmeyer SJ. Immunoglobulin-gene rearrangements as unique clonal markers in human lymphoid neoplasms. *N Engl J Med* 1983; 309: 1593-1599.
 108. Cleary ML, Chao J, Warnke R, Sklar J. Immunoglobulin gene rearrangement as a diagnostic criterion of B-cell lymphoma. *Proc Natl Acad Sci USA* 1984; 81: 593-597.
 109. Waldmann TA, Davis MM, Bongiovanni KF, Korsmeyer SJ. Rearrangements of genes for the antigen receptor on T cells as markers of lineage and clonality in

- human lymphoid neoplasms. *N Engl J Med* 1985; 313: 776-783.
110. Minden MD, Toyonaga B, Ha K, et al. Somatic rearrangement of T-cell antigen receptor gene in human T-cell malignancies. *Proc Natl Acad Sci USA* 1985; 82: 1224-1227.
 111. Flug F, Pelicci PG, Bonetti F, Knowles DM, Dalla-Favera R. T-cell receptor gene rearrangements as markers of lineage and clonality in T-cell neoplasms. *Proc Natl Acad Sci USA* 1985; 82: 3460-3464.
 112. Le Beau MM. Chromosomal abnormalities in non-Hodgkin's lymphomas. *Sem Oncol* 1990; 17: 20-29.
 113. Taub R, Kirsch I, Morton C, et al. Translocation of the c-myc gene into the immunoglobulin heavy chain locus in human Burkitt lymphoma and murine plasmacytoma cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1982; 79: 7837-7841.
 114. Weiss LM, Warnke RA, Sklar J, Cleary ML. Molecular analysis of the t(14;18) chromosomal translocation in malignant lymphomas. *N Engl J Med* 1987; 317: 1185-1189.
 115. Williams ME, Frierson HF, Tabbarah S, Ennis PS. Fine-needle aspiration of Non-Hodgkin's lymphoma. Southern blot analysis for antigen receptor, bcl-2, and c-myc gene rearrangements. *Am J Clin Pathol* 1990; 93: 754-759.
 116. Suchi T, Lennert K, Tu LY, et al. Histopathology and immunocytochemistry of peripheral T cell lymphomas: a proposal for their classification. *J Clin Pathol* 1987; 40: 995-999.

117. **Horning SJ, Galili N, Cleary M, Sklar J.** Detection of non-Hodgkin's lymphoma in the peripheral blood by analysis of antigen receptor gene rearrangements: results of a prospective study. *Blood* 1990; 75: 1139-1145.
118. **Trainor KJ, Brisco MJ, Story CJ, Morley AA.** Monoclonality in B-lymphoproliferative disorders detected at the DNA level. *Blood* 1990; 75: 2220-2222.
119. **Berliner N, Duby AD, Linch DC, et al.** T cell receptor gene rearrangements define a monoclonal T cell proliferation in patients with T cell lymphocytosis and cytopenia. *Blood* 1986; 67: 914-918.
120. **Fishleder A, Tubbs R, Hesse B, Levine H.** Uniform detection of immunoglobulin-gene rearrangement in benign lymphoepithelial lesions. *N Engl J Med* 1987; 316: 1118-1121.
121. **Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T.** *Molecular cloning. A laboratory manual. Second edition.* Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
122. **Chomczynski P, Sacchi N.** Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 1987; 162: 156-159.
123. **Southern EM.** Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J Mol Biol* 1975; 98: 503-517.
124. **Lehrach H, Diamond D, Wozney JM, Boedtker H.** RNA molecular weight determinations by gel electrophoresis under denaturing conditions, a critical reexamination. *Biochem* 1977; 16: 4743-4751.

125. Thomas PS. Hybridization of denatured RNA and small DNA fragments transferred to nitrocellulose. *Proc Natl Acad Sci USA* 1980; 77: 5201-5205.
126. Feinberg AP, Vogelstein BA. A technique for radiolabelling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Anal Biochem* 1983; 132: 6-13.
127. Ravetch JV, Siebenlist U, Korsmeyer SJ, Waldmann TA, Leder P. Structure of the human immunoglobulin μ locus: Characterization of embryonic and rearranged J and D genes. *Cell* 1981; 27: 583-591.
128. Hieter PA, Maizel JV, Leder P. Evolution of human immunoglobulin κ J region genes. *J Biol Chem* 1982; 257: 1516-1522.
129. Hieter PA, Hollis GF, Korsmeyer SJ, Waldmann TA, Leder P. Clustered arrangement of immunoglobulin λ constant region genes in man. *Nature* 1981; 294: 536-540.
130. Yoshikai Y, Toyonaga B, Koga Y, Kimura N, Griesser H, Mak TW. Repertoire of the human T cell gamma genes: High frequency of nonfunctional transcripts in thymus and mature T cells. *Eur J Immunol* 1987; 17: 119-126.
131. Gazin C, Dupont de Dinechin S, Hampe A, et al. Nucleotide sequence of the human c-myc locus: productive open reading frame within the first exon. *EMBO J* 1984; 3: 383-387.
132. Marcu KB, Harris LJ, Stanton LW, Erikson J, Watt R, Croce CM. Transcriptionally active c-myc oncogene is contained within NIARD, a DNA sequence associated with chromosome translocations in B-cell neoplasia. *Proc Natl Acad Sci USA*

1983; 80: 519-523.

133. Sugden B, Marsh K, Yates J. A vector that replicates as a plasmid and can be efficiently selected in B-lymphoblasts transformed by Epstein-Barr Virus. *Mol Cell Biol* 1985; 5: 410-413.
134. Manzari V, Wong-Staal F, Franchini G, et al. Human T-cell leukemia-lymphoma virus (HTLV): cloning of an integrated defective provirus and flanking cellular sequences. *Proc Natl Acad Sci USA* 1983; 80: 1574-1578.
135. Pulvertaft RJV. A study of malignant tumors in Nigeria by short-term tissue culture. *J Clin Pathol* 1965; 18: 261-271.
136. Poiz BJ, Ruscetti FW, Gazdar AF, Bunn PA, Minna JD, Gallo RC. Detection and isolation of type C retrovirus particles from fresh and cultured lymphocytes of a patient with cutaneous T-cell lymphoma. *Proc Natl Acad Sci USA* 1980; 77: 7415-7419.
137. Taub RA, Hollis GF, Hieter PA, Korsmeyer S, Waldmann TA, Leder P. Variable amplification of immunoglobulin light-chain genes in human populations. *Nature* 1983; 304: 172-174.
138. Williams ME, Innes DJ, Borowitz J, et al. Immunoglobulin and T cell receptor gene rearrangements in human lymphoma and leukemia. *Blood* 1987; 69: 79-86.
139. Alt F, Rosenberg N, Lewis S, Thomas E, Baltimore D. Organization and reorganization of immunoglobulin genes in A-MuLV transformed cells: Rearrangement of heavy but not light chain genes. *Cell* 1981; 27: 381-390.

140. Sklar J, Cleary ML, Thielemans K, Gralow J, Warnke R, Levy R. Biclonal B-cell lymphoma. *N Engl J Med* 1984; 311: 20-27.
141. Siegelman MH, Cleary ML, Warnke R, Sklar J. Frequent biconality and Ig gene alterations among B cell lymphomas that show multiple histologic forms. *J Exp Med* 1985; 161: 850-863.
142. Cleary ML, Meeker TC, Levy S, et al. Clustering of extensive somatic mutations in the variable region of an immunoglobulin heavy chain gene from a human B cell lymphoma. *Cell* 1986; 44: 97-106.
143. Cleary ML, Galili N, Treia M, Levy R, Sklar J. Single cell origin of bigenotypic and biphenotypic B cell proliferations in human follicular lymphomas. *J Exp Med* 1988; 167: 582-597.
144. Reth M, Gehmann P, Petrac E, Wiese P. A novel V_H to V_HDJ_H joining mechanism in heavy-chain-negative (null) pre-B cells results in heavy-chain production. *Nature* 1986; 322: 840-842.
145. Bird J, Galili N, Link M, Stites D, Sklar J. Continuing rearrangement but absence of somatic hypermutation in immunoglobulin genes of human B cell precursor leukemia. *J Exp Med* 1988; 168: 229-245.
146. Pelicci PG, Knowles DM, Dalla-Favera R. Lymphoid tumors displaying rearrangements of both immunoglobulin and T cell receptor genes. *J Exp Med* 1985; 162: 1015-1024.
147. Cheng GY, Minden MD, Toyonaga B, Mak TW, McCulloch EA. T cell receptor and

- Immunoglobulin gene rearrangements in acute myeloblastic leukemia. *J Exp Med* 1986; 163: 414-424.
148. Seremetis SV, Pelicci PG, Tabilio A, et al. High frequency of clonal immunoglobulin or T cell gene receptor rearrangements in acute myelogenous leukemia expressing terminal deoxiribonucleotidyltransferase. *J Exp Med* 1987; 165: 1703-1712.
149. Griesser H, Feller A, Lennart K, et al. The structure of the T cell gamma chain gene in lymphoproliferative disorders and lymphoma cell lines. *Blood* 1986; 68: 592-594.
150. Goorha R, Bunin N, Mirro J, et al. Provocative pattern of rearrangements of the genes for the γ and β chains of the T-cell receptor in human leukemias. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987; 84: 4547-4551.
151. Kimura N, Takihara Y, Akiyoshi T, et al. Rearrangement of T-cell receptor δ chain gene as a marker of lineage and clonality in T-cell lymphoproliferative disorders. *Cancer Res* 1989; 49: 4488-4492.
152. Dyer MJ. T-cell receptor δ/α rearrangements in lymphoid neoplasms. *Blood* 1989; 74: 1073-1083.
153. Haars R, Kronenberg M, Gallatin WM, Weissman IL, Owen FL, Hood L. Rearrangement and expression of T cell antigen receptor and γ genes during thymic development. *J Exp Med* 1986; 164: 1-24.
154. Asou N, Matsuoka M, Hattori T, et al. T cell γ gene rearrangements in hematologic neoplasms. *Blood* 1987; 69: 968-970.

155. Tkachuk DC, Griesser H, Takihara Y, et al. Rearrangement of T-cell δ locus in lymphoproliferative disorders. *Blood* 1988; 72: 353-357.
156. Ho VC, Hansen ER, Elder JT, et al. T cell receptor δ -chain gene rearrangement without γ -chain gene rearrangement in cutaneous T cell lymphoma: an unusual finding. *Clin Immunol Immunopathol* 1990; 54: 354-360.
157. Furley AJ, Chan LC, Mizutani S, et al. Lineage specificity of rearrangement and expression of genes encoding the T cell receptor CD3 complex and immunoglobulin heavy chain in leukaemia. *Leukaemia* 1987; 1: 644-650.
158. Boehm TLJ, Werle A, Gasner A, Kornhuber B, Drahovsky D. T cell receptor γ chain variable gene rearrangement in acute lymphoblastic leukaemias of T and B cell lineage. *Eur J Immunol* 1987; 17: 1593-1597.
159. Takihara Y, Tkachuk D, Michalopoulos E, et al. Sequence and organization of the diversity, joining, and constant region genes of the human T-cell δ chain locus. *Proc Natl Acad Sci USA* 1988; 85: 6097-6101.
160. Gualard P, Bourqueiot P, Kanavaros P, et al. Expression of the Alpha/Beta and Gamma/Delta T-cell receptors in 57 cases of peripheral T-cell lymphomas. Identification of a subset of $\gamma\delta$ T-cell lymphomas. *Am J Pathol* 1990; 137: 617-628.
161. Farcet JP, Gualard P, Marolleau JP, et al. Hepatosplenic T-cell lymphoma: sinusal/sinusoidal localization of malignant cells expressing the T-cell receptor $\gamma\delta$. *Blood* 1990; 75: 2213-2219.
162. Davey MP, Bongiovanni KF, Kaulfersch W, et al. Immunoglobulin and T-cell

- receptor gene rearrangement and expression in human lymphoid leukemia cells at different stages of maturation. *Proc Natl Aca Sci USA* 1986; 83: 8759-8763.
163. Kemp DJ, Wilson A, Harris AW, Shortman K. The immunoglobulin μ constant region gene is expressed in mouse thymocytes. *Nature* 1980; 286: 168-170.
164. Kurosawa Y, von Boehner H, Haas W, Sakano H, Trauneker A, Tonegawa S. Identification of D segments of immunoglobulin heavy-chain genes and their rearrangement in T lymphocytes. *Nature* 1981; 290: 565-570.
165. Calman AF, Peterlin BM. Expression of T cell receptor genes in human B cells. *J Exp Med* 1986; 164: 1940-1957.
166. Tauchi T, Ohyashiki JH, Ohyashiki K, et al. Methylation status of T-cell receptor β -chain gene in B precursor acute lymphoblastic leukemia: correlation with hypomethylation and gene rearrangement. *Cancer Res* 1991; 51: 2917-2921.
167. Hu E, Weiss LM, Warnke R, Sklar J. Non-Hodgkin's lymphoma containing both B and T cell clones. *Blood* 1987; 70: 287-292.
168. Henni T, Gaulard P, Devine M, et al. Comparison of genetic probe with immunophenotype analysis in lymphoproliferative disorders: A study of 87 cases. *Blood* 1988; 72: 1937-1943.
169. Weiss LM, Picker LJ, Grogan TM, Warnke RA, Sklar J. Absence of clonal beta and gamma T-cell receptor gene rearrangements in a subset of peripheral T-cell lymphomas. *Am J Pathol* 1988; 130: 436-442.
170. Ortega V, Verástegui E, Meneses A, et al. Clinical, histological and genetic

