

Estudio de la asociación del virus de Epstein-Barr con los linfomas cutáneos de células

SUBTITULO TITULOS ALTERNATIVOS

A study of Epstein-Barr virus in cutaneous T-cell lymphomas.

AUTORES

T Rafael Botella-Estrada, Onofre Sanmartín, Sergio Almenar, Ramón Ma Pujol, Vicente Sabater, Federico Palomar, Amparo Sevilla, Adolfo Aliaga, Carlos Guillén

Palabras clave

Virus de Epstein-Barr, Linfomas cutáneos de células T, Hibridación in situ
NOMENCLATURA SALUDO TEXTOCOMPLETO

Abstract.--The Epstein-Barr virus (EBV) has been implicated in the etiopathogenesis of the following neoplasms: nasopharyngeal carcinoma, Burkitt's lymphoma and B-cell lymphomas arising in two settings of immunodeficiency: organ transplant recipients and HIV infection. EBV has also been demonstrated in several T-cell lymphomas in immunocompetent patients, although its exact relationship with these neoplasms has not been elucidated. Nevertheless, a study about the relationship between EBV and T-cell lymphomas in Spain is lacking. Due to the geographic differences in the prevalence of EBV infection, we decided to study the presence of this virus in a group of T-cell lymphomas.

In situ hybridization with a probe complementary to the EBER RNA of the EBV was performed in 25 T-cell lymphomas with cutaneous involvement. A combination of EBER in situ hybridization and immunohistochemistry was performed in three cases to identify the lineage of the infected cells. In situ hybridization was positive in 4 out of 7 angiocentric T-cell lymphomas: 1 primary cutaneous T-cell lymphoma, 1 paratesticular T-cell lymphoma with secondary cutaneous involvement, and 2 nasal T-cell lymphomas with secondary skin involvement. More than 80% of the cells were positive in the first and second cases, and double labelling showed that the cells stained with the EBV probe had a T-cell phenotype. In the remaining T-cell lymphomas, in situ hybridization rendered the following

results: 1/10 micosis fungoides, 2/2 angioimmunoblastic lymphadenopathies with cutaneous involvement, 0/1 lymphomatoid papulosis, 0/3 pleomorphic lymphomas, and 0/2 CD30+ anaplastic large cell lymphomas.

An agiocentric pattern of the neoplastic infiltrate is a common denominator of the EBV in situ hybridization positive cases. We suggest that EBV may induce the expression of some specific adhesion molecules in the infected cells that explain their tendency to arrange around blood vessels.

Key words: Epstein-Barr virus. Cutaneous T-cell lymphoma. In situ hybridation.

Aceptado el 12 de mayo de 1999.

* Este artículo fue galardonado con el accésit del Premio Ernest Schering España 1999.

Resumen.--El virus de Epstein-Barr (VEB) se ha demostrado implicado en la etiopatogenia de tumores como el carcinoma nasofaríngeo, el linfoma de Burkitt, y los linfomas B que aparecen en dos grupos de pacientes inmunodeprimidos: los pacientes trasplantados y los pacientes infectados por el virus de la inmunodeficiencia humana. Además, el VEB se ha detectado en varios grupos de linfomas T cutáneos en pacientes inmunocompetentes, aunque su implicación en estos casos no se encuentra aclarada. Sin embargo, no existen series procedentes de nuestro país que estudien la asociación del VEB y los linfomas, y dada la variabilidad geográfica en la prevalencia del virus nos pareció importante estudiar la presencia de material genético del VEB en un grupo de linfomas T cutáneos.

Mediante hidridación in situ con una sonda complementaria para la región EBER del VEB analizamos 25 linfomas de células T en los que existía participación cutánea. Asimismo realizamos una doble tinción con inmunohistoquímica e hibridación in situ en tres casos en los que la hibridación había sido positiva con la finalidad de conocer el fenotipo de células infectadas por el virus.

La hibridación resultó positiva en cuatro de los siete linfomas T angiocéntricos estudiados: un linfoma T cutáneo primario, un linfoma T paratesticular con afectación cutánea secundaria y dos linfomas T nasales con afectación cutánea secundaria. Más del 80% de las células resultaron marcadas en los dos primeros casos mencionados, y mediante doble marcaje se demostró que las células en donde se encontraba el VEB eran linfocitos T. En cuanto al resto de linfomas T hallamos los

siguientes resultados positivos: 1/10 micosis fungoides, 2/2 linfadenopatías angioinmunoblásticas con lesiones cutáneas, 0/1 papulosis linfomatoide, 0/3 linfomas pleomórficos y 0/2 linfomas anaplásicos de células grandes CD30+.

La principal conclusión del trabajo es que los casos en los que se detectó material genético del VEB tienen en común que sus infiltrados tumorales poseen un marcado carácter angiocéntrico. Esto mueve a especular que el VEB induce la expresión de determinadas moléculas de adhesión en las células a las que infecta que determinan la predilección vascular del infiltrado.

Palabras clave: Virus de Epstein-Barr. Linfomas cutáneos de células T. Hibridación in situ.

INTRODUCCIÓN

Virus de Epstein-Barr (VEB)

Generalidades sobre el VEB

El virus de Epstein-Barr fue identificado en 1964 en una línea celular establecida a partir de células de linfoma de Burkitt (1), un linfoma que había sido descrito 6 años antes por el médico irlandés Dennis Burkitt en niños ugandeses (2). Posteriormente, el VEB se identificó como el causante de la mononucleosis infecciosa.

El VEB pertenece a la familia de los virus herpes, recibiendo también el nombre de virus herpes humano tipo 4 (HHV-4). Como el resto de los virus de esta familia, una vez que el VEB infecta a las células de un individuo, permanece de forma latente en el huésped durante toda su vida. A partir de estudios serológicos sabemos que el VEB infecta a personas de todo el mundo, aunque su prevalencia es mayor en los países subdesarrollados y en los orientales (3). La infección suele ocurrir durante la infancia de forma asintomática, aunque en un grupo menor de pacientes, generalmente adolescentes, la primoinfección se acompaña de sintomatología, dando lugar al cuadro clínico de la mononucleosis infecciosa. El virus infecta inicialmente a las células epiteliales orofaríngeas y a partir de aquí pasa a los linfocitos B. Durante esta fase inicial hasta el 10% de los linfocitos sanguíneos resultan infectados, posteriormente se desencadena una respuesta inmune mediada por células T en el huésped, merced a la cual la mayoría de las células infectadas son destruidas, pero una pequeña proporción de linfocitos B quedan infectados de forma latente y expresan el material genético del VEB de forma indefinida. Estas células logran escapar a la respuesta inmune celular debido a una expresión muy reducida de antígenos del

VEB en su superficie y al desarrollo de mecanismos que interfieren con la producción de citocinas y con los mecanismos citotóxicos de los linfocitos T. Los individuos inmunocompetentes consiguen mantener la infección limitada a un pequeño porcentaje de células B durante toda su vida, pero a la vez constituyen el reservorio de la enfermedad, ya que periódicamente excretan el virus por la saliva permitiendo la diseminación de la infección.

El VEB transforma in vitro a los linfocitos B en líneas celulares linfocitoides que se dividen indefinidamente. Para ingresar en las células, el VEB se une al receptor de la porción del complemento C3d (que también recibe el nombre de CD21 o CR2) (4). Esta molécula es una glicoproteína de 120 kilodaltons que expresan todos los linfocitos B, y bajo ciertas condiciones también los linfocitos T (5) y las células epiteliales (6). De todas maneras la expresión de CD21 permite la absorción viral, pero la infección celular propiamente dicha parece ser que requiere además de la presencia en las células de moléculas accesorias y factores de transcripción.

Expresión de productos virales por las células infectadas por el virus Epstein-Barr

Durante el estado de latencia se expresan entre uno y 10 genes del virus. Los productos de estos genes incluyen seis proteínas nucleares del VEB (EBNA) y tres proteínas de membrana «latentes» (LMP). Todas estas proteínas se llaman «proteínas de transformación» ya que la infección in vitro de los linfocitos B lleva a la inmortalización de las células y a que los linfoblastos proliferantes expresen estas proteínas (7). De todas estas proteínas, EBNA2 y LMP1 son las que poseen poder transformante e inductor del crecimiento celular. La función de EBNA2 es activar la expresión de los genes celulares y virales, siendo fundamental para la transformación de los linfocitos B. LMP1 tiene la capacidad de inhibir la diferenciación y estimular el crecimiento de una gran variedad de tipos celulares transformando a las células en neoplásicas (linfocitos B, fibroblastos, etc.). Se ha demostrado que la expresión de LMP1 posee potencial oncogénico en ausencia de expresión de otros genes del VEB (8). Resulta interesante comprobar que estos efectos de LMP1 están mediados tanto por un incremento en la expresión de los receptores para el factor de crecimiento epidérmico como por una inhibición de la apoptosis. Esto último lo consigue LMP1 al estimular la expresión del gen bcl2, cuya misión es inhibir la apoptosis, preservando por tanto a las células del programa de muerte celular programada (9).

Cuando el VEB entra en fase lítica con la consiguiente producción de

viriones con poder infectivo empiezan a expresarse una serie de proteínas virales incluyendo varias enzimas implicadas en el metabolismo de los ácidos nucleicos y la síntesis de las proteínas de la cápside viral. La primera de estas proteínas se denomina ZEBRA y ocupa un punto clave ya que se une al DNA y activa al resto de genes implicados en la fase lítica (10). La ausencia de esta proteína puede tomarse como prueba de que el virus se encuentra en fase latente. Otras dos proteínas de la fase lítica son BCRF1, interesante por su gran semejanza con la interleucina 10 (11), y BHRF1, muy similar a bcl2, por lo que se especula que pudiera tener una función parecida a ésta, es decir, inhibir la apoptosis (12).

Por último debemos mencionar dos pequeños RNA, sin cadenas de poliadenina y que no codifican ninguna proteína, denominados EBER1 y EBER2 (EBER es un acrónimo derivado del nombre que en inglés reciben estos RNA: «Epstein-Barr virus early regions») (13, 14). Su tamaño es de 165 y 169 pares de bases, respectivamente, y se encuentran en número muy elevado en el núcleo de las células infectadas por VEB en estado latente.

EBER1 se une al DNA y es esencial para mantener el número de copias de VEB durante la división de las células infectadas. Por sus características de estabilidad y el alto número de copias de EBER1 por célula (10^6 - 10^7), la detección de EBER1 mediante hibridación in situ es el método más ampliamente utilizado para detectar la presencia de VEB en las células con infección latente.

Estados de latencia del VEB

Tras la convalecencia de la infección por el VEB los linfocitos B con infección latente expresan dos genes, EBNA1 y LMP2. EBNA1 es necesario para el mantenimiento del DNA viral en linfocitos que se están dividiendo activamente, y LMP2 permite que el virus permanezca en estado latente limitando la expresión de los genes del VEB. Además existen otros tres estados de latencia del VEB, conocidos como tipo I, II y III. En cada uno de estos estados se expresa un patrón de genes diferente y suponen una relación diferente entre la célula infectada y el virus (15). Es interesante conocer estos estados de latencia ya que las neoplasias que se han descrito asociadas al VEB pueden clasificarse según el estado de latencia en que se halla el virus (3).

El estado de latencia I se caracteriza por la expresión de la proteína EBNA1, siendo este estado característico del linfoma de Burkitt endémico o africano. En el estado de latencia II se expresan EBNA1, LMP1 y LMP2, y es el que se observa en las células epiteliales del carcinoma

nasofaríngeo, en las células de Reed- Sternberg de la enfermedad de Hodgkin y en las células neoplásicas de la mayoría del resto de carcinomas y linfomas con los que se ha asociado al VEB en individuos inmunocompetentes. Por último, el estado de latencia III se caracteriza por la expresión en las células infectadas de la mayoría o de todas las «proteínas de transformación», y es el fenotipo que suele encontrarse en las enfermedades linfoproliferativas, linfomas y carcinomas asociadas al VEB que se desarrollan en individuos inmunodeprimidos.

Métodos de detección del VEB en los tejidos

El Southern blot mediante sondas específicas para VEB que reconocen porciones del genoma del virus ha sido utilizado para la identificación del VEB en tumores. La mayor utilidad de esta técnica radica en la caracterización de la clonalidad de las células infectadas por el VEB. Debido a que el número de «repeticiones terminales» (secuencias idénticas de 500 pares de bases que sirven como lugares cohesivos durante la circularización del DNA para forma un episoma) es muy variable en cada episoma (16), este número se utiliza como un marcador clonal de cada episoma y de las células infectadas. El Southern blot se realiza con sondas complementarias para fragmentos de las «repeticiones terminales» y de las secuencias adyacentes. El hallazgo de una única banda en el Southern blot supone la existencia de un único tipo de episomas del VEB con un número fijo de repeticiones terminales, lo que sugiere que las células infectadas en un tejido representan la expansión clonal a partir de una única célula infectada. Cuando se trata del estudio de la relación entre el VEB y el cáncer, la existencia de clonalidad apoya el papel del virus en el desencadenamiento del tumor. Por el contrario, la aparición de múltiples bandas indica que existen episomas con un número variable de repeticiones terminales, lo que sugiere que la infección por el VEB ocurrió posteriormente al origen de la neoplasia, y apunta en el sentido de que la presencia del virus es un epifenómeno y no un factor directamente relacionado en la génesis del tumor.

La técnica de la reacción en cadena de polimerasa (PCR) cambió de forma radical las investigaciones para determinar la presencia del VEB en las células de distintos tejidos (17). Las ventajas de esta técnica son su gran sensibilidad y la posibilidad de aplicación a secciones tisulares incluidas en parafina. La PCR ha demostrado que el número de neoplasias asociadas al VEB es mayor de lo que realmente se creía. La descripción de dos RNA codificados por el virus de EBV, como son EBER1 y EBER2, de los que las células con infección latente poseen un

gran número de copias (entre 10^6 y 10^7) ha abierto nuevas posibilidades para la detección de las células infectadas por el VEB, alcanzando niveles de sensibilidad parecidos a los de la PCR (18). Con la hibridación in situ mediante una sonda antisentido que se une a los RNA mencionados se consigue la visualización de las células infectadas en muestras de tejido fijadas en formol e incluidas en parafina. Esto permite estudiar morfológicamente las células infectadas y caracterizar la estirpe a la que pertenecen mediante técnicas combinadas de inmunohistoquímica e hibridación in situ.

Por último, el desarrollo de una serie de anticuerpos frente a distintas proteínas expresadas por el VEB en sus distintos estados, como LMP1, EBNA2 y ZEBRA, ha permitido el desarrollo de técnicas de inmunohistoquímica que funcionan en tejido incluido en parafina y permiten detectar las células infectadas por el VEB, aunque con un nivel de sensibilidad menor que la hibridación in situ.

Con el desarrollo de la inmunohistoquímica y la hibridación in situ para la detección del VEB, la PCR ha quedado relegada a la discriminación entre las distintas especies del VEB y el Southern blot para estudiar si las células infectadas pertenecen a un mismo clon (3).

Evidencias sobre la implicación del virus Epstein-Barr en el linfoma de Burkitt y los linfomas de pacientes inmunodeprimidos

Desde su descubrimiento, el VEB ha sido hallado de forma casi constante en las células de la forma endémica africana del linfoma de Burkitt, así como en las células del carcinoma nasofaríngeo indiferenciado. Esta asociación virus-tumor planteó desde el comienzo el interrogante sobre la relación existente entre el VEB y los tumores, en el sentido de si el virus tenía un papel determinante en el desarrollo de la neoplasia o si era un mero acompañante que se encontraba infectando a los linfocitos pero no participaba en la génesis tumoral (7). En la actualidad, el papel del VEB en el desarrollo de estos dos tumores no ha sido completamente aclarado, aunque las evidencias apuntan a que la infección por el VEB constituye el paso limitante en la génesis de estas neoplasias.