- characterization of non-Hodgkin's lymphomas in mexicans. *Rev Invest Clin* 1992; 44: 203-214.
171. Kneba M, Bolz I, Bergholz M, et al. Clinical characteristics of high-grade lymphomas with immune genes in germinal configuration. *Cancer* 1991; 67: 603-609.
172. Blackwell TK, Kretzner L, Blackwood EM, Eisenman RN, Weintraub H. Sequence-specific DNA binding by the c-Myc protein. *Science* 1990; 250: 1149-1151.
173. Blackwood EM, Eisenman RN. Max: a helix-loop-helix zipper protein that forms a sequence-specific DNA-binding complex with Myc. *Science* 1991; 251: 1211-1217.
174. Magrath I. The pathogenesis of Burkitt's lymphoma. *Adv Cancer Res* 1990; 53: 133-168.
175. Pelicci PG, Knowles DM, Magrath I, Dalla-Favera R. Chromosomal breakpoints and structural alterations of the c-myc locus differ in endemic and sporadic forms of Burkitt lymphoma. *Proc Natl Acad Sci USA* 1986; 83: 2984-2988.
176. Neri A, Barriga F, Knowles DM, Magrath IT, Dalla-Favera R. Different regions of the immunoglobulin heavy-chain locus are involved in chromosomal translocations in distinct pathogenic forms of Burkitt lymphoma. *Proc Natl Acad Sci USA* 1988; 85: 2748-2752.
177. Shiramizu B, Barriga F, Neequaye J, et al. Patterns of chromosomal breakpoint locations in Burkitt's lymphoma: relevance to Geography and Epstein-Barr virus association. *Blood* 1991; 77: 1516-1526.

178. Hanto DW, Frizzera G, Gail-Peczalska KJ, Simmons RL. Epstein-Barr virus, immunodeficiency, and B-cell proliferation. *Transplantation* 1985; 39: 461-467.
179. Klein G. Viral latency and transformation: the strategy of Epstein-Barr Virus. *Cell* 1989; 58: 5-8.
180. Raab-Traub N, Flynn K. The structure of the termini of the Epstein-Barr virus as a marker of clonal cellular proliferation. *Cell* 1986; 47: 883-889.
181. Neri A, Barriga F, Inghirami G, et al. Epstein-Barr virus infection precedes clonal expansion in Burkitt's and Acquired Immunodeficiency Syndrome-associated lymphoma. *Blood* 1991; 77: 1092-1095.
182. Hjelle B. Human T-cell leukemia/lymphoma viruses. *Arch Pathol Lab Med* 1991; 115: 440-450.

TABLAS Y FIGURAS

Tabla 1. Clasificación histológica de los linfomas.

Bajo Grado

- A. Linfoma maligno, de linfocitos pequeños consistente con leucemia linfocítica crónica, plasmacitoide.
- B. Linfoma folicular de células pequeñas, áreas con esclerosis difusa.
- C. Linfoma folicular mixto, células grandes y pequeñas con núcleo hendido, áreas con esclerosis difusa.

Grado Intermedio

- D. Linfoma folicular de células grandes, áreas con esclerosis difusa.
- E. Linfoma difuso de células pequeñas con núcleo hendido.
- F. Linfoma difuso mixto de células grandes y pequeñas, esclerosis con células epitelioides.
- G. Linfoma difuso de células grandes, esclerosis de células hendidas y no hendidas.

Alto grado

- H. Linfoma de células grandes; sarcoma inmunoblástico; plasmacitoide.
- I. Linfoma linfoblástico.
- J. Linfoma de células pequeñas con núcleo no hendido, Burkitt, áreas foliculares.

Miscelaneos

- Compuestos
- Micosis fungoides
- Histiocítico
- Plasmacitoma extramedular
- Inclasificable
- Otros

Tabla 2. Estadificación de los linfomas.

Estado I:	Afección de una sola región ganglionar (I) o un sólo sitio extralinfático (I _E).
Estado II:	Afección de 2 o más regiones ganglionares en el mismo lado del diafragma (II) o afección localizada de un sitio extralinfático y una o más regiones ganglionares en el mismo lado del diafragma (II _E).
Estado III:	Afección de regiones ganglionares en ambos lados del diafragma (III) las cuales pueden estar acompañadas por afección extralinfática localizada (III _E) o afectar bazo (III _s) o ambas (III _{Es}).
Estado IV:	Afección diseminada de uno o más órganos extralinfáticos o tejidos con o sin enfermedad ganglionar asociada.
Síntomas:	A: asintomático. B: Fiebre, sudor nocturno, pérdida de peso >10% del peso total en los 6 meses previos.

Tabla 3. Características clínicas de los linfomas.

CASO	EDAD	SEXO	ESTADIO ^b	Dx ^a
Alto Grado				
L1	66	M	IVB	J
L3	5	M		J
L5	78	F	II	H
L15	45	M	IIEB	J
L23	69	M	IIIA	H
L24	62	F	IIIB	H
L33	76	F	IVB	H
L40	73	M	I	H
L49	49	M	IVB	H
L51	90	F	IEA	H
L54	55	M	IVB	H
L58	70	M	IIIA	H
L60	59	F	IIIE	H
L71	30	F	IIIB	H
M10	28	M	IIIB	H
N1	29	M	IIIB	H
N2	23	M	IVB	H
N13	73	M	IV	J
Grado Intermedio				
L2	70	F	IVB	F
L6	55	F	IV	E
L12	52	F	IV	F
L13	22	M	IIIB	F
L14	75	M	IVA	G
L16	19	F	IV	F
L25	43	M		G
L28	83	F	IV	G
L36	17	M	IVB	E
L66	67	F	IIIB	F
L64	18	M	IIIE	F
L70	36	M	IIIB	F
M15	76	F	IIIE	E
Bajo Grado				
L11	58	M	IVA	C
L22	68	F	IV	B
L55	66	M	IIIB	A
N9	45	F	IIA	C
N11	55	M	IVB	C

Tabla 3 (Con.). Características clínicas de los linomas.

CASO	EDAD	SEXO	ESTADIO ^b	Dx ^a
Miscelaneos				
L8	31	M	III	
L9	71	F	NC	
L10	51	F	III	
L26	36	M	IEA	MF ^c
L30	16	F	NC	MF
L69	68	M	NC	
M1	70	M		MF
M3	58	M	IV	MF
N3	36	F	IA	MF
N4	36	F	III	MF

a: Tipo histológico, la letra describe el subtipo histológico descrito en la Tabla 1.

b: Estadificación propuesta por la Ann Harbor

c: Micosis fungoides

NC: no clasificado.

Tabla 4. Análisis molecular de linfomas B.

C	CASO	S/E	J _H	C _K	C _L	TIPO CEL.	
AG	L1	M/66	R(2)	G	G	pre-B	
AG	L3	M/5	⊕R(2t,1)	G	G	pre-B	MYC EBV
AG	L15	M/45	⊕R(2,1t)	G	G	pre-B	MYC EBV
AG	L51	F/90	R(1)	G	NA	pre-B	EBV
GI	L6	F/55	⊕R(2,1t)	G	NA	pre-B	
GI	L28	F/83	R(2t)	G	G	pre-B	
	L62	F/33	R(2)	G	G	pre-B	
BG	L11	M/58	R(1t)*	G	G	pre-B	
	N18		R(1t)	G	G	Pre-B	
AG	L5	F/78	R(2)	G(D)	R	B	
AG	L23	M/69	R(1)	R(1)	G	B	
AG	L24	F/62	R(1t)	R(1)	G	B	EBV
AG	L33	F/76	R(2t)	R(2)	G	B	
AG	L49	M/49	R(1)	R(1)	G	B	EBV
AG	L60	F/59	R(2)	R(2)	G	B	
GI	L2	F/70	⊕R(2,1t)	R(1)	G	B	
GI	L13	M/22	R(1)	R(1)	G	B	
GI	L14	M/75	R(2)	R(1)	G	B	
GI	L16	F/19	R(1t)	R(1)	G	B	
GI	L70	M/36	⊕R(1,2t)	R(1)	NA	B	EBV
BG	L22	F/68	R(2)*	R(1)	G	B	
M	L69	M/68	R(1t)	R(2)	NA	B	EBV
	M4	M/36	R(2t)	R(1)	G	B	
	M6	F/48	R(1,1t)	R(1)	G	B	
	M13	F/12	R(1,1t)	R(2)	R	B	MYC EBV
	M14	M/65	R(2)	R(1)	G	B	
	M15	F/76	R(1)	R(1)	G	B	
	M18		R(1t)	R(1)	G	B	
	M19	F/12	R(2)	G	R	B	MYC EBV
	M20	F/10	R(2)	G(D)	R	B	MYC EBV
	N11	M/55	R(2t)	G	R	B	
	N13	M/73	R(2)	R(2)	G	B	
	N16	M/49	R(1)	G	R	B	
	N17	M/28	R(1t)	R(2)	G	B	

R: rearreglo. El número entre paréntesis indica cuantos alelos están reareglados y t fragmentos tenues; G: germinal; NA: no analizado; MYC: translocación de c-myc; EBV: Presencia del virus Epstein-Barr; J_H: Cadena pesada; C_K: Cadena Ligera kappa; C_L: Cadena Ligera lambda. AG: Alto grado; GI: Grado intermedio; BG: Bajo grado; M: Misceláneo. ⊕: Linfomas con más de dos rearreglos; *: rearreglos detectados con BgIII.

TABLA 5. Análisis molecular de linfomas T.

CASO	S/E	β	γ	δ	
L8	M/31	R	G	IM	
L10	F/51	R	R	IM	
L12	F/52	R	G	IM	
L26	M/36	R	NA	NA	
L30	F/16	R	R	G	
L36	M/17	R	R	IM	
L64	F/18	R	R	IM	
L71	F/30	R	R	G	EBV
M1	M/70	R	NA	NA	
M3	M/58	R	G	G	EBV
M10	M/28	R	NA	NA	EBV
M17		R	G	IM	
N2	M/23	R	R	G	
N3	F/36	R	NA	NA	
N4	F/36	R	NA	NA	

$\beta/\gamma/\delta$: Subunidades del Receptor de células T; R: rearreglo; G: germinal; NA: no analizado; IM: fragmento de intensidad menor al control. EBV: Presencia del virus Epstein-Barr.

TABLA 6. P.M. de fragmentos rearrreglados de R_cT β en linfomas.

CASO	S/E	BamHI (24)	EcoRI (11 y 4)
L8	M/31	D	10.5 ϕ ;9 ϕ
L10*	F/51	D;17 ϕ	IM(11)
L12*	F/52	17 ϕ	IM(11)
L26	M/36	D;12	8.8;6.2
L30	F/16	D;23 ϕ	9 ϕ ;2.7
L36	M/17	20	10.5 ϕ
L64	F/18	21 ϕ ;15 ϕ	16.5;D(11)
L71	F/30	13	10.5 ϕ
M1	M/70	17 ϕ ;13.5	D(4)
M3	M/58	21 ϕ	6.8
M10	M/28	23 ϕ	7.6
M17		17 ϕ	9.2
N2	M/23	NA	9 ϕ ;IM(4)
N3	F/36	NA	7
N4	F/36	NA	9.4 ϕ ;D(4)
L9	F/71	15 ϕ ;6.6	6.4;IM(11)
L40*	M/73	6.4 ϕ ;2.3	6 ϕ ;IM(11)
L55*	M/66	D;13;6.4 ϕ	11.5;6 ϕ ;IM(11 y 4)
L58*	M/70	6.4 ϕ	6 ϕ
N5	F/	NA	9.4 ϕ
N6	M/66	NA	9.4 ϕ
N9*	F/45	16	IM(11)

D: delección; IM: intensidad menor de la línea germinal; NA: no analizado; (): fragmento germinal alterado; ϕ : rrenglos similares con una sola enzima; *: rrenglos del mismo tamaño con dos enzimas.

Tabla 7. Linfomas bigenotípicos.