Sin embargo, de todas las neoplasias con las que se ha asociado al VEB, aquellas en las que se ha demostrado de forma fehaciente la implicación del virus en su patogenia han sido las enfermedades linfoproliferativas B y linfomas B que ocurren en pacientes inmunodeprimidos [pacientes trasplantados en tratamiento inmunosupresor y pacientes infectados por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH)] (19). Esta asociación se basa en la

elevada frecuencia con que se detecta el VEB en las células de estos tumores, en la correlación de un determinado tipo tumoral con un patrón de expresión de proteínas virales y, por tanto, con un patrón de latencia fijo, y por último en la elevada frecuencia con la que se detecta monoclonalidad de las células neoplásicas con respecto a la infección por el VEB (3). Esto último, es decir, la demostración de que todas las células tumorales poseen un mismo tipo de episomas del VEB con el mismo número de «repeticiones terminales», significa que todas las células neoplásicas representan la expansión clonal de una única célula original con infección latente por el VEB. Por tanto, la clonalidad supone que la infección por el VEB se produjo antes del desarrollo tumoral y probablemente tuvo un papel en su desencadenamiento.

Sin embargo, el papel del VEB es menos claro en otros linfomas en los que se ha demostrado su presencia, como son el linfoma de Hodgkin (LH) y otros linfomas de estirpe T.

Existen varios datos en favor de la relación entre el VEB y el LH. El primer indicio sobre esta relación partió de la observación de niveles elevados de anticuerpos frente al VEB en pacientes con LH, así como el hecho de que una elevada proporción de pacientes con LH habían tenido una mononucleosis infecciosa (20). Mediante PCR e hibridación in situ se ha detectado material genético del VEB entre un 40 y un 80% de los LH (21-23).

Sin embargo, existen una serie de interrogantes sobre esta asociación. En primer lugar, la hibridación in situ mostró que en el 45% de casos la señal del VEB se limitaba a las células de Hodgkin y a las células de

Reed-Sternberg, mientras que en el 22% de casos el RNA del VEB se encontraba en los linfocitos de aspecto normal acompañantes y en el resto (33%) no se detectaba señal del virus (23). En segundo lugar se ha demostrado que la relación entre el virus y el LH varía dependiendo del área geográfica y del tipo histológico de la enfermedad. Así, en los estudios realizados en

Europa y los Estados Unidos se detectó la presencia de VEB en las células neoplásicas del 40-50% de los casos de LH, y la mayoría de estos casos pertenecían al tipo histológico de celularidad mixta (3). En los países menos desarrollados, y por tanto con una tasa de prevalencia de infección por VEB mayor, la frecuencia con que se ha encontrado el virus en las células neoplásicas es mayor y además no se restringe al tipo con celularidad mixta, sino que también se detecta en las células del tipo

histológico esclerosante nodular (24). Estos hechos, junto con el hallazgo del DNA del VEB mediante PCR en los tejidos linfáticos normales y reactivos, ha creado una serie de dudas sobre la relación entre el VEB y el LH (3). Para algunos autores la alta frecuencia de detección del virus en las células neoplásicas sólo refleja una expansión del grupo de linfocitos B infectados por el VEB debido a la disminución de la vigilancia inmunológica que ocurre en los pacientes con LH (25). Para otros autores, sin embargo, aunque la relación no se encuentra completamente aclarada, el hecho de haber encontrado en algunos casos DNA del VEB insertado clonalmente en el genoma de las células de Hodgkin, y la diferente frecuencia de infección hallada en los distintos tipos histológicos apuntaría a que el LH reúne distintas entidades que si bien tienen una misma apariencia clínica, en realidad responderían a diferentes causas, estando el VEB entre los agentes etiológicos de alguno de sus grupos (19).

Objetivos del presente trabajo

Lo anteriormente expuesto nos informa de la importancia del VEB y de sus relaciones, establecidas claramente en unos casos y controvertidas en otro, con diversos linfomas que sólo se manifiestan en la piel de forma secundaria y muy infrecuente. Pero existen un grupo de linfomas de células T que se originan en la piel (linfomas de células T cutáneos primarios) o que la afectan de forma secundaria, con los que se ha relacionado al VEB debido a que se ha identificado su material genético en las lesiones cutáneas, sin que de momento se encuentre aclarada la naturaleza de esta relación.

Es este trabajo nos hemos centrado en los linfomas T cutáneos dado que, excepto en pacientes inmunodeprimidos, en los que se ha encontrado una relación de los linfomas B con el VEB, fuera de este contexto el virus se ha relacionado primordialmente con los linfomas T. Dentro del grupo de los linfomas T existen diversas entidades, pero en lo tocante a la relación con el VEB aparecen dos grupos diferentes. Por una parte se encuentran los linfomas angiocéntricos, que es el grupo con el que se ha relacionado al VEB en más ocasiones, y en segundo lugar se sitúan otros linfomas T, incluyendo en este último grupo a otras entidades que no tienen más relación entre sí que el haber sido estudiadas por otros autores con anterioridad en cuanto a su relación con el VEB.

Los objetivos del presente trabajo fueron:

-- Estudiar la presencia del VEB en las lesiones cutáneas de un grupo amplio de linfomas T que reuniese entidades diferentes. Con esto pretendíamos conocer la frecuencia de asociación de este virus con los

linfomas T cutáneos en nuestro medio. Dado que la prevalencia de infección por el VEB varía ampliamente en las distintas partes del mundo y que la mayoría de estudios actuales que analizan la relación entre el VEB y los linfomas cutáneos proceden de los Estados Unidos o de países asiáticos, nos pareció relevante poseer una serie realizada en un país europeo como el nuestro.

-- Una vez determinados aquellos casos positivos para el VEB, realizamos un doble marcaje con inmunohistoquímica e hibridación in situ para determinar el fenotipo de las células infectadas por el VEB y analizar si se trataba de las células neoplásicas o son células acompañantes reactivas.

-- Por último realizamos un estudio de correlación entre aquellos linfomas cutáneos de células T en los que se demostró positividad para el VEB con sus características clinicopatológicas y con su evolución.

MATERIAL Y MÉTODOS

Material

El trabajo fue diseñado para estudiar la presencia del VEB a nivel celular mediante hibridación in situ con sonda antisentido frente a los RNA EBER1 y EBER2 del VEB en linfomas T cutáneos. Se incluyeron tanto linfomas T cutáneos primarios como otros tipos de linfomas T periféricos con afectación cutánea.

Se estudiaron 25 linfomas de células T:

- Siete linfomas T angiocéntricos (tres linfomas T angiocéntricos cutáneos primarios, dos linfomas T nasales con afectación cutánea, una granulomatosis linfomatoide y un linfoma T subcutáneo paniculocítico).
- Diez micosis fungoides.
- Tres linfomas T pleomórficos.
- Dos linfadenopatías angioinmunoblásticas.
- Dos linfomas T anaplásicos de células grandes CD30+.
- Una papulosis linfomatoide.

En un segundo tiempo se procedió a estudiar con un doble marcaje, inmunohistoquímica con anticuerpos pan-T y pan-B seguida de hibridación in situ para VEB, aquellos tres casos (un linfoma angiocéntrico, un linfoma T nasal con afectación cutánea y un caso de granulomatosis linfomatoide) en los que todas o la mayoría de las células tumorales se habían marcado con la sonda EBER.

Métodos

La hibridación in situ se realizó con una sonda PNA (peptide nucleic acid) complementaria para los dos RNA nucleares codificados por el VEB, EBER1 y EBER2 (Dako). En la sonda PNA el eje de ribosa fosfato del

DNA ha sido sustituido por una estructura de poliamida compuesta por unidades de N-(2-aminoetil)-glicina. Esta sonda tiene una serie de ventajas sobre las sondas convencionales de DNA en cuanto a su utilidad para diagnóstico, entre otras, una mayor estabilidad térmica, una gran resistencia frente a la degradación enzimática tanto de forma aislada como tras formar un complejo con el RNA diana, y una mayor velocidad de hibridación que las sondas de DNA, con lo que el tiempo total de la técnica de hibridación in situ se reduce de forma considerable. El procedimiento utilizado fue el siguiente: se prepararon secciones de tejido incluidas en parafina en portas previamente tratados con 3-aminopropiltrietoxisilano. Las muestras fueron desparafinadas con xileno y rehidratadas con sucesivas inmersiones en alcohol de 99° y 95°. Posteriormente las secciones fueron digeridas con proteinasa K a una concentración de

15 µg/ml en un buffer 50 mM Tris/HCl y 15 mM Na₃N con un pH 7,5 durante 30 minutos. A continuación, se realizaron dos lavados de 3 minutos en agua estéril y las secciones fueron deshidratadas nuevamente mediante una inmersión de 10 segundos en alcohol de 95°. Tras colocar las muestras en una cámara húmeda y dejarlas secar durante 5 minutos al aire se realizó la hibridación con 25 µl de la sonda PNA complementaria para EBER conjugada con fluoresceína. La hibridación se realizó durante 1 hora y media a una temperatura de 55° C. A continuación se realizó un lavado de 25 minutos en un baño precalentado a 55° C con una solución de tampón Tris salino (TBS) con 0,1% de Triton X-100. Posteriormente, las secciones fueron sumergidas durante 10 segundos en TBS a temperatura ambiente y se realizó una segunda incubación durante 30 minutos con un anticuerpo de conejo antifluoresceína conjugado con fosfatasa alcalina diluido 1:50 en TBS con 0,1% de Triton X-100 y 4% de albúmina sérica bovina. Tras dos lavados en TBS y dos en agua estéril se revelaron las secciones incubándolas durante 45 minutos y protegidas de la luz con una solución sustrato BCIP/NBT (5-bromo-4-cloro-3-indolilfosfato/nitroazul de tetrazolio) diluido 1:50 en una solución con tampón Tris 100 mM, NaCl 100 mM, MgCl₂ 50 mM y levamisol diluido 1:1.000 (como inhibidor de la fosfatasa alcalina endógena tisular). Finalmente se lavaron las secciones con agua, se tiñeron con hematoxilina durante 3 segundos, se lavaron de nuevo y se montaron con glycergel. Para evitar la degradación del RNA por RNasas tanto el material de vidrio como las gradillas utilizadas durante el procedimiento se esterilizaron en autoclave, el agua empleada

fue siempre agua estéril envasada herméticamente en botellas de 500 ml que se abrieron en el momento de su uso, y siempre se utilizaron guantes.

Las células marcadas con sonda se reconocieron por una tinción en forma de un punteado grueso en el núcleo de un color negro azulado. Como control positivo de la técnica se utilizó la sonda suministrada por el laboratorio Dako: PNA conjugada con fluoresceína dirigida frente a gliceraldehído 3 fosfato deshidrogenasa. Como control positivo adicional se añadió en cada ocasión una sección de un linfoma T angiocéntrico que mostró marcada positividad para VEB al poner a punto la técnica. Los controles negativos utilizados fueron el suministrado por el propio laboratorio (sonda control negativo PNA conjugado con fluoresceína) y una sección de un adenocarcinoma mamario.

En tres casos en los que se había detectado positividad con la sonda EBER se realizó en un segundo tiempo un doble marcaje para identificar el fenotipo de las células positivas con la sonda para el VEB. Para ello se realizó en primer lugar una tinción inmunohistoquímica con el anticuerpo pan-T UCHL-1 (CD45RO) y el anticuerpo pan-B L26 (CD20), seguido de la hibridación in situ con el procedimiento ya referido.

RESULTADOS

La tabla I resume los resultados de la hibridación in situ con sonda antisentido EBER ordenados según el tipo de patología. Un total de siete linfomas T (7/25: 28%) fueron positivos para el VEB siguiendo el procedimiento descrito. De todas las maneras dada la heterogeneidad de este grupo es preciso desglosarlo por patologías para entender mejor los resultados.

TABLA I: RESULTADOS DE LA HIBRIDACIÓN IN SITU CON SONDA ANTISENTIDO FRENTE AL RNA EBER DEL V EN LINFOMAS T CUTÁNEOS

Tipo de linfoma (número de casos)	Número de casos positivos (con relación al total)	Porcentaje de células
Micosis fungoide (10)	1 (1/10)	15%
Linfomas T angiocéntricos (7)		
-- Linfoma T cutáneo primario (3)	1 (1/3)	80%
-- Linfoma T nasal con afectación cutánea (2)	2 (2/2)	25,50%
-- Linfoma T paratesticular (1)	1 (1/1)	85%
-- Linfoma T subcutáneo paniculocítico (1)	0 (0/1)	--
Linfoma T pleomórfico (3)	0 (0/3)	--
Linfadenopatía angioinmunoblástica (2)	2 (2/2)	10%, 25%
Linfoma T anaplásico de células grandes CD30+ (2)	0 (0/2)	--
Papulosis linfomatoide (1)	0 (0/1)	--

Referente a los linfomas T angiocéntricos, cuatro de los siete casos estudiados fueron positivos (57%). En todos ellos se demostró mediante inmunohistoquímica la presencia de un fenotipo T (CD3+, UCHL-1+ CD20-) (Fig. 1). Cuatro de los siete casos fallecieron y en tres de ellos la hibridación fue positiva (tabla II). Refiriéndonos en concreto a los linfomas T primarios cutáneos, en el único caso (de un total de tres) que resultó positiva la hibridación in situ, la mayoría de las células neoplásicas resultaron marcadas (Fig. 2 A). Las células tumorales de este caso tenían un notable tropismo por los vasos, y se podía apreciar el punteado característico que da la sonda en el núcleo de las células tumorales que se encontraban permeando la pared vascular (Fig. 2 B). Éste fue uno de los casos en los que realizamos una doble tinción, observando en un gran número de células un doble marcaje con el anticuerpo pan-T y la sonda para VEB (Fig. 2 C). Aunque en algunas áreas se observaron células T con hibridación negativa y también a la inversa, es decir, células con el punteado nuclear oscuro característico de la hibridación positiva pero que no se teñían con el anticuerpo pan-T, en ningún caso encontramos células que se marcasen como linfocitos B y que fuesen identificadas también por la sonda EBER (Fig. 2 D).

TABLA II: EVOLUCION DE LOS PACIENTES EN CUYOS LINFOMAS SE DETECTO LA PRESENCIA DE RNA DEL VEB

	Edad / sexo	Afectación extracutánea	Tratamiento	Evolución
Linfomas T angiocéntricos (4)				
-- Linfoma T cutáneo primario (1)	63/V	Órbita	Quimioterapia corticoides sistémicos	Muere por hemorragia digestiva
-- Linfoma T(1) paratesticular con afectación cutánea (2)	47/V	Pulmón, hígado MO, ganglios, etc.	Quimioterapia	Muere por diseminación tumoral
-- Linfoma T nasales con afectación cutánea (2)	85/V	No	Radioterapia, corticoides sistémicos	Muere por meningitis tuberculosa
	65/M	Inicios con lesiones en paladar	Radioterapia, cirugía	Vive con lesiones cutáneas
Micosis fungoide (1)	42/M	No	PUVA + interferón	Remisión
Linfadenopatía angioinmunoplástica (2)	71/M	Ganglionar inicial	Quimioterapia	No conocida
	77/M	Ganglionar inicial	Quimioterapia	No conocida

A

B

C

FIG. 1.--A) Aspecto necrótico de una lesión de uno de los pacientes incluidos en el estudio con un linfoma T angiocéntrico cutáneo primario. B) El estudio histológico de una de estas lesiones mostró cómo el infiltrado tumoral se disponía alrededor de los vasos e infiltrando la pared de éstos (100*). C) El estudio inmunohistoquímico con el anticuerpo pan-T UCHL-1 (CD45RO) demostró que las células tumorales tenían un fenotipo T (100*).