CASO	SEXO/EDAD	J _H	IgL	TcrB	Tcr γ	Tcr δ	P
L9	F/71	R*	k	R	R	G	2
L40	M/73	R	G	R	G	G	1
L55	M/66	R	k,l	R	R	R	2
L58	M/70	R	l	R	G	R	2
L66	F/67	R	G	R	G	G EBV1	
N5	F/	R	k	R	G	G	1
N6	M/66	R	G	R	G	G	1
N9	F/45	G	k	R	NA	NA	1

J_H: Cadena pesada; IgL: Cadena Ligera (k: Kappa; l: Lambda); TcrB/Tcr γ /Tcr δ : Subunidades del Receptor; R: rearreglo; G: germinal; *: rearreglo detectado con BgIII; P: poblaciones en el tumor.

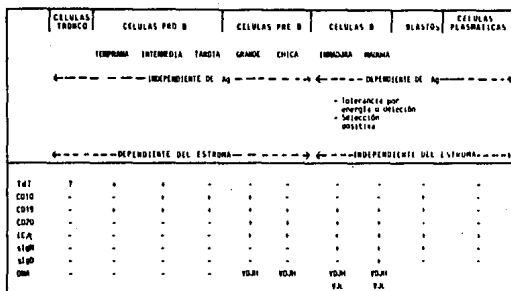


Figura 1. Esquema de las etapas de maduración de los linfocitos B. En la figura se muestra la influencia del estroma, de antígenos y la expresión de diferentes marcadores e inmunoglobulinas durante la ontogenia de los linfocitos B.

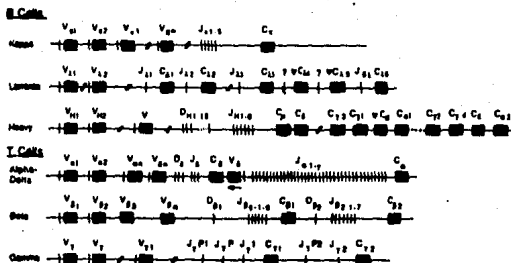


Figura 2. Estructura germinal de los genes de Ig y del RCT. La organización estructural de las diferentes subunidades de Ig y del RCT son muy similares las cuales consisten de regiones variables (V), de diversidad (D), de unión (J) y constantes (C).

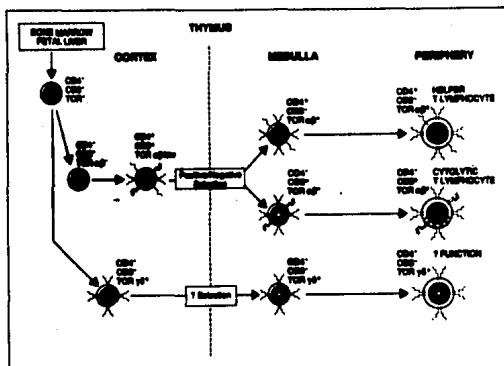


Figura 3. Ontogenia, diferenciación y linaje de células T madurando en el timo. Precusores de células T que han emigrado de médula ósea o de hígado fetal, aparecen primero en la corteza tímica como CD4⁺CD8⁺ y R α T. Algunas de éstas se vuelven células $\alpha\beta$ y pueden entonces emigrar a la periferia (sangre, ganglios linfáticos, bazo, intestino, etc.), mientras que otras comprometidas al linaje $\gamma\delta$, primero expresan CD8 y luego CD4. Estas células conforman la gran mayoría de los timocitos, y sólo una pequeña fracción maduran como CD4⁺ o CD8⁺, las cuales aparecen posteriormente en la periferia.

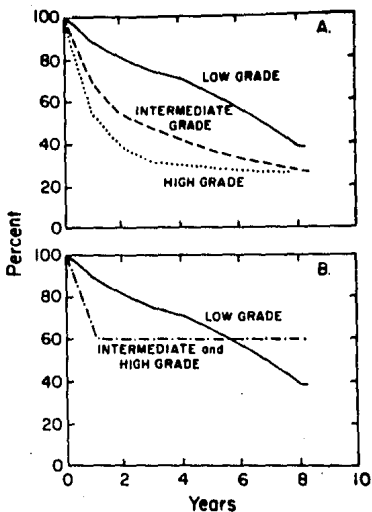


Figura 4. Curvas de sobrevida para pacientes con Linfoma. (A) Sobrevida de pacientes con diferentes grados según la última clasificación propuesta. (B) Sobrevida hipotética actual de acuerdo a la respuesta de la terapia.

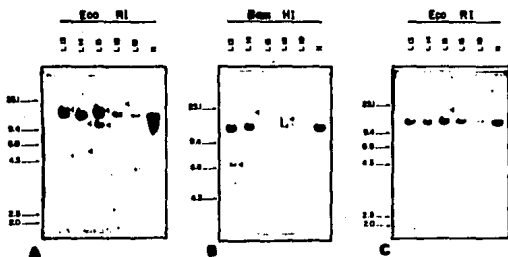


Figura 5. Rearreglo de los genes de Ig y c-myc en linfomas B. El DNA de los tumores fué digerido con EcoRI o BamHI y analizado con las sondas para cadena pesada región J (A), cadena ligera C_{κ} (B) y c-myc (C). Como DNA control se incluyó un paciente con enfermedad de Castleman (L19) o tumores no hematológicos (N). Las flechas indican los rearreglos detectados en cada muestra.

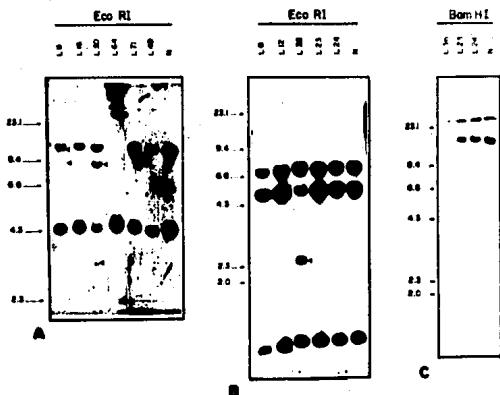


Figura 6. Organización de los genes del RCT en linfomas T. El DNA tumoral fué digerido con EcoRI o BamHI e hibridado con sondas para RCT β (A), RCT γ (B) y RCT δ (C). El DNA de linfomas B (L16, L49, L23 y L24) o seminoma (N) fué utilizado como línea germinal. Las flechas indican los rearrreglos detectados en cada muestra.

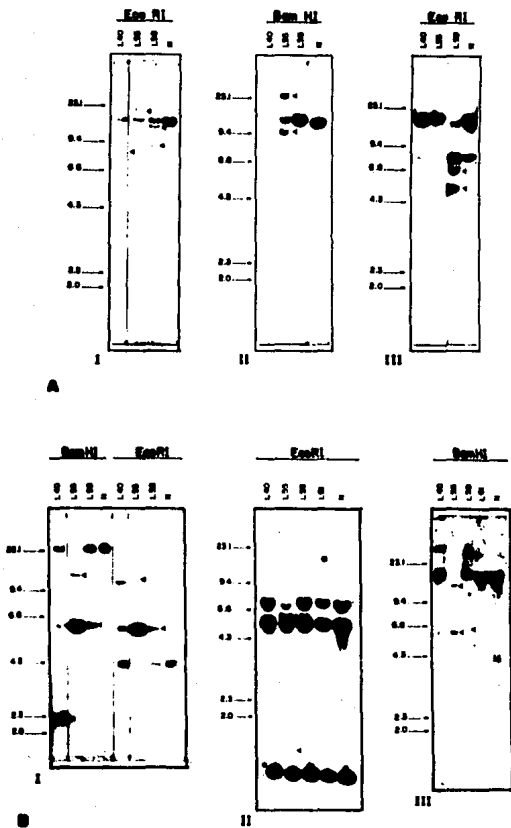


Figura 7. Rearreglos simultáneos de Ig y del RCT en linfomas. Los linfomas bigenotípicos L40, L55 y L58 fueron seleccionados para ejemplificar este tipo de alteración. El DNA fué digerido con las enzimas que se indican e hibridado con sondas para genes de Ig (A): J_H (I), C_κ (II) y C_λ (III); y para el RCT (B): RCT β (I), RCT γ (II) y RCT δ (III). Las flechas indican los rearrreglos encontrados en cada muestra.

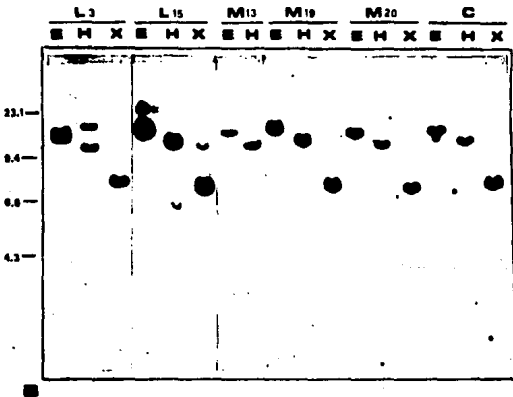
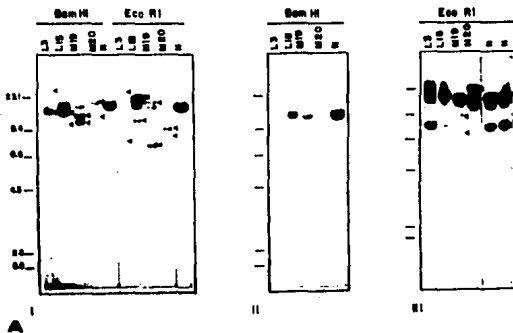


Figura 8. Caracterización y alteraciones de c-myc en linfomas tipo Burkitt. (A) Determinación del estado de diferenciación mediante el análisis de los genes de Ig. El DNA fue digerido con las enzimas EcoRI o BamHI, y analizado con: J_H (I), C_κ (II) y C_λ (III). Las flechas indican rearrreglos en los tumores. (B) Alteraciones dentro o fuera de los exones de c-myc. El DNA de los linfomas fue digerido con EcoRI (E), HindIII (H) o XbaI (X) y analizado con una sonda para el primer exón de c-myc. Linfocitos de sangre periférica de individuos normales fue utilizado como control (C). En L15, el fragmento alterado con Eco RI (⊙) comigra con uno de los rearrreglos para J_H.



Figura 9. Localización del sitio de rompimiento de c-myc durante la translocación t(8;14). El DNA tumoral fué digerido con enzimas que se localizan en el primer exón/Intrón como SacI (S), XbaI (X), PstI (Ps) o PvuII (Pv), y analizado con una sonda para el primer exón de c-myc. Como tejido control se utilizó DNA de un seminoma (N).

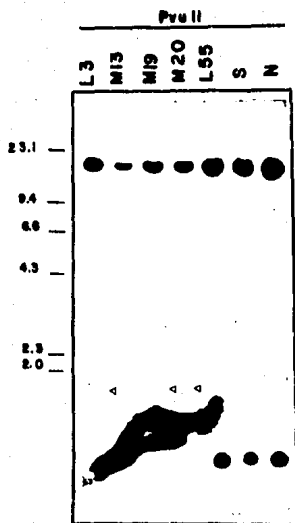


Figura 10. Mutaciones en el primer ex3n de c-myc. En los linfomas L3, M19 y M20 existen mutaciones que afectan el sitio PvuII dentro del primer ex3n, el cual se pierde, con lo que se genera un fragmento de 1.7 Kb (indicado por las flechas). En el M13 un fragmento anormal de 2.8 Kb es identificado. Como controles se utilizo linfomas B-T (L55), tumores no hematol3gicos como seminomas (S) o el DNA de individuos normales (N).

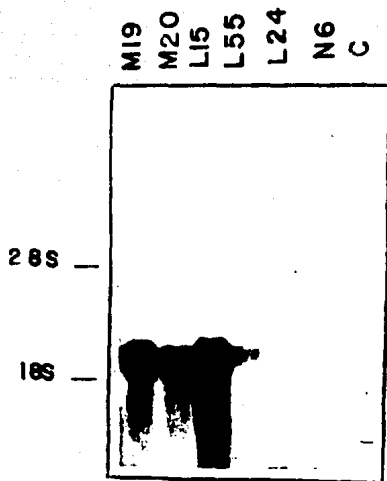


Figura 11. Expresión de c-myc en linfomas tipo Burkitt. La expresión fue analizada por medio de Northern con un cDNA del segundo y tercer exón de c-myc como sonda. Una expresión elevada fue observada en L15, M19 y M20.

ANEXO I

Clinical, histologic and genetic characterization of non-Hodgkin's lymphomas in mexicans

• Venancio Ortega,
• Emma Verástegui,
• Abelardo Meneses,
• Rogelio Hernández,
• José Jessurum,
• Rodolfo Ocadiz,
• Guillermo Flores,
• Pedro Rodríguez,
• Guillermo Alfaro.