A

B

C

D

FIG. 2.--A) Hibridación in situ con sonda EBER de la pieza de biopsia cuya histología y aspecto clínico se muestran en la figura 1. Se aprecia cómo la mayoría de las células del infiltrado tumoral resultaron marcadas con la sonda (100*). B) Detalle de la anterior en la que se aprecia cómo los linfocitos marcados con la sonda EBER infiltran la pared de los vasos (400*). C) Doble marcaje con inmunohistoquímica con el anticuerpo pan-T UCHL-1 (CD45RO) y sonda EBER, donde se observa que las células marcadas con la sonda tienen un fenotipo T (flechas) (400*). D) Doble marcaje con inmunohistoquímica con el anticuerpo pan-B L26 (CD20) y sonda EBER, donde vemos que las células marcadas con la sonda EBER son diferentes de las que se tiñen con el anticuerpo pan-B (200*). El paciente que debutó con un linfoma T paratesticular falleció 12 meses

después debido a la diseminación de su linfoma. La histología mostró un infiltrado compuesto por células linfoides atípicas dispuestas en la dermis y el tejido celular subcutáneo y que invadían la pared de los vasos de pequeño, mediano y gran tamaño. En este caso, además de la inmunohistoquímica, se realizó reordenamiento genético que confirmó la existencia de monoclonalidad para el gen de la cadena gamma del receptor de célula T. La hibridación in situ para el VEB fue masivamente positiva, marcándose más del 80% de las células tumorales. Los resultados de la doble tinción fueron los mismos que en el caso descrito del linfoma T primario cutáneo angiocéntrico, es decir, que la mayoría de células positivas con la hibridación in situ se marcaron con el anticuerpo pan-T y, sin embargo, ningún linfocito B mostró evidencia de contener RNA del VEB.

Otros dos linfomas angiocéntricos correspondían a dos pacientes que iniciaron su linfoma con lesiones de localización nasal y en paladar duro respectivamente. La inmunohistoquímica demostró que en ambos casos la estirpe de las células tumorales era T. Durante la evolución de su proceso en ambos casos aparecieron lesiones cutáneas diseminadas. La hibridación fue positiva en los dos, aunque en ninguno de ellos el porcentaje de células marcadas fue tan mayoritario como en los otros dos linfomas angiocéntricos ya comentados. Se realizó doble marcaje en uno de estos casos, y los resultados apoyaron lo ya comentado, es decir, que fueron las células tumorales T las que resultaron marcadas.

Respecto al único caso de linfoma T subcutáneo incluido en el estudio, el paciente presentaba una historia de nódulos eritematosos de meses de evolución localizados en las extremidades inferiores, que posteriormente se extendieron al tronco y a los brazos a la vez que se desarrollaba un síndrome hemofagocítico. La biopsia mostró la presencia de un linfoma subcutáneo angiocéntrico T, y junto al infiltrado tumoral se apreciaban células histiocíticas con fenómeno de hemofagocitosis. El paciente falleció por una hemorragia masiva. El resultado de la hibridación in situ fue negativo.

Del resto de linfomas T analizados (tabla I) nos parece importante recalcar cuatro puntos: 1) sólo en uno de los 10 casos estudiados de micosis fungoide se halló RNA de VEB, y en este caso la positividad fue focal, limitada a un grupo de células localizadas alrededor de un vaso en una papila dérmica (Figs. 3 A y B); 2) se incluyeron en el estudio dos casos de linfadenopatía angioinmunoblástica con afectación cutánea, y en ambos casos la hibridación fue positiva, aunque en unos porcentajes aproximados del 10 y 25% de las células, respectivamente (Fig. 3 C); 3)

en ninguno de los tres linfomas pleomórficos cutáneos se detectó la presencia en las células de material genético del VEB, y 4) tanto los dos casos de linfoma anaplásico de células grandes CD30+ como un caso de papulosis linfomatoide que estudiamos fueron negativos en la hibridación. El caso de papulosis linfomatoide incluido en este estudio se trataba de una paciente con lesiones típicas de esta enfermedad y con una histología correspondiente al tipo A de Willemze de la papulosis linfomatoide, en la cual llamaba la atención la angiocentricidad del infiltrado.

A

B

FIG. 3.--A) Hibridación in situ con sonda EBER de un caso de micosis fungoide en donde se aprecia un grupo de células distribuidas alrededor de un vaso en una papila dérmica que resultaron marcadas con la sonda (100×). B) Detalle de la anterior a mayor aumento (200×). C) Un porcentaje pequeño de las células de una lesión cutánea de un linfoma T del tipo linfadenopatía angioinmunoblástica resultan marcadas con la sonda EBER (200×).

DISCUSION

Nuestro estudio se ha centrado en los linfomas cutáneos de células T (LCCT) (26, 27), y dentro de este grupo en aquellos linfomas en los cuales se ha demostrado previamente una relación con el VEB. Para ello dividimos los LCCT en dos grupos: el de los linfomas angiocéntricos, que recoge distintas entidades, y un grupo heterogéneo que reúne otros tipos de LCCT que no tienen una característica que los defina, como son la micosis fungoide, el linfoma T pleomórfico, el linfoma anaplásico de células grandes CD30+ y la papulosis linfomatoide. Hemos incluido en este segundo grupo dos casos de linfadenopatía angioinmunoblástica con afectación cutánea, ya que aunque no se trata de un linfoma cutáneo primario, la piel resulta afectada con elevada frecuencia y otros estudios han demostrado la presencia material genético del VEB en este tumor. Por tanto, el grupo de estudio es muy heterogéneo, pero esto responde a lo infrecuentes que son muchos de estos linfomas en nuestro medio, y de hecho para realizar esta serie hemos reunido casos procedentes de tres hospitales diferentes.

El término «linfoma angiocéntrico» recoge distintas entidades cuyo denominador común es la existencia, en el estudio histológico, de

infiltración de la pared vascular por parte de las células tumorales, llegando en ocasiones a destruirla por completo. Los linfomas con este patrón histológico se presentan clínicamente con una elevada frecuencia de localización extraganglionar y frecuentes lesiones cutáneas en forma de nódulos y tumores que se manifiestan con ulceración o aspecto isquémico debido a la oclusión vascular que están motivando las células linfomatosas. Sin embargo, el término linfoma angiocéntrico no es una entidad en sí misma, sino que recoge linfomas derivados de tres líneas de linfocitos conocidos: T, B y NK, que tienen como denominador común un patrón histológico «angiocéntrico».

Un grupo importante de linfomas angiocéntricos son los que se denominan actualmente linfomas nasales de células T/NK (denominados anteriormente «granuloma centrofacial» o «granuloma de línea media») y su contrapartida extranasal, linfomas de «tipo nasal» (nasal-type) T/NK (28, 29). El inmunofenotipo que suelen mostrar las células de este tipo de linfomas es CD56+, CD2+, y generalmente CD3- en la superficie celular. El reordenamiento genético del receptor de células T es negativo en la mayoría de casos. La mayoría de los linfomas nasales de células T/NK muestran positividad para el RNA EBER del VEB, de tal forma que se ha sugerido que este virus tiene un papel etiológico en estas neoplasias (29-31). Clínicamente estos linfomas se caracterizan por el desarrollo frecuente de lesiones en la mucosa nasofaríngea y en la piel. Otros órganos que se afectan con frecuencia son el tracto digestivo y los testículos. El desarrollo de un síndrome hemofagocítico es una de las complicaciones que ocurren con frecuencia y que ensombrecen el pronóstico, que de todas formas es malo, con supervivencias medias inferiores a 1 año (28).