Abstract

We describe the anatomical distribution, histological and molecular characteristics of 32 cases of NHL. Staging of the NHL was made according to conventionally accepted schemes. Histologically the NHL were classified in grades following the criteria defined by the Working Formulation. Rearrangements in one or more Ig or TcR receptor genes were detected in Southern blots and allowed us to determine the cell type and stage of differentiation. Serological analysis of 26 serum samples revealed the existence of antibodies against EBV epitopes; eight of these patients carried viral sequences in the tumor genome as determined by slot blot hybridization. Our studies indicate that the use of various methods is of paramount importance in order to improve our understanding of the natural history of NHL.

Keywords: NHL, Immunoglobulin, T-cell receptor.

Resumen

En este artículo describimos la distribución anatómica, las características histológicas y

moleculares de 32 casos de LNH. La estadificación clínica y clasificación histológica por grados se hizo de acuerdo a esquemas aceptados convencionalmente. Los arreglos detectados en genes que codifican para Ig o el RCT sirvieron para identificar la estirpe celular y el estadio de diferenciación de las células neoplásicas. El análisis de 26 muestras de suero reveló la existencia de anticuerpos contra epítopos de EBV; ocho de estos pacientes contenían secuencias virales integradas en el genoma del tumor. Nuestros estudios indican que el uso de diferentes métodos es fundamental para profundizar en el conocimiento de la historia natural de los LNH.

Palabras clave: LNH, Inmunoglobulina, Receptor célula T.

Introduction

Non-Hodgkin's lymphomas (NHL) develop from malignant transformation of lymphoid cells and have been considered tumors of the immune system.¹ These tumors originate and disseminate predominantly within lymph nodes; however, lymphomas can arise in essentially all organs and tissues and can progress rapidly.^{2,3} Extranodal

^a Centro de Referencia Para el Diagnóstico Molecular de Linfomas no-Hodgkin, Instituto Nacional de Cancerología.

^b División de Investigación Clínica, Instituto Nacional de Cancerología.

^c Departamento de Anatomía Patológica, Instituto Nacional de Cancerología.

^d Departamento de Anatomía Patológica, Instituto Nacional de la Nutrición Salvador Zubiran.

^e Departamento de Anatomía Patológica, Hospital General de México SSA

^f Departamento de Anatomía Patológica, Hospital Central Militar.

^g Departamento de Inmunología, Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM, Apartado Postal 70228, Ciudad Universitaria, 04510 México, D.F. México.

Recibido el 5 de septiembre de 1991. Aceptado para publicación el 17 de diciembre de 1991.

NHL may develop and constitute a major complication in immunosuppressed patients.⁴ Furthermore, some varieties of NHL with distinct geographical distribution have been described.⁵⁻⁸

Non-Hodgkin's lymphomas have been and continue to be classified in grades taking into account the clinical course and histological criteria.⁹ Furthermore, the use of monoclonal antibodies in lymphoid leukemias and NHL was a major contribution in the conformation of immunophenotypes which allowed the discrimination between B and T lymphocytes.¹⁰ However, antibodies against B-cells often show cross reactivity with other cell types and those reacting with T-cells have limited use as markers for clonality.^{10,11}

Some of the problems mentioned above have been solved by the identification and characterization of rearrangements within gene sequences coding for immunoglobulin chains (Ig) or T-cell receptor (TcR) subunits.¹²⁻¹⁶ In theory, the repertoire of Ig or TcR molecules is limited only by the number of B-cell clones which are produced by the bone marrow or that of T-cells maturing in the thymus.^{17,18} Due to the fact that most NHL are monoclonal proliferations, the use of techniques in molecular biology has improved the capacity to discriminate between these tumors and non-malignant expansions.^{13,16,19-21}

In this work we investigated samples obtained from 32 patients with NHL. The purpose of this investigation was to use genetic molecular techniques to identify the cell type (B or T lymphocytes), the stage of differentiation (i.e. pre-B vs B) and the existence of Epstein-Barr (EBV) or human T-cell lymphotropic (HTLV-I) viral sequences within the genome of the cancer cells. A correlation between the age, extension of the disease, histological types and genetic findings is presented.

Materials and methods

Patients

Thirty two patients with NHL aged 16 or older from four different hospitals in Mexico City were included in this investigation. Of the 32 patients, 13 were males and 19 female whose age ranged from 16 to 90 years (median 58.5 years). Access to the clinical records was possible in 29 cases. Clinical staging was done retrospectively using the anatomic site-clinical stage correlations suggested at Ann Arbor²² or the TNM system proposed at the cutaneous T-cell lymphoma workshop.²³ Selected samples of surgical material

were reviewed and diagnosed by a group of pathologists, independently and then together in order to obtain a consensus, using the terminology of the Working Formulation.¹¹

Immunohistochemical staining

Identification of malignant B or T lymphocytes in fixed tissue sections was made using specific monoclonal antibodies (L26 or UCHL-1; Dako Corporation, Carpinteria, CA). Techniques for immunoperoxidase studies have been described in detail elsewhere.²⁴

Serological studies

Serum samples obtained from 16 patients were tested for the presence of antibodies against different antigenic determinants of EBV. Nuclear antigen (EBNA) of EBV was detected by anticomplement immunofluorescence test; IgG and IgM against viral capsid antigens (VCA) and IgG against early antigen (EA) by indirect immunofluorescence (Cull Laboratories, Salt Lake City, Utah). The presence of HIV antigenic determinants was investigated by agglutination with SERODIA-HIV (Miles Laboratories, Tokyo). Negative control sera was obtained from five healthy donors and five patients with non-hematologic malignancies.

Cells

Raji, a cell line derived from a patient with Burkitt lymphoma, was obtained from the ATCC.²⁵ HUT102, a cell line infected with HTLV-I, was obtained from Dr. Gallo.²⁶ Culture medium used for propagating the cell lines (37°C; humidified 5% CO₂-air) was RPMI 1640 supplemented with 10% heat-inactivated fetal calf serum, 1 mM L-glutamine, and 1% of the following: non-essential amino acids, sodium pyruvate and a combination of antibiotics (all these products were obtained from Gibco, Grand Island, NY).

DNA isolation, Southern and slot blots

High molecular weight DNA was isolated by standard procedures from tumor samples obtained from peripheral blood (PBC), biopsies or in the autopsy.²⁷ For Southern blots, DNAs (10 µg) were cleaved with appropriate restriction enzymes under conditions recommended by the manufacturer (Amersham, Aylesbury, Buckinghamshire), and electrophoresed on 0.8%

agarose gels. The DNA was denatured in situ and transferred to nitrocellulose filters (Schleicher & Schuell Inc, Keene, NH) according to the procedure of Southern.²⁰ Prehybridization was in 25 mM KPO₄, 5X SSC (1X SSC is 0.15 M NaCl, 0.015 M sodium citrate), 5X Denhardt's solution (1X Denhardt's is 0.02% bovine serum albumin, 0.02% Ficoll, 0.02% polyvinylpyrrolidone), 0.5% NaDodSO₄, 50 µg/mL of denatured salmon sperm and 50% formamide. Hybridization was in the same solution but supplemented with 1% NaDodSO₄ and 10% dextran sulfate. The blots were hybridized for 12 h with 5X 10⁶ cpm of nick translated ³²P-labelled DNA fragments per mL. Washing conditions were: once in 2X SSC, 0.1% NaDodSO₄ at room temperature, and three times with 0.1X SSC at 50°C. DNA fragments were isolated from plasmid subclones of genomic or cDNA clones and were electrophoresed through low melting point agarose prior to extraction. Filters were exposed for several days at -70°C to X-OMAT K film (Kodak, Guadalajara, Jalisco) with an intensifying screen.

For slot hybridization the DNA samples were applied directly to nitrocellulose filters using a Hybri-Slot Manifold (BRL, Bethesda, MD). The remaining procedures were as described above.

DNA probes

DNA probes containing the following fragments were obtained from Dr P Leder: a 6 kb BamHI/HindIII fragment cloned from the J region of the Ig HC²⁰ and a 2.5 kb EcoRI fragment specific for the C α chain.²⁰ EcoRI fragments of 8 kb and 6.1 kb corresponding to the human C λ 1 and C λ 2 genes respectively²¹ were provided by Dr B Pollock. The α/β TCR and γ/δ TCR were probed with DNA fragments specific for the β (300 bp/BglII), γ (1.6 kb/EcoRI) or δ (1.5 kb/EcoRI) genes,²²⁻²⁴ all of which were kindly provided by Dr T Mak. Screening for EBV DNA sequences was made with a 2.6 kb BstEII fragment containing oriP, a gift from Dr Sugden.²⁵ From Dr R Gallo was an 8.25 kb SacI fragment containing the complete HTLV-I genome.²⁶ CMYC was investigated with a DNA probe containing exons II (~60%) and III.²⁷

Results

Histologic classification

Twelve cases were diagnosed as high grade diffuse malignant lymphomas. Ten were

subclassified as immunoblastic sarcomas (IS) and two as small non-cleaved cell lymphomas (SNC). The diagnosis of intermediate grade malignant lymphomas was made in 11 cases. Diffuse mixed, small and large cell malignant lymphoma (MSL) predominated within this group (7 of 11). Two were small cleaved cell lymphomas (SCC) and two large cleaved cell lymphomas (LCC). Three low grade malignant lymphomas were subclassified as follows: small lymphocytic (SL), follicular, predominantly small cleaved cell with sclerosis (FSCS) and follicular mixed, small cleaved and large cell (FSCL). Three cutaneous malignant lymphomas, two of which were Mycosis fungoides (L8 and L10), were polymorphic as determined by the presence of small and large cells. Furthermore, angiocentricity was detected in two. Two primary gastric lymphomas were composed of a mixed population of large and small cells. Finally, a large cell malignant lymphoma of the femur was also included (table 1).

Extension of the disease and staging

Extranodal dissemination was found in 64% (14 of 22) of primary nodular lymphomas. The liver, BM, skin, and different regions of the gastrointestinal tract were infiltrated more frequently than other regions of the body. Generalized dissemination was observed in two patients with cutaneous lymphoma, one of which presented a mediastinal mass. Another cutaneous lymphoma was restricted to left calf and foot but infiltration of the lung was suspected by chest X-rays. A NHL which infiltrated submentonian soft tissues without detectable lymph node involvement was diagnosed in one patient. In three patients the lymphoma was localized to a single region of the body, these being: midline, thyroid gland and left femur. In two gastric and one cutaneous lymphomas it was not possible to determine the extension of the disease.

Staging procedures were made retrospectively according to the Ann Arbor proposal in 26 cases which had been subclassified histologically as high, intermediate and low grade malignant lymphomas. Sixty nine percent of the patients were in stages III and IV, 23% in stage II and 8% were in stage I. The TNM system proposed at the cutaneous T-cell lymphoma workshop was used to allocate two cutaneous malignant lymphomas within stage III. Insufficient clinical data prevented staging of two gastric and one cutaneous malignant lymphomas (table 1).

Table 1. Clinicopathological characteristics of 32 cases of NHL

CN*	SEX	AGE	STAGE*	HT*
High Grade				
L1	M	66	IVB	SNC
L3	F	78	II	IS
L15	M	45	IIIB	SNC
L23	M	69	IIIA	IS
L24	F	62	IIIB	IS
L33	F	76	IVB	IS
L40	M	73	I	IS
L49	M	49	IVB	IS
L51	F	90	IEA	IS
L58	M	70	IIIA	IS
L60	F	59	IIIE	IS
L71	F	30	IIIB	IS
Intermediate Grade				
L2	F	70	IVB	MSL
L6	F	55	IV	SCC
L12	F	52	IV	MSL
L13	M	22	IIIB	MSL
L14	M	75	IVA	LCC
L16	F	19	IV	MSL
L28	F	83	IV	LCC
L36	M	17	IVB	SCC
L64	M	18	IIIE	MSL
L66	F	67	IIIB	MSL
L70	M	36	IIIB	MSL
Low Grade				
L11	M	56	IVA	FSCL
L22	F	68	IV	FSCL
L55	M	66	IIIB	SL
Miscellaneous				
L8	M	31	IVA	
L9	F	71	NC	
L10	F	51	III	
L26	M	36	IEA	
L30	F	16	NC	
L69	M	68	NC	

Table 1. (a) CN = case number. (b) Clinical staging was made according to the Ann Arbor or TNM proposed systems of classification; the presence of B symptoms is specified with capital letters. (c) HT = histological type (see text).

Biochemical alterations

Hypergammaglobulinemia was detected in 21 patients. Independent values of IgM (>322 U/mL), IgG (>207 U/mL) and IgA (>268 U/mL) indicated that one or more subclasses of Ig could be responsible for this alteration. The irregularity of the pattern observed with the different subclasses of Igs was interpreted as suggestive evidence of nonspecific clonal expansions of normal B-cells rather than being determined by the lymphoma.