Existe un grupo de linfomas angiocéntricos primarios cutáneos con manifestaciones clínicas similares a las descritas para los CD56+, y que podría equipararse al linfoma T/NK extranasal. Algunos de estos linfomas presentan marcadores pan-T y el CD56 es negativo, pero en otros casos este último marcador no se realizó (32, 33). Se trata de linfomas que se inician con una o múltiples lesiones cutáneas en forma de nódulos o tumores que con mucha frecuencia están ulcerados y en algunos casos en el transcurso de la enfermedad aparecen lesiones nasales. El pronóstico de estos linfomas es asimismo malo (33). El VEB se ha detectado en más del 90% de los linfomas nasofaríngeos, tanto en las lesiones mucosas como en las lesiones cutáneas secundarias; sin embargo, el VEB se detecta en las células tumorales de los linfomas angiocéntricos primarios cutáneos con mucha menor frecuencia (34, 35).

La granulomatosis linfomatoide (GL) es una entidad que actualmente se encuentra sujeta a estudio. Para algunos autores se trata de una enfermedad linfoproliferativa, mientras que para otros se trata de un linfoma desde su inicio (36). Sus principales características son la afectación pulmonar y la disposición angiocéntrica y tendencia angiodestructiva de su infiltrado neoplásico. La piel junto con otros órganos como el cerebro o el riñón son otras de las localizaciones características de esta enfermedad. Aunque inicialmente se agrupó junto con el resto de linfomas angiocéntricos (principalmente con la reticulosis polimorfa o granuloma de línea media) bajo la denominación de «lesiones inmunoproliferativas angiocéntricas» (36), los datos más recientes separan a la GL. Esto se debe a que varios grupos han demostrado mediante técnicas de reordenamiento genético que en esta enfermedad las células neoplásicas son linfocitos B y que son estos mismos linfocitos B los que están infectados por el VEB (37-39). Los linfocitos T, aunque constituyen el tipo celular predominante en la GL, sólo formarían parte de la respuesta inflamatoria acompañante. Por tanto, la idea actual es que la mayoría de las GL son linfomas B ricos en células T y que el VEB se encuentra infectando a las células neoplásicas B. De todas formas, aun manteniendo esto como norma general, algunos autores han mostrado que las células neoplásicas pueden tener tanto un fenotipo B como T (40). Pese a estas diferencias, la GL tiene en común con el resto de linfomas angiocéntricos una serie de características, tanto clínicas (afectación frecuente de la piel y el tejido celular subcutáneo, clínica agresiva con mal pronóstico) como histológicas (necrosis, angiocentricidad), además de su asociación con el VEB.

La relación entre el VEB y la micosis fungoide ha sido objeto de varios trabajos. Frente a un grupo de estudios en los que no se detectó la presencia de material genético del virus (32, 33, 41, 42), al menos en otros tres trabajos se ha identificado el VEB en el tejido tumoral. Anagnostopoulos y cols. encontraron DNA mediante PCR en nueve de 42 casos de micosis fungoide (21,4%) y la hibridación con sonda complementaria para EBER fue positiva en cuatro casos (9,5%) (43). Peris y cols. identificaron DNA del VEB mediante PCR en uno de los dos casos examinados de micosis fungoide (44). Sin embargo, la hibridación in situ para detectar EBER fue negativa, y en dos de 22 muestras de piel normal analizadas con PCR también encontraron DNA del VEB. En un estudio reciente procedente de Francia se detectó la presencia de EBER en el 39% de una muestra de 65 pacientes con LCCT epidérmotropos (micosis fungoide y síndrome de Sézary) (45). Curiosamente, el

porcentaje de positividad fue mayor en las muestras tomadas de pacientes que estaban siendo o habían sido tratados con interferón alfa (39% de positividad) que en enfermos que no habían seguido este tratamiento (14%). De todas formas, y a diferencia de lo descrito en otros linfomas en los que se ha hallado el VEB, en los casos de micosis fungoide en los que la hibridación fue positiva se encontraron pocas células infectadas.

Entre los linfomas T periféricos, el linfoma pleomórfico y la linfadenopatía angioinmunoblástica son las dos entidades en las que se ha encontrado infección por el VEB en una mayor proporción de casos. Aunque no se hace referencia expresa a porcentaje de casos con afectación cutánea, en el estudio más amplio publicado, con 203 linfomas de células T periféricos procedentes de una universidad alemana y estudiados con hibridación con sonda EBER (46), se encontró que el 50% de las linfadenopatías angioinmunoblásticas (16 de 32) presentaban infección por el virus. Además no sólo las células tumorales eran positivas, sino que en la mayoría de ocasiones existía infección concomitante de los linfocitos B presentes en el infiltrado inflamatorio acompañante. En otro estudio realizado con la misma técnica (47), 11 de 19 casos de linfadenopatía angioinmunoblástica mostraron células positivas para el RNA EBER del VEB, y los autores concluían que al menos en este tipo de linfomas la infección por el VEB es más una consecuencia que una causa de la enfermedad. Algo similar ocurría en el estudio alemán mencionado con los linfomas T pleomórficos periféricos (46), de los cuales se analizaron 88 casos y 33 de ellos fueron positivos (37,5%). Los autores de este trabajo resaltaron el hecho de que en la mayoría de los tumores considerados positivos el porcentaje de células neoplásicas en las que se identificó el virus fue inferior al 20% del total y sólo en 10 de los 88 linfomas T pleomórficos (11%) se encontró positividad en todas o en la mayoría de las células neoplásicas. En un trabajo publicado en el mismo año en el que sólo se incluyeron linfomas T primarios cutáneos (43), el mismo grupo mostró positividad para el EBER en tres de siete linfomas T pleomórficos, apareciendo marcadas la mayor parte de las células tumorales en dos casos.

El linfoma T subcutáneo paniculocítico es una entidad de reciente descripción (48) que clínicamente se presenta en forma de nódulos subcutáneos, localizados sobre todo en las extremidades, y que tanto clínica como histológicamente cuando se examina a pequeño aumento presenta marcado parecido con una paniculitis. El infiltrado tumoral se dispone en el tejido celular subcutáneo, afectando tanto a los septos

como a los lobulillos grasos, y con frecuencia afecta también a la pared de los vasos, lo que le asemeja con los linfomas angiocéntricos. Algunos de los pacientes con este tipo de linfoma desarrollan un síndrome hemofagocítico reactivo, que suele ser fatal. El fenotipo de las células tumorales puede ser tanto T como NK, y en varios casos se ha detectado material genómico del VEB integrado en el DNA de las células tumorales. Respecto a los linfomas T anaplásicos de células grandes CD30+ los pocos casos estudiados han sido negativos cuando se trata de linfomas cutáneos primarios (43, 49), pero, sin embargo, se ha detectado la presencia de material genético del virus en los linfomas T anaplásicos de células grandes CD30+ ganglionares (49).

En lo concerniente a la papulosis linfomatoide, el estudio más amplio publicado es el de Sangüeza y cols., quienes analizaron 31 biopsias de papulosis linfomatoide pertenecientes a 24 pacientes con esta enfermedad mediante hibridación in situ para detectar EBER e inmunohistoquímica con anticuerpos anti-LMP-1 (50). No encontraron evidencias del VEB en ninguna de las biopsias. Los resultados son relevantes para estudiar la relación existente entre la papulosis linfomatoide y otras enfermedades con las que se ha asociado o hacia las que puede evolucionar, como son el LH y el linfoma anaplásico de células grandes CD30+. Con respecto a este último, coincide la papulosis linfomatoide en la ausencia de material genético del VEB; sin embargo, en lo concerniente al LH parece que aunque son enfermedades con fenotipos similares (principalmente por la similitud histológica de la papulosis linfomatoide del tipo A de Willemze y el LH), sus mecanismos etiopatogénicos, al menos en lo referente al VEB, difieren. Korbjuhn y cols. obtuvieron los mismos resultados negativos al analizar 22 casos de papulosis linfomatoide con la misma metodología (46).

En el año 1997 se publicó un trabajo realizado en Japón con el mismo objetivo que el nuestro, es decir, analizar las características clinicopatológicas de las enfermedades cutáneas linfoproliferativas asociadas al VEB (51). Los resultados mostraron tres grupos principales de desórdenes linfoproliferativos cutáneos de células T/NK asociadas al VEB: linfomas angiocéntricos, erupciones faciales vesiculopapulosas a tipo hidroa vacciniforme y linfomas subcutáneos asociados a hemofagocitosis. Nuestros resultados son similares en cuanto a la elevada frecuencia con la que se detecta el VEB en los linfomas angiocéntricos (4/4 en aquel trabajo, 4/6 en el nuestro), y por el contrario la rareza con la que se halla en la micosis fungoide (1/17 en el estudio referido, 1/10 en el presente), los linfomas de células T anaplásicos (0/2

en aquél y también 0/2 en éste) y otros linfomas T periféricos, a excepción de los linfomas subcutáneos asociados a hemofagocitosis que fueron los únicos tres casos positivos de un total de 15 linfomas T periféricos en el estudio mencionado. El único linfoma subcutáneo con hemofagocitosis incluido en nuestra serie resultó negativo. Una diferencia sustancial entre ambas series radica precisamente en la existencia de ciertas patologías asociadas al VEB que sólo se observan en ciertas latitudes, y en este grupo podemos incluir a las erupciones faciales papulovesiculosas de la infancia simulando al hidroa vacciniforme, que se han descrito principalmente en pacientes de Asia y Méjico. Estas zonas geográficas son diferentes de las que corresponden al linfoma de Burkitt y el carcinoma nasofaríngeo, que se observan principalmente en África, por lo que la elevada endemia del VEB y la temprana infección por este virus no serían suficiente explicación. Se cree por ello que podrían influir determinados rasgos genéticos o bien otros factores ambientales para justificar la distribución geográfica de esta enfermedad.

Nuestros resultados muestran una fuerte asociación entre el VEB y un grupo de linfomas angiocéntricos. En concreto, es llamativo comprobar el marcaje con la sonda EBER de la casi totalidad de las células neoplásicas en el caso del linfoma T angiocéntrico de inicio paratesticular (que posteriormente dio metástasis cutáneas y en otros múltiples órganos) y en uno de los linfomas T angiocéntricos primarios cutáneos. Además, como hemos mostrado en las figuras con el doble marcaje, sólo los linfocitos T albergan el RNA EBER del VEB, siendo llamativa la negatividad de los linfocitos B. Por tanto, al menos en un grupo de linfomas angiocéntricos parece claro que el VEB juega un papel en el desarrollo tumoral, sólo de esta forma puede explicarse que el virus esté limitado al componente celular neoplásico y respete, sin embargo, a los linfocitos B pese a ser estos últimos los que de forma natural alojan al VEB cuando se encuentra en estado latente.

Sin embargo, en el caso de otros linfomas en los que se detectó el genoma del VEB en un porcentaje pequeño de células, y sólo en algunos casos esporádicos, nuestra opinión es que el virus es un espectador casual en el contexto de la neoplasia. En este sentido el mejor ejemplo es el de la micosis fungoide, de la que estudiamos 10 casos y únicamente en uno de ellos pudimos observar la presencia en un grupo celular dispuesto alrededor de un vaso y en contigüidad con la unión dermoepidérmica del VEB. Estos resultados son completamente superponibles a los de otros autores al estudiar la micosis fungoide (43, 51). Se plantean una serie de interrogantes interesantes en estos casos,

pero al no haber realizado doble marcaje no podemos ser concluyentes sobre la estirpe a la que pertenecen los linfocitos infectados. Existe la posibilidad de que aun siendo linfocitos T, los linfocitos infectados por el virus no fuesen tumorales pero contribuyesen de alguna forma, como puede ser mediante la producción de citocinas, al origen y/o mantenimiento de la neoplasia.

La correlación de los casos en los que la hibridación fue positiva con su patrón histológico pone de manifiesto la asociación del virus con linfomas que histológicamente destacan por la predilección de las células tumorales por las estructuras vasculares. Así lo demuestra el hecho de que las distintas entidades recogidas en el grupo de los linfomas angiocéntricos hayan sido relacionadas con el VEB. Además, otros linfomas T como la linfadenopatía angioinmunoblástica, que se caracterizan por la riqueza de estructuras vasculares, también presentan con frecuencia material genético del VEB en sus células. Como dato curioso ya hemos mencionado que las células que resultaron marcadas en uno de los casos de micosis fungoide se encontraban dispuestas alrededor de uno de los vasos de las papilas dérmicas. Es posible, por tanto, y queda como uno de los puntos abiertos a estudio, que la infección por el VEB lleve a los linfocitos a expresar moléculas de adhesión que priman la disposición perivascular y la infiltración de la pared de los vasos.

CONCLUSIONES

- Un elevado porcentaje (57%) de los linfomas angiocéntricos que estudiamos albergaban material genético del VEB en sus células neoplásicas.
- En los tres linfomas angiocéntricos que estudiamos con doble marcaje encontramos que las células en las que se identificó el material genético del VEB eran linfocitos T.
- Confirmamos los resultados de otros grupos respecto a la baja frecuencia de detección del virus en los casos de micosis fungoide y la ausencia del virus en dos entidades relacionadas como son los linfomas anaplásicos de células grandes CD30+ y la papulosis linfomatoide.
- La última y principal conclusión es que aquellos casos que se marcaron con la sonda del VEB tienen en común un marcado carácter angiocéntrico de sus infiltrados tumorales, lo que hace especular que el virus induce la expresión de determinadas moléculas de adhesión en las células a las que infecta, lo cual determinaría la particular disposición de las células neoplásicas.

BIBLIOGRAFÍA

1. Epstein MA, Achong BG, Barr YM. Virus particles in cultured lymphoblasts from Burkitt's lymphoma. *Lancet* 1964;i:702-3.
2. Burkitt DB. Sarcoma involving jaws in African children. *Br J Surg* 1958;46:218-23.
3. Anagnostopoulos I, Hummel M. Epstein-Barr virus in tumours. *Histopathology* 1996;29:297-315.
4. Fingerroth JD, Weis JJ, Tedder TF, Strominger JL, Biro PA, Feraron DT. Epstein-Barr virus receptor of human B lymphocytes is the C3d receptor CR2. *Proc Natl Acad Sci USA* 1984;81:4510-4.
5. Fischer E, Delibrias C, Kazatchkine MD. Expression of CR2 (the C3dg/EBV receptor, CD21) on normal human peripheral blood T lymphocytes. *J Immunol* 1991;146:865-9.
6. Sixbey JW, Nedrud JG, Raab Traub N, Hanes RA, Pagano JS. Epstein-Barr virus replication in oropharyngeal epithelial cells. *N Engl J Med* 1984;310:1225-30.
7. Smith RD. Is Epstein-Barr virus a human oncogene or only an innocent bystander? *Hum Pathol* 1997;28:1333-5.
8. Kulwichit W, Edwards RH, Davenport EM, Baskar JF, Godfrey V, Raad-Traub N. Expression of the Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 induces B cell lymphoma in transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998;95:11963-8.
9. Henderson S, Rowe M, Gregory C y cols. Induction of bcl-2 expression by Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 protects infected B cells from programmed cell death. *Cell* 1991;65:1107-15.
10. Miller G. The switch between latency and replication of Epstein-Barr virus. *J Infect Dis* 1990;161:833-44.
11. Vieira P, De Waal Malefyt R, Dang MN, y cols. Isolation and expression of human cytokine synthesis inhibitory factor cDNA clones: homology to Epstein-Barr virus open reading frame BCRF1. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991;88:1172-6.
12. Oudejans JJ, Van den Brule AJ, Jiwa NM, y cols. BHRF1, the Epstein-Barr virus (EBV) homologue of the BCL-2 protooncogene, is transcribed in EBV-associated B-cell lymphomas and in reactive lymphocytes. *Blood* 1995;86:1893-902.
13. Lerner MR, Andrews NC, Miller G, Steitz JA. Two small RNAs encoded by Epstein-Barr virus and complexed with protein are recipitated by antibodies from patients with systemic lupus erythematosus. *Proc Natl Acad Sci USA* 1981;78:805-9.
14. Glickman JN, Howe JG, Steitz JA. Structural analyses of EBER1