Serological analysis

Antibodies (IgG) directed against VCA of EBV were detected in 13 of 16 (81%) serum samples obtained from patients with NHL. Three of these patients (L14, L15 and L49) probably carried reactivated infections since their sera were positive for antibodies against VCA (IgM) and EA. Furthermore, a humoral response to EBNA was detected in L15 and L49.

AIDS was diagnosed in one patient (L49) suffering from a lymphoma with extensive



Figure 1. Southern blot analysis of the organization of Ig and CMYC genes in selected cases of patients with B-cell NHL. Rearrangements were detected after digestion of DNA samples with EcoRI or BamHI. Hybridization was carried out using molecular probes for: 1 region of the Ig HC (A); CK (B); and CMYC (C). Control DNAs were obtained from patients affected by either Castleman's disease (L19) or seminoma (N). Arrow heads point to rearranged DNA fragments. Numbers to the left of each gel represent the position of *Mn*III fragments in Kb. For description of individual cases of NHL use text and tables 1 and 2.

dissemination to abdominal lymph nodes, rectum and anal region.

Molecular biology of Ig and TcR genes in lymphomas

The germinal configuration of Ig and TcR genes was determined in Southern blots using DNA extracted from PBC obtained from normal individuals and from a non-lymphoid testicular tumor (seminoma). The DNA was digested with appropriate restriction enzymes (BamHI, EcoRI or BglII) and hybridized with molecular probes recognizing the HC (I_H), C α or CA (exons I and II) Ig genes and those specific for TcR β , TcR γ or TcR δ genes.

Rearrangement of Ig genes resulted in the appearance of one or more additional DNA bands in the autoradiography of 19 samples. These changes were characteristic of B-cell lymphomas (figure 1). In some cases, germinal DNA restriction fragments were missing, indicating that both chromosomes were rearranged or alternatively, that one had been deleted. Based on the molecular analysis, B-cell lymphomas were subclassified in two main categories depending on the number and type of genomic rearrangements. When only the HC was involved, the genotype of the cancer cells was equivalent to that of pre-B lymphocytes (figure 1 and table 2). On the other hand, when both the

HC and LC were rearranged, the tumor was produced by mature B-cells (figure 1).

Eight T-cell lymphomas were identified by changes in genes coding for β , γ or δ subunits of the of the TcR (figure 2). In five cases, both TcR β and TcR γ genes were rearranged; in two, rearrangements were restricted to TcR β , and in the remaining case, although TcR β was rearranged, limited amounts of tumor DNA prevented the analysis of TcR δ and TcR γ genes (table 2). Although TcR δ genes were in germinal configuration, in five cases the intensity of the bands was below that of the control DNAs. If these changes in intensity were the result of partial or complete chromosomal deletions remains to be determined.

Five DNA samples were particularly interesting since rearrangements involving Ig and TcR genes were found within the same tumor (figure 3 and table 2). HC and TcR β genes were rearranged in L40 and L66. Southern blots from L9, L55 and L58 gave a pattern in which several Ig and TcR genes were involved. To further characterize these lymphomas tissue sections were analyzed with monoclonal antibodies directed against B-cell (L26) or T-cell (UCLH-1) antigenic determinants. The results of these experiments revealed that > 90% of the lymphocytes in L58 were B-cells since they reacted with monoclonal antibody L26 but not with UCLH-1. On the other hand, clusters of B or T-cells were observed in L9; however,

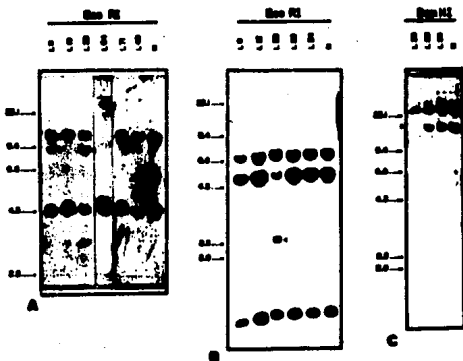


Figure 2. Southern blot analysis of the organization of TcR genes in selected cases of patients with T-cell NHL. DNA was extracted from tumor cells, digested with *EcoRI* or *BamHI* and hybridized with molecular probes containing sequences specific for one of the following genes: TcR β (A), TcR γ (B) and TcR δ (C). Control DNAs showing restriction fragments in germinal configuration were extracted from B-cell lymphomas (L16, L49, L23 and L24) and a seminoma (N). Arrow heads point to rearranged DNA fragments. Numbers to the left of each gel represent the position of λ DNaIII fragments in Kb. For details see text and tables 1 and 2.

these clusters were small and distributed randomly. None of the remaining bigenotypic tumors contained cells reacting with the monoclonal antibodies used.

Genetic changes involving CMYC

To determine if CMYC was translocated, amplified or both, we used a molecular probe containing the second and third exons of the gene. With one exception (L15) CMYC was unchanged in all the samples investigated. It must be pointed out that the genotype of the L15 patient was similar to that of endemic Burkitt lymphomas. The cancer cells were pre-B lymphocytes, harboring EBV sequences and a chromosomal translocation affecting CMYC (figure 1C).

Identification of viral DNA sequences

EBV was detected with slot blots in 32% (6 of 19) cases albeit with different intensities (results not shown). None of the DNAs extracted from

T-cell lymphomas tested with a probe for HTLV-I gave a positive signal.

Discussion

The use of techniques in molecular genetics in medicine has increased the understanding of basic mechanisms which are involved in the genesis of disease.²⁰ In particular, some of these methods have proven of great utility in the diagnosis and differential diagnosis of hematological cancers.¹⁴⁻²⁰ In this paper we have used an experimental approach to discriminate between B and T-cell lymphomas, to identify the stage of cell differentiation, genomic changes in CMYC and the existence of viral sequences in the genome of the cancer cells.

To discriminate between B-cell and T-cell lymphomas, DNA extracted from neoplastic tissues was analyzed in Southern blots with DNA probes hybridizing with either Ig or TcR genes. The sensitivity of this method (~1%) allowed us to study samples in which the neoplastic cells were not the predominant component.

Table 2. Genotype of NHL

CN	HC	C α	C λ	TcR β	TcR γ	TcR δ	EBV	CELL
B-Cell lymphomas								
L1	R*	C*	G	G	ND*	ND	-	preB
L2	R	R	G	G	ND	ND	-	B
L5	R	C	G*	C	ND	ND	-	B
L6	R	C	ND	C	ND	ND	-	preB
L11	R	C	G	C	ND	ND	-	preB
L13	R	R	G	G	ND	ND	-	B
L14	R	R	G	G	ND	ND	-	B
L15	R	C	G	C	ND	ND	+	preB
L16	R	R	G	G	ND	ND	-	B
L22	R	R	G	C	ND	ND	-	B
L23	R	R	G	C	C	C	-	B
L24	R	R	C	C	C	C	+	B
L28	R	C	C	C	ND	ND	-	preB
L33	R	R	C	C	C	C	-	B
L49	R	R	ND	C	ND	ND	+	B
L51	R	C	C	C	ND	ND	+	preB
L60	R	R	G	C	ND	ND	-	B
L69	R	R	ND	C	C	C	+	B
L70	R	R	ND	C	C	C	+	B
T-Cell lymphomas								
L8	G	C	G	R	C*	C*	-	T
L10	G	G	G	R	R	C*	-	T
L12	G	C	G	R	C	C*	-	T
L26	C	ND	ND	R	ND	ND	-	T
L30	C	C	ND	R	R	C	-	T
L36	C	C	G	R	R	C*	-	T
L64	G	C	ND	R	R	C*	-	T
L71	G	C	ND	R	R	C	+	T
Bigenotypic lymphomas								
L9	R	R	C	R	R	C	-	B-T
L40	R	C	C	R	C	C	-	preB-T
L55	R	R	R	R	R	R	-	B-T
L58	R	G	R	R	C	R	-	B-T
L66	R	C	ND	R	C	C	+	preB-T

Table 2. (a) R = rearranged genes; (b) C = genes in germinal configuration; G* defines the presence of genes in germinal configuration but with reduced intensity in the autoradiograph as compared to the controls; (c) ND = not done.

Recombination events within Ig genes without changes in the germinal pattern of TcR genes are characteristic of nearly all normal and malignant B-cells.³⁹⁻⁴¹ Part of the B-cell differentiation program is given by the sequential rearrangement of Ig genes. The first genomic changes occur in one or both HC genes and these are followed by equivalent events in LC α genes. If the rearrangements of the α genes are not productive, LCA genes undergo recombination in order to render the cell capable of synthesizing an Ig. Malignant transformation may occur in early or advanced stages of differentiation and

thus, leukemia and lymphoma cells may be of either pre-B or B-cell origin.^{42,43}

The majority (59%) of the lymphomas in this study were of pre-B-cell or B-cell origin as determined by Southern blots of genomic DNA digests with EcoRI, BamHI and BglII. Thirty seven per cent (7 of 19) were pre-B-cell lymphomas and although the number of cases is limited, it should be emphasized that this subtype predominated (6 of 7) among patients over 50 years (median: 66). On the other hand, mature B-cell lymphomas (63%) did not show a tendency in relation to age, although the median was 62 years.

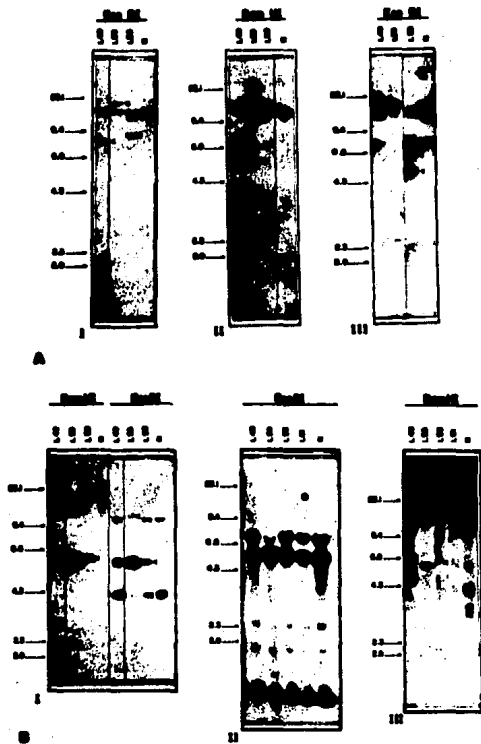


Figure 3. Characterization of bigenotypic lymphomas. NHL L40, L55, L50 and L61 (control) were selected for the configuration of this figure. Panel A shows rearrangement of Ig genes: J_H (I), C_κ (II) and C_κ (III). Panel B shows rearrangement of TcR genes: TcR β (I), TcR γ (II) and TcR β (III). Arrow heads point to rearranged DNA fragments. Numbers to the left of each gel represent the position of MspI fragments in Kb. A more detailed analysis of these cases is presented in the text and tables 1 and 2.

There were no clear cut differences in relation to the clinical stage and histological type between pre-B and B-cell primary nodular lymphomas. However, with one exception (L22), all were diffuse NHL. Furthermore, 7 of 9 high grade B-cell lymphomas were diagnosed as diffuse immunoblastic sarcomas with plasmacytoid differentiation. The predominance of diffuse and in particular of this histological subtype among high grade lymphomas in this series is in agreement with the frequency detected at different departments of pathology in Mexico City (44 and unpublished results). Although we do not have a satisfactory explanation for these observations, it is possible that environmental and/or socio-economic conditions may have played a role and should be considered with more attention in the future.

Circulating antibodies against the VCA of EBV were detected in 81% of 16 patients with B lymphomas investigated. Of these, three were pre-B-cell, seven B-cell, two T-cell and one bigenotypic lymphomas. On the other hand, EBV DNA was detected in eight lymphomas albeit with different intensities (table 2). The coexistence of a humoral response against EBV and the presence of viral sequences was detected in L15, L24 and L49 all of which were of B origin. On the other hand, neither antibodies nor EBV sequences were detected in L5, L22 and L23.

Epidemiological, clinical and experimental data support an active role of EBV in lymphomagenesis.^{3,46} The failure to demonstrate EBV DNA in the cancer cells of seropositive patients could be determined by at least three different reasons: (a) infection by EBV is not a pre-requisite for the development of NHL; (b) our experimental conditions were not sensitive enough to detect variations in the number of copies of viral genome per cell depending on the lymphoma; and (c) a preponderance of EBV negative cells in a mixed population in which chromosome segregation may have been responsible for the loss of the virus.

The high frequency of seropositive individuals in this investigation may have been the consequence of previous infections by EBV and not necessarily should be related to the lymphoma. In support of this proposal it should be mentioned that negative controls for EBV serological studies were difficult to detect within the population of patients and relatives attending the hospital. Carefully designed epidemiological studies are needed to establish the frequency of infections by EBV in our country.

Infection by EBV and translocation of CMYC to

the vicinity of the HC enhancer have been described in endemic and, less frequently, in sporadic forms of Burkitt lymphoma.⁴⁶⁻⁴⁸ Because of this, a synergistic effect between EBV and CMYC has been proposed in the etiology of this variety of lymphoma.⁴⁹ The association is a rare finding in other types of NHL, except perhaps in those arising in immunosuppressed patients.^{50,51} Our results are in agreement with the data presented in the literature since only one patient (L15) with a diffuse immunoblastic sarcoma had an equivalent genotype to that of Burkitt's lymphoma. Because expression of CMYC was not investigated in this work, changes in mRNA stability or enhanced levels of transcription cannot be ruled out as potential mechanisms involved in malignant transformation.

Antigen recognition by T-cells is possible due to the presence of specialized receptors on the membrane.⁵² T-cell receptor diversity is the result of a series of genetic rearrangements closely related to those of Ig genes in which conserved DNA sequences and possibly the same recombination enzymes are involved. Although T-cells express only one type of receptor on the cell membrane, either TcR α/β or TcR γ/δ , rearrangements follow a predetermined order in which all the genes are involved.⁵³ The majority of mature T-cells carry TcR α/β and only a small percentage of the population TcR γ/δ . The latter type of cells has distinct tissue distribution and may be involved in specific T-cell responses.⁵⁴

Southern blots of DNA extracted from T-cell lymphomas revealed that TcR γ and TcR β genes were rearranged in six of seven cases. These findings probably reflect the sequential order which has been described during T-cell maturation in which of the two forms of receptors, TcR γ/δ is the first to be rearranged.

In one case with a history of Mikulicz's syndrome (L12) we did not find evidence of rearrangement in TcR γ/δ . T-cell lymphomas of the salivary glands are very rare entities;⁵⁵ consequently a correlation between the benign lymphoepithelial lesion diagnosed in the parotid gland and the development of lymphoma remains to be determined.

Bigenotypic lymphomas were detected in patients over 60 years and deserve special attention. Three possible explanations for the complexity of the genotypes are: (a) the tumors could be either B or T-cell lymphomas in which abnormal recombination events have taken place; (b) the cell population was composed of B and T malignant lymphocytes; and (c) extensive infiltration by monoclonal reactive non-malignant

lymphocytes was responsible for the combined genotypes.

The electrophoretic pattern of L40 and L66 indicates that these tumors may in fact be pre-B-cell lymphomas with abnormally rearranged TcR β . These events are not uncommon in immature B-cells and have been described in normal and malignant lymphocytes.^{48,49} The fact that TcR γ and TcR δ genes were in germinal configuration supports this interpretation although the cancer cells did not react with a B-cell specific monoclonal antibody L26. Abnormal rearrangements predominate in immature B lymphocytes but could be detected in B-cells with the use of molecular and immunological techniques in L58. Finally, a gastric lymphoma (L9) and an aggressive nodular lymphoma (L53) may be bclonal tumors or alternatively infiltrated by monoclonal reactive non-malignant lymphocytes.

From our results it became apparent that individuals over 50 years tend to develop pre-B and bigenotypic lymphomas with a higher frequency than younger people. Abnormally rearranged genes are a common finding in patients with acute lymphoblastic leukemias⁵⁰⁻⁵² and have been described in cutaneous T-cell lymphomas and pseudolymphomas.⁵³ To our knowledge an equivalent situation has not been described in the elderly, although chromosomal alterations tend to increase and accumulate with age.⁵⁴ One is tempted to suggest that aging could be a predisposing factor in which malfunction of the immune system may prevent an effective control of emerging immature neoplastic clones.

Acknowledgments

We are grateful to Dr A Angeles and Dr H Dominguez for reviewing histological preparations. Also, we are indebted to Karla Archer for reviewing the manuscript, and to S Campos and J Avilés for art work.

This work was supported in part by grant P219CCOL891977 from CONACyT.

References

- Magrath I. Lymphocyte ontogeny: a conceptual basis for understanding neoplasia of the immune system. In: Magrath I. The non-Hodgkin's lymphomas. Baltimore: Williams & Wilkins, 1990:29-48.
- Freeman C, Berg JW, Cutler SJ. Occurrence and prognosis of extranodal lymphomas. *Cancer* 1972;29:252-60.
- Hubbard SM, Chabner BA, DeVita VT, et al. Histologic progression in non-Hodgkin's lymphoma. *Blood* 1982;59:258-64.

- Penn I. Tumors of the immunocompromised patient. *Ann Rev Med* 1980;39:63-73.
- Facer CA, Palfyair JHL. Malaria, Epstein-Barr virus, and the genesis of lymphomas. *Adv Cancer Res* 1989;53:33-72.
- Kondo T, Nonaka H, Miyamoto N, et al. Incidence of adult T-cell leukemia-lymphoma and its familial clustering. *Int J Cancer* 1985;35:749-51.
- Araki K, Kohakura M, Yunoki K, et al. The third nationwide study on adult T-cell leukemia/lymphoma (ATL) in Japan: characteristics patterns of HLA antigens and HTLV-I infection in ATL patients and their relatives. *Int J Cancer* 1988;41:505-12.
- Levine PH, Blattner WA, Clark J, et al. Geographic distribution of HTLV-I and identification of a new high-risk population. *Int J Cancer* 1988;42:7-12.
- Rosenberg SA, Berard CW, Brown BN, et al. National Cancer Institute sponsored study of classifications of non-Hodgkin's lymphomas: summary and description of a working formulation for clinical usage. The non-Hodgkin's lymphoma pathologic classification project. *Cancer* 1982;49:2112-35.
- Foon KA, Todd RF. Immunologic classification of leukemia and lymphoma. *Blood* 1986;68:1-31.
- Jaffe ES. The role of immunophenotypic markers in the classification of non-Hodgkin's lymphomas. *Sem Oncol* 1990;17:11-9.
- Arnold A, Cossman J, Bakhshi A, Jaffe ES, Waldmann TA, Korsmeyer SJ. Immunoglobulin gene rearrangements as unique clonal markers in human lymphoid neoplasms. *N Engl J Med* 1983;309:1593-9.
- Cleary ML, Chao J, Wamke R, Sklar J. Immunoglobulin gene rearrangement as a diagnostic criterion of B-cell lymphoma. *Proc Natl Acad Sci USA* 1984;81:593-7.
- Waldmann TA, Davis MM, Bongiovanni KF, Korsmeyer SJ. Rearrangements of genes for the antigen receptor on T cells as markers of lineage and clonality in human lymphoid neoplasms. *N Engl J Med* 1985;313:776-83.
- Minden MD, Toyonaga B, Ha K, et al. Somatic rearrangement of T-cell antigen receptor gene in human T-cell malignancies. *Proc Natl Acad Sci USA* 1985;82:1224-7.
- Flug F, Pellicci PG, Bonetti F, Knowles DM, Dalla-Favera R. T-cell receptor gene rearrangements as markers of lineage and clonality in T-cell neoplasms. *Proc Natl Acad Sci USA* 1985;82:3460-4.
- Alt FW, Blackwell TK, Yancopoulos GD. Development of the primary antibody repertoire. *Science* 1987;238:1079-87.
- von Boehmer H. The developmental biology of T lymphocytes. *Ann Rev Immunol* 1988;6:309-26.
- Williams ME, Innes DJ, Borowitz MJ, et al. Immunoglobulin and T cell receptor gene rearrangements in human lymphoma and leukemia. *Blood* 1987;69:79-86.
- Sklar J, Weiss LM. Applications of antigen receptor gene rearrangements to the diagnosis and characterization of lymphoid neoplasms. *Ann Rev Med* 1988;39:315-34.
- Griesser H, Tkachuk D, Reis MD, Mak TW. Gene rearrangements and translocations in lymphoproliferative diseases. *Blood* 1989;73:1402-15.
- Carbone PP, Kaplan HS, Musshoff K, Smithers DW, Tubiana M. Report of the committee on Hodgkin's disease staging classification. *Cancer Res* 1971;31:1860-1.
- Bunn PA, Lamberg SJ. Report of the committee on

- staging and classification of cutaneous T-cell lymphomas. *Cancer Treat Rep* 1979;63:725-8.
24. Cartun RW, Coles FB, Patuszak WT. Utilization of monoclonal antibody L26 in the identification and confirmation of B-cell lymphomas: A sensitive and specific marker applicable to formalin- and BS-fixed, paraffin-embedded tissues. *Am J Pathol* 1987;129:415-21.
 25. Pulvertaft RJV. A study of malignant tumors in Nigeria by short-term tissue culture. *J Clin Pathol* 1965;18:261-71.
 26. Poiesz BJ, Ruscetti FW, Gazdar AF, Bunn FA, Minna JD, Gallo RC. Detection and isolation of type C retrovirus particles from fresh and cultured lymphocytes of a patient with cutaneous T-cell lymphoma. *Proc Natl Acad Sci USA* 1980;77:7415-9.
 27. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular cloning. A laboratory manual*. Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
 28. Southern EM. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J Mol Biol* 1975;98:503-32.
 29. Ravetch JV, Siebenlist U, Korsmeyer SJ, Waldmann TA, Leder P. Structure of the human immunoglobulin λ locus: characterization of embryonic and rearranged J and D genes. *Cell* 1981;27:583-91.
 30. Hieter PA, Maizel JV, Leder P. Evolution of human immunoglobulin KJ region genes. *J Biol Chem* 1982;257:1516-22.
 31. Hieter PA, Hollis GF, Korsmeyer SJ, Waldmann TA, Leder P. Clustered arrangement of immunoglobulin λ constant region genes in man. *Nature* (London) 1981;294:536-40.
 32. Yoshikai Y, Anatoniu D, Clark SP, et al. Sequence and expression of transcripts of the human T-cell receptor β -chain genes. *Nature* (London) 1984;312:521-4.
 33. Yoshikai Y, Toyonaga B, Koga Y, Kimura N, Griesser H, Mak TW. Repertoire of the human T cell gamma genes: high frequency of nonfunctional transcripts in thymus and mature T cells. *Eur J Immunol* 1987;17:119-26.
 34. Takihara Y, Champagne E, Griesser H, et al. Sequence and organization of the human T cell δ chain gene. *Eur J Immunol* 1988;18:283-7.
 35. Sugden B, Marsh K, Yates J. A vector that replicates as a plasmid and can be efficiently selected in B-lymphoblasts transformed by Epstein-Barr virus. *Mol Cell Biol* 1985;5:410-3.
 36. Manzari V, Wong-Siathi F, Franchini G, et al. Human T-cell leukemia-lymphoma virus (HTLV): cloning of an integrated defective provirus and flanking cellular sequences. *Proc Natl Acad Sci USA* 1983;80:1574-9.
 37. Marcu KB, Harris LJ, Stanton LW, Erikson J, Watt R, Croce CM. Transcriptionally active c-myc oncogene is contained within NIARD, a DNA sequence associated with chromosome translocations in B-cell neoplasia. *Proc Natl Acad Sci USA* 1983;80:519-23.
 38. Cline MJ. Biology of disease. Molecular diagnosis of human cancer. *Lab Invest* 1989;61:368-80.
 39. Korsmeyer SJ, Hieter PA, Sharrow SO, Goldman CK, Leder P, Waldmann TA. Normal human B cell display ordered light chain gene rearrangements and deletions. *J Exp Med* 1982;156:975-85.
 40. Korsmeyer SJ, Arnold A, Bakshi A, et al. Immunoglobulin gene rearrangement and cell surface antigen expression in acute lymphocytic leukemias of T cell and B cell precursor origins. *J Clin Invest* 1983;71:301-13.
 41. Knowles DM, Athan E, Ubrico A, et al. Extrnodal noncutaneous lymphoid hyperplasia represent a continuous spectrum of B-cell neoplasia: demonstration by molecular genetic analysis. *Blood* 1989;73:1635-45.
 42. Korsmeyer SJ, Hieter PA, Ravetch JV, Poplack DG, Waldmann TA, Leder P. Developmental hierarchy of immunoglobulin gene rearrangements in human leukemic pre-B-cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1981;78:7096-100.
 43. Davey MP, Bongiovanni KF, Kaulfersch W, et al. Immunoglobulin and T-cell receptor rearrangement and expression in human lymphoid leukemia cells at different stages of maturation. *Proc Natl Acad Sci USA* 1986;83:8759-63.
 44. Rojo-Medina J, Angeles-Angeles A, Palet-Guzmán JA, et al. Correlación clínico-pronóstica en el linfoma no-Hodgkin. Valoración de la nueva clasificación propuesta en un estudio retrospectivo. *Rev Inv Clin* 1986;38:15-20.
 45. Hul MF, Lam P, Dosch HM. Properties and heterogeneity of human fetal pre-B cells transformed by EBV. *J Immunol* 1989;143:2470-9.
 46. Taub R, Kirsch I, Morton C, et al. Translocation of the c-myc gene into the immunoglobulin heavy chain locus in human Burkitt lymphoma and murine plasmacytoma cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1982;79:7837-41.
 47. Pelicci PG, Knowles DM II, Magrath I, Dalla-Favera R. Chromosomal breakpoints and structural alterations of the c-myc locus differ in endemic and sporadic forms of Burkitt lymphoma. *Proc Natl Acad Sci USA* 1986;83:2984-6.
 48. Neri A, Barriga F, Knowles DM, Magrath I, Dalla-Favera R. Different regions of the immunoglobulin heavy-chain locus are involved in chromosomal translocations in distinct pathogenetic forms of Burkitt lymphoma. *Proc Natl Acad Sci USA* 1988;85:2748-52.
 49. Lombardi L, Newcomb EW, Dalla-Favera R. Pathogenesis of Burkitt lymphoma: expression of an activated c-myc oncogene causes the tumorigenic conversion of EBV-infected human B lymphoblasts. *Cell* 1987;49:161-70.
 50. Grooman JE, Sullivan JL, Mulder C, et al. Pathogenesis of B cell lymphoma in a patient with AIDS. *Blood* 1986;67:612-5.
 51. Subar M, Neri A, Inghirami C, Knowles DM, Dalla-Favera R. Frequent c-myc oncogene activation and infrequent presence of Epstein-Barr virus genome in AIDS-associated lymphoma. *Blood* 1988;72:667-71.
 52. Clevers H, Alarcón B, Wileman T, Terhorst C. The T cell receptor/CD3 complex: a dynamic protein ensemble. *Ann Rev Immunol* 1988;6:629-62.
 53. Davis MM, Bjorkman PJ. T-cell antigen receptor genes and T-cell recognition. *Nature* (London) 1988;334:395-402.
 54. Modlin RL, Pirmex C, Hofman FM, et al. Lymphocytes bearing antigen-specific $\gamma\delta$ -cell receptors accumulate in human infectious disease lesions. *Nature* (London) 1989;339:544-8.
 55. Lamb R, Bunn PA. T-cell lymphoreticular malignancies in adults. In: Magrath IT. *The non-Hodgkin's lymphomas*. Baltimore: Williams & Wilkins, 1990:330-51.
 56. Hara J, Benedict SH, Champagne E, et al. Relationship between rearrangement and transcription of the T-cell receptor α , β and γ genes in B-precursor acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 1989;73:500-8.
 57. Uckun FM, Muraguchi, Ledbetter JA, et al. Biphenotypic leukemic lymphocyte precursors in CD2⁺ and CD19⁺ acute lymphoblastic leukemia and their putative normal counterparts in human fetal hematopoietic tissues. *Blood* 1989;73:1000-15.

58. Raghavachar A, Thiel E, Hansen-Hagge TE, et al. Rearrangement of T cell receptor β , γ and δ gene loci in human pre-T cell acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia* 1989;3:613-8.
59. Bignon YJ, Soutteryand P, Roger H, et al. Dual genotype in cutaneous T-cell lymphomas and pseudolymphomas. *Human Genet* 1990;84:177-8.
60. Prieur M, Al-Achkar W, Aurias A, et al. Acquired chromosome rearrangements in human lymphocytes: effect of aging. *Human Genet* 1988;79:147-50.

ANEXO II

PRIMARY B CELL LYMPHOMA OF THE RECTUM IN A PATIENT COINFECTED WITH HIV-1 AND HTLV-I VIRUSES. Emma Verástegui *'*****, Venancio Ortega **, Carmen Soler ***, Sergio Lazo de la Vega *, Rodolfo Ocadiz **, Abelardo Meneses ****, Eduardo Reynoso *, and Guillermo Alfaro ***.

- * Clínica de Cáncer y SIDA, Departamento de Medicina Interna, Instituto Nacional de Cancerología.
- ** División de Investigación Básica, Instituto Nacional de Cancerología.
- *** Departamento de Inmunología, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México.
- **** Departamento de Patología, Instituto Nacional de Cancerología.
- ***** Corresponding author. Instituto Nacional de Cancerología, Avenida San Fernando 22, 14000 México D.F.

Running title: Rectal lymphoma in a coinfectd patient.

ABSTRACT

This report describes a clinical case of a large cell, immunoblastic plasmacytoid malignant B-cell lymphoma of the rectum in an AIDS patient coinfectd with HTLV-I. The malignant cells showed clonal genetic rearrangement of the HC (J_H) and LC_κ genes. Infection by EBV was demonstrated serologically and with slot blots using genomic DNA of the cancer cells. Southern blot analysis with DNA extracted from the lymphoma cells were negative for HTLV-I. The patient received seven cycles of VACO-B which induced complete but transient clinical remission of the tumor. The final outcome of the patient is unknown.

KEY WORDS: NHL, AIDS, COINFECTION, HTLV-I

LINFOMA B PRIMARIO DEL RECTO EN UN PACIENTE COINFECTADO
POR HIV-1 Y HTLV-I

RESUMEN

Este artículo describe el caso clínico de un enfermo con SIDA coinfectado por HTLV-I que desarrolló un linfoma B del recto, variedad sarcoma inmunoblástico con diferenciación plasmacitoide. Las células malignas mostraron arreglo clonal de los genes de las CP (J_H) y CL_κ. La infección por el VEB fué demostrada serológicamente y por hibridación de un monitor específico con el ADN genómico de las células cancerosas. No se detectaron secuencias de HTLV-I en el seno del tumor. Una remisión clínica completa, pero temporal, se obtuvo con siete ciclos de VACO-B. El enfermo abandonó el tratamiento y la sobrevida se desconoce.

PALABRAS CLAVE: LNH, SIDA, COINFECCION, HTLV-I

FOOTNOTES

Acknowledgments. We are grateful to Dr. A. Angeles and Dr. H. Dominguez for reviewing histological preparations. Also, we are indebted to Carla Archer for reviewing the manuscript, and to S. Campos and J. Aviles for art work.

This work was partially supported by grant P219CCOL891977 from CONACyT.

INTRODUCTION

The lymphotropic retroviruses HTLV-I (human T lymphotropic virus type I), human immunodeficiency viruses 1 and 2 (HIV-1, HIV-2) infect predominantly CD4⁺ T-cells and have been shown to be responsible for distinct nosological conditions (1-6). However, important differences in their mechanisms of action have been described. HTLV-I induce cellular regulatory changes which may be oncogenic (7, 8). On the other hand, HIV viruses are cytopathic and alter immune regulatory circuits (9, 10). Both, HTLV-I and HIV viruses follow similar pathways of transmission and perhaps because of this, coinfection may occur in high risk groups (11-14).

In this article we report a case of a patient with AIDS, B-cell non-Hodgkin's lymphoma (NHL) and seropositive for HTLV-I.

CASE REPORT

A forty nine years old male was admitted to the Instituto Nacional de Cancerologia in August of 1989 because of a rapidly growing and painful rectal tumor accompanied by fever, night sweats and weight loss. The patient was a widower from Acapulco, Mexico, who denied homosexuality and iv drug abuse (IVDA) but acknowledged female prostitutes as sexual partners. Three years before admittance he was surgically treated for a rectal abscess.

Physical examination revealed a cachectic middle aged male, with hepatomegaly and a firm nontender mass (10 cm) in hypogastrium. In the perineal region a firm, ulcerated and very painful tumor (8 X 7 cm) was detected. Hypochromic anemia (Hb 8.7 g/L) and increased LDH (1300 U/L) were present. High levels of seric gammaglobulins were detected by electrophoresis and further substantiated when independent values of IgM (13.8 g/L), IgG (60.2 g/L) and IgA (4.3 g/L) were determined.

Abdominal CT scan showed a tumor which infiltrated ileum and rectum; involvement of retroperitoneal lymph nodes and liver was also detected (Figure 1). A biopsy taken from the anal region diagnosed a high grade, large cell, immunoblastic plasmacytoid lymphoma (Figures 2A and 2B). The bone marrow was infiltrated by malignant lymphocytes. Clinically the lymphoma was in stage IVB according to the Ann Arbor scheme (15).

To determine the cell type, DNA was extracted from the tumor and analyzed in Southern blots. The distribution of DNA bands showed rearrangement of the heavy chain (HC) and κ light chain (LC) immunoglobulin genes (Figure 3A and B). The genes coding for λ LC, and the β , γ and δ subunits of the T-cell receptor (TCR) were in germinal configuration. These results clearly demonstrated that the cancer cells were mature B lymphocytes.

The presence of circulating antibodies against HIV-1 antigens was demonstrated by ELISA and Western blot (Figure 4A). The clinical, pathological and immunological findings indicated that the patient had developed AIDS. Additional serological tests revealed the presence of IgG antibodies against Epstein-Barr virus (EBV) capsid protein (VCA), early antigens (EA) and nuclear antigens (EBNA). Furthermore, EBV type A DNA sequences in the genome of the tumor were detected by slot blot hybridization (Figure 3D). Unexpectedly, positive reactions to HTLV-I antigenic determinants were obtained by ELISA, Western blot and immunoprecipitation of radioactively labelled viral proteins (Figure 4B and C). However, HTLV-I DNA was not found in Southern blots of the genome of the cancer cells (Figure 3C).

Chemotherapy with VACO-B (adriamycin 80 mg and cyclophosphamide 560 mg on week 1, and vincristine 2 mg and VP-16 160 mg on week 2.) was initiated in September 1989. After two weeks, the treatment was discontinued because the patient

developed pneumonia by Pneumocystis carinii. This complication was treated successfully with trimethoprim-sulfamethoxazole (15mg/Kg and 75mg/Kg respectively IV po q6h) allowing reinstatement of chemotherapy after two weeks. Complete clinical remission of the tumor was achieved after seven weeks. However, the patient failed to attend the hospital until the end of November. At the time of readmission the rectal tumor had recurred and disseminated to the inguinal lymph nodes and skin. Several attempts to reinstitute chemotherapy were unsuccessful because the patient could not afford travelling expenses between Acapulco and Mexico City. The final outcome of the patient is unknown.

DISCUSSION

The case presented in this article corresponds to an AIDS patient who consistently denied homosexuality, IVDA or blood transfusions. Pathology and molecular genetics studies revealed that the tumor was a high grade B-cell NHL harboring EBV sequences in the genome. Another important finding was the presence of antibodies against HTLV-I antigenic determinants in the serum of the patient.

Like other immunosuppressed patients, those infected with HIV tend to develop Kaposi sarcoma or NHL (16-18). The majority of NHL are high grade B-cell neoplasms, often extranodal and may be associated with EBV (19, 20). Some of the sites which are preferentially affected are the brain, rectum, lung and skin. In this respect, the immunological and molecular observations made in this patient are in agreement with the data discussed above.

In the early stages of HIV infection non-specific polyclonal B-cell expansions and hypergammaglobulinemia have been described (21, 22). Some of the mechanisms which have been proposed in the genesis of these abnormalities are: activation by viral agents such as EBV and cytomegalovirus (CMV) (20, 21), direct mitogenic effect of HIV or through the presence of diffusible products (22).

It should be emphasized that a potential role of EBV in the

genesis of lymphoma has been suggested on the basis of clinical and experimental data. First, neoplastic cells from the African form of Burkitt lymphoma contain EBV (23). Second, infection by this virus may result in polyclonal activation of B-cells (24). Third, in AIDS, infection by EBV and disruption of T-cell regulatory circuits may alter immune surveillance mechanisms and facilitate the development of neoplasia (25). Finally, some strains of EBV have the potential to transform lymphoid cells in vitro (26).

Other mechanisms relevant for the development of B-cell neoplasms, and in particular for lymphomas have been published by different groups. For example, the human B-lymphotrophic virus (HBLV) and the pleiotropic effect of CMYC translocations (27, 28) Of these two, we investigated CMYC and found it in normal genomic configuration (results not shown). This negative result does not rule out the possibility that increased rates in the level of transcription or unusually stable CMYC mRNA may have played a role in malignant transformation.

Coinfection by HIV and HTLV-I is not uncommon in countries endemic for the two types of viruses and occurs predominantly in individuals which are prone to develop AIDS (14, 29, 30). It must be emphasized that the specificity of the humoral immune response is not affected by coinfection (31). However, since the two viruses selectively infect CD4⁺ T-cells and the outcome of the

infection is significantly different, the characteristics of the cellular immune response remain unclear.

A synergistic effect between the two viruses was detected in vitro since cells infected with HTLV-I were more susceptible to be lysed by HIV (10). Coinfection is relatively common in some countries (29, 30, 32, 33); however, only a few cases of coinfecting individuals with hematological disorders have been published. Of these, two developed adult T-cell leukemia/lymphoma (ATLL) (34, 35) and two T-cell lymphocytosis (36, 37).

Our results confirm that infection by HTLV-I, even in immunosuppressed patients, do not necessarily lead to the development of ATLL (29, 30, 32, 33). In fact, the clinicopathological findings in this case were those of AIDS. It is possible that coinfection by HIV-1 and HTLV-I was the result of independent events. Therefore, if the time of infection was an important factor in the development of AIDS and not of ATLL, we would like to suggest that HTLV-I was acquired at a later time. Assuming that T-cells infected by HTLV-I infiltrated the tumor sample, our failure to detect them may have been determined by the limited sensitivity (1%) of the method used in this investigation. Furthermore, since this patient did not have a history of travelling outside the country and because individuals infected by HTLV-I have already been detected in Mexico (38), it may be possible that more cases will appear in the future.

Prospective studies including serological and molecular genetic techniques should be of great value to determine the existence and rate of dissemination of this virus.

REFERENCES

1. Poiesz BJ, Ruscetti FW, Gazdar AF, et al. Detection and isolation of type C retrovirus particles from fresh and cultured lymphocytes of a patient with cutaneous T-cell lymphoma. Proc Nat Acad Sci (USA) 1980; 77: 7415-9.
2. Gallo RC, Kalyanaraman VS, Sarngadharan MG, et al. Association of the human type C retrovirus with a subset of adult T-cell cancers. Cancer Res 1983; 43: 3892-9.
3. Barre-Sinoussi F, Chermann JC, Rey F, et al. Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for an acquired immunodeficiency syndrome (AIDS). Science 1983; 220: 868-71.
4. Schupbach J, Gilden RA, Sarngadharan MG, et al. Detection, isolation, and continuous production of cytopathic retroviruses (HTLV-III) from patients with AIDS and pre-AIDS. Science 1984; 224: 497-505.
5. Clavel F, Mansinho K, Chamaret S, et al. Human immunodeficiency virus type 2 infection associated with AIDS in West Africa. N Eng J Med 1987; 316: 1180-5.
6. Lazo AP, Tsiachlis PN. Biology and pathogenesis of retroviruses. Sem Oncol 1990; 17: 269-93.
7. Rosenblatt JD, Chen ISY, Wachsman W. Infection with HTLV-I and HTLV-II: evolving concepts. Sem Hematol 1988; 25: 230-46

8. Yip MT, Chen ISY. Modes of transformation by the human T-cell leukemia viruses. *Mol Biol Med* 1990; 7: 33-44.
9. Greene WC. Regulation of HIV-1 gene expression. *Ann Rev Immunol* 1990; 8: 453-75.
10. Valentine FT. Pathogenesis of the immunological deficiencies caused by infection with the human immunodeficiency virus. *Sem Oncol* 1990; 17: 321-34.
11. Braun MM, Heyward WL, Curran JW. The global epidemiology of HIV infection and AIDS. *Ann Rev Microbiol* 1990; 44: 555-77.
12. Murphy EL, Figueroa PJ, Gibbs WN, et al. Sexual transmission of human T-lymphotropic virus type I (HTLV-I). *Ann Int Med* 1989; 111: 555-60.
13. Lee HH, Weiss SH, Brown LS, et al. Patterns of HIV-1 and HTLV-I/II in intravenous drug abusers from the middle Atlantic and central regions of the USA. *J Infect Dis* 1990; 162: 347-52.
14. Sato H, Okochi K. Transmission of human T-cell leukemia virus (HTLV-I) by blood transfusion: demonstration of proviral DNA in recipients' blood lymphocytes. *Int J Cancer* 1986; 37: 395-400.
15. Carbone PP, Kaplan HS, Musshoff K, et al. Report of the committee on Hodgkin's disease staging classification. *Cancer Res* 1971; 31: 1860-1.
16. Penn I. Tumors of the immunocompromised patient. *Ann Rev Med*

- 1988; 39: 63-73.
17. Hymes KB, Cheung T, Greene JB, et al. Kaposi's sarcoma in homosexual men: a report of eight cases. *Lancet* 1981; 2: 598-600.
 18. Ziegler JL, Beckstead JA, Volberding PA, et al. Non-Hodgkin's lymphoma in 90 homosexual men. Relation to generalized lymphadenopathy and the acquired immunodeficiency syndrome. *N Engl J Med* 1984; 311: 565-70.
 19. Levine AM. Lymphoma in acquired immunodeficiency syndrome. *Sem Oncol* 1990; 17: 104-12.
 20. List AF, Greco F, Vogler LB. Lymphoproliferative disease in immunocompromised host: the role of Epstein-Barr virus. *J Clin Oncol* 1987; 5: 1673-89.
 21. Lane HC, Fauci AS. Immunologic abnormalities in the acquired immunodeficiency syndrome. *Ann Rev Immunol* 1985; 3: 477-500.
 22. Schnittman SM, Lane HC, Higgins SE, et al. Direct polyclonal activation of human B lymphocytes by the acquired immune deficiency syndrome virus. *Science* 1986; 233: 1084-6.
 23. Nakajima K, Martinez-Maza O, Hirano T, et al. Induction of IL-6 (B cell stimulatory factor-2/IFN- β 2) production by HIV. *J Immunol* 1989; 142: 531-6.
 24. de-Thé G, Geser A, Day NE, et al. Epidemiological evidence for causal relationship between Epstein-Barr virus

- and Burkitt's lymphoma from ugandan prospective study. Nature 1978; 274: 756-61.
25. Birx DL, Redfield RR, Tosato G. Defective regulation of Epstein-Barr virus infection in patients with acquired immunodeficiency syndrome (AIDS) or AIDS-related disorders. N Engl J Med 1986; 314: 874-9.
 26. Rickinson AB, Young LS, Rowe M. Influence of the Epstein-Barr virus nuclear antigen EBNA 2 on the growth phenotype of virus-transformed B cells. J Virol 1987; 61: 1310-7.
 27. Salahuddin SZ, Ablashi DV, Markham PD, et al. Isolation of a new virus, HBLV, in patients with lymphoproliferative disorders. Science 1986; 234: 596-601.
 28. Pelicci PG, Knowles DM, Arlin ZA, et al. Multiple monoclonal B-cell expansions and c-myc oncogene rearrangements in acquired immune deficiency syndrome-related lymphoproliferative disorders. Implications for lymphomagenesis. J Exp Med 1986; 164: 2049-60.
 29. Bartholomew C, Saxinger WC, Clark JW, et al. Transmission of HTLV-I and HIV among homosexual men in Trinidad. JAMA 1987; 257: 2604-8.
 30. Cortes E, Detels R, Aboulafia D, et al. HIV-1, HIV-2 and HTLV-I infection in high-risk groups in Brazil. N Eng J Med 1989; 320: 953-8.
 31. Kanner SB, Parks ES, Scott GB, Parks WP. Simultaneous

- infections with human T cell leukemia virus type I and the human immunodeficiency virus. *J Infect Dis* 1987; 155: 617-25.
32. Quinn TC, Zacarias FRK, St John RK. HIV and HTLV-I infections in the Americas: a regional perspective. *Medicine* 1989; 68: 189-209.
33. De Rossi A, Gassa OD, del Mistro AN, et al. HTLV-III and HTLV-I infection in populations at risk in the Veneto region of Italy. *Eur J Cancer Clin Oncol* 1986; 22: 411-8.
34. Baurmann H, Miclea JM, Ferchal F, et al. Adult T-cell leukemia associated with HTLV-I and simultaneous infection by human immunodeficiency virus type 2 and human herpesvirus 6 in an African woman: a clinical, virologic and familial serologic study. *Am J Med* 1988; 85: 853-7.
35. Shibata D, Brynes RK, Rabinowitz A, et al. Human T-cell lymphotropic virus type I (HTLV-I) associated adult T-cell leukemia-lymphoma in a patient infected with human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1). *Ann Int Med* 198 ; 111: 871-5.
36. Harper ME, Kaplan MH, Marselle LM, et al. Concomitant infection with HTLV-I and HTLV-III in a patient with T8 lymphoproliferative disease . *N Engl J Med* 1986; 315:1073-8.
37. Ehrlich GD, Davey FR, Kirshner JJ, et al. A polyclonal CD4⁺ and CD8⁺ lymphocytosis in a patient doubly infected with HTLV-I and HIV-1: a clinical and molecular analysis. *Am J Hematol* 1989; 30: 128-39.

38. Góngora-Biachi RA, González-Martínez P, Puerto F, et al. Micosis fungoides asociada al virus linfotrópico de células T humanas en Yucatán. *Rev Invest Clin* 1991; 43: 111.
39. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular cloning. A laboratory manual*. Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
40. Ravetch JV, Siebenlist U, Korsmeyer SJ, et al. Structure of the human immunoglobulin μ locus: characterization of embryonic and rearranged J and D genes. *Cell* 1981; 27: 583-91.
41. Hieter PA, Maizel JV, Leder P. Evolution of human immunoglobulin J region genes. *J Biol Chem* 1982; 257: 1516-22.
42. Wong-Staal F, Gallo RC. Human T-lymphotropic retroviruses. *Nature* 1985; 317: 395-403.
43. Sugden B, Marsh K, Yates J. A vector that replicates as a plasmid and can be efficiently selected in B-lymphoblasts transformed by Epstein-Barr Virus. *Mol Cell Biol* 1985; 5: 410-3.
44. Gosting LH, McClure J, Dickinson ES, et al. Monoclonal antibodies to gp110 and gp41 of human immunodeficiency virus. *J Clin Microbiol* 1987; 25: 845-8.

FIGURE LEGENDS

Figure 1. The CT scan shows the presence of an obliterating tumor of the rectum.

Figure 2. High grade, large cell, immunoblastic plasmacytoid lymphoma (H&E stain A:40X and B:100 X).

Figure 3. Genomic analysis of lymphoma cells. Panels A and B show the autoradiographs of Southern blots (39) made with control (C) and lymphoma DNA (P) digested with BamHI (B) or EcoRI (E) and hybridized with HC (J_H) and C_K molecular probes (40, 41). Rearranged DNA fragments are indicated with arrows. Panel C shows digests with SacI of DNA extracted from lymphoma cells (P), a non-lymphoid tumor ($_{\mu}C$) and HUT102 cells ($_{\mu}C$) hybridized with the HTLV-I probe (42). Panel D shows slot blots of DNA extracted from the patient (P), Raji cells ($_{\mu}C$) and from normal PBMC ($_{\mu}C$) hybridized with the EBV probe (43).

Figure 4. Serological analysis. Western blot was used to detect the presence of antibodies against HIV (panel A) and HTLV-I (panel B) in the serum of the patient (P); positive controls were included (C). Panel C shows immunoprecipitation of radioactively labelled HTLV-I proteins with serum from the patient (44).



Fig 1.

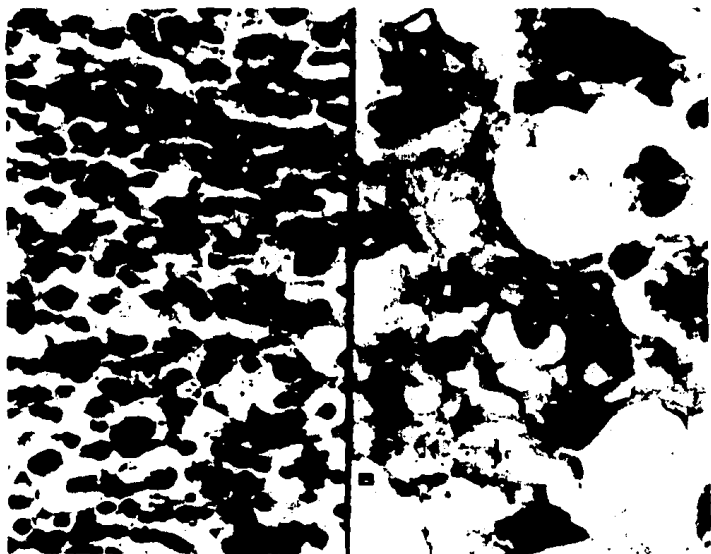


Fig 2.

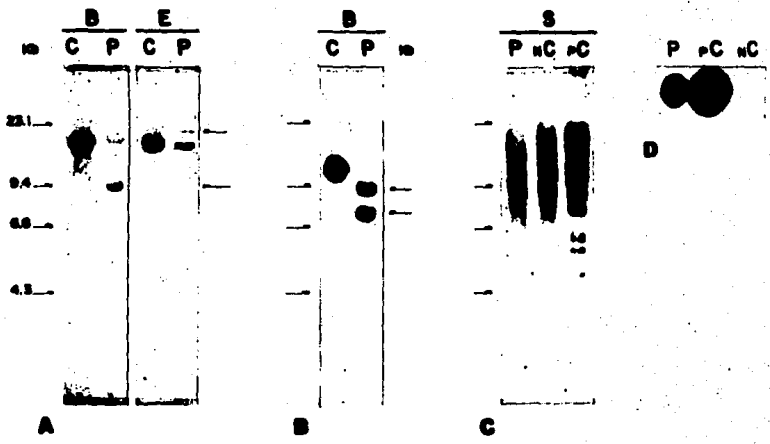


Fig. 3