- and EBER2 ribonucleoprotein particles present in Epstein-Barr virus infected-cells. *J Virol* 1988;62: 902-11.
15. Moss DJ, Schmidt C, Elliot S, y cols. Strategies involved in developing an effective vaccine for EBV-associated diseases. *Adv Cancer Res* 1996;59:213-45.
 16. Raab Traub N, Flynn K. The structure of the termini of the Epstein-Barr virus as a marker of clonal cellular proliferation. *Cell* 1986;47:883-9.
 17. Herbst H, Niedobitek G, Kneba M, y cols. High incidence of Epstein-Barr virus genomes in Hodgkin's disease. *Am J Pathol* 1990;137:13-8.
 18. Wu TC, Mann RB, Epstein JI, y cols. Abundant expression of EBER1 small nuclear RNA in nasopharyngeal carcinoma. A morphologically distinctive target for detection of Epstein-Barr virus in formalin-fixed paraffin-embedded carcinoma specimens. *Am J Pathol* 1991;138:1461-9.
 19. LeBoit PE. Epstein-Barr virus and lymphomatoid papulosis. *Arch Dermatol* 1996;132:335-7.
 20. Mueller N, Evans A, Harris NL, y cols. Hodgkin's disease and Epstein-Barr virus. Altered antibody pattern before diagnosis. *N Engl J Med* 1989;320:689-95.
 21. Herbst H, Niedobitek G, Kneba M, y cols. High incidence of Epstein-Barr virus genomes in Hodgkin's disease. *Am J Pathol* 1990;137:13-8.
 22. Wrihgt CF, Reid AH, Tsai MM, y cols. Detection of Epstein-Barr virus sequences in Hodgkin's disease disease by the polymerase chain reaction. *Am J Pathol* 1991;139: 393-8.
 23. Hummel M, Anagnostopoulos I, Dallenbach F, Korbjuhn P, Dimmler C, Stein H. EBV infection patterns in Hodgkin's disease and normal lymphoid tissue: expression and cellular localization of EBV gene products. *Br J Haematol* 1992;82:689-94.
 24. Ambinder RF, Browning PJ, Lorenzana I, y cols. Epstein-Barr virus and childhood Hodgkin's disease in Honduras and the United States. *Blood* 1993;81:462-7.
 25. Masih A, Weisenburger D, Duggan M, y cols. Epstein-Barr viral genome in lymph nodes from patients with Hodgkin's disease may not be specific to Reed-Sternberg cells. *Am J Pathol* 1991;139:37-43.
 26. Willemze R, Kerl H, Sterry W, y cols. EORTC classification for primary cutaneous lymphomas: a proposal from the cutaneous lymphoma study group of the European organization for research and treatment of cancer. *Blood* 1997;90:354-71.
 27. Sander CA, Kind P, Kaudewitz P, Raffeld M, Jaffe ES. The revised European-American Classification of Lymphoid Neoplasms (REAL): a new perspective for the classification of cutaneous lymphomas. *J Cut*

- Pathol 1997;24: 329-41.
28. Ansai S, Maeda K, Yamakawa M, y cols. CD56 positive (nasal-type T/NK cell) lymphoma arising on the skin. *J Cut Pathol* 1997;24:468-76.
29. Jaffe ES, Chang JKC, Su I-J, y cols. Report of the workshop on nasal and related extranodal angiocentric T/natural killer cell lymphomas. *Am J Surg Pathol* 1996;20:103.
30. Tsang WYW, Chan JKC, Yip TTC, y cols. In situ localization of Epstein-Barr virus encoded RNA in non-nasal/nasopharyngeal CD56-positive and CD56-negative T-cell lymphoma. *Hum Pathol* 1994;25:758.
31. Chan JKD, Yip TTC, Tsang WYW, y cols. Detection of Epstein-Barr viral RNA in malignant lymphomas of the upper aerodigestive tract. *Am J Surg Pathol* 1994;18:938-46.
32. Su IJ, Tsai TF, Cheng AL, Chen CC. Cutaneous manifestations of Epstein-Barr virus-associated T-cell lymphoma. *J Am Acad Dermatol* 1993;29:685-92.
33. Tsai TF, Su IJ, Lu YC, y cols. Cutaneous angiocentric T-cell lymphoma associated with Epstein-Barr virus. *J Am Acad Dermatol* 1992;26:31-8.
34. Park CK, Ko YH. Detection of EBER nuclear RNA in T-cell lymphomas involving the skin-an in situ hybridization study. *Br J Dermatol* 1996;134:488-93.
35. Bagot M, Wechsler J. Le virus d'Epstein-Barr et les lymphomes T cutanés. *Ann Dermatol Venereol* 1997;124:446-7.
36. Medeiros LJ, Peiper SC, Elwood L, Yano T, Raffeld M, Jaffe ES. Angiocentric immunoproliferative lesions: a molecular analysis of eight cases. *Hum Pathol* 1991;22:1150-7.
37. Nicholson AG, Wotherspoon AC, Diss TC, y cols. Lymphomatoid granulomatosis: evidence that some cases represent Epstein-Barr virus-associated B-cell lymphoma. *Histopathology* 1996;29:317-24.
38. Guinee DJ, Jaffe E, Kingma D, y cols. Pulmonary lymphomatoid granulomatosis. Evidence for a proliferation of Epstein-Barr virus infected B-lymphocytes with a prominent T-cell component and vasculitis. *Am J Surg Pathol* 1994;18:753.
39. Madison J, Cooper D, Howe G, y cols. Lymphomatoid granulomatosis of the skin and lung: an angiocentric T-cell-rich B-cell lymphoproliferative disorder. *Arch Dermatol* 1996;132:1464-70.
40. Myers JL, Kurtin PJ, Katzenstein ALA, y cols. Lymphomatoid granulomatosis: evidence of immunophenotypic diversity and relationship to Epstein-Barr virus infection. *Am J Surg Pathol* 1995;19:1300-12.
41. Brice SL, Jester JD, Friednasch M, y cols. Examination of cutaneous

T-cell lymphoma for human herpes viruses by using the polymerase chain reaction. *J Cut Pathol* 1993;20:304-7.

42. Angel CA, Slieter DN, Royds JA, Nelson SNP, Bleehen SS. Absence of Epstein-Barr viral encoded RNA (EBER) in primary cutaneous T-cell lymphoma. *J Pathol* 1996;178: 173-5.

43. Angnostopoulos I, Hummel M, Kaudewitz P, Korbjuhn P, Leoncini L, Stein H. Low incidence of Epstein-Barr virus presence in primary cutaneous T-cell lymphoproliferations. *Br J Dermatol* 1996;134:276-81.

44. Peris K, Niedermeyer H, Cerroni L, Radaskiewicz T, Chimenti S, Höfler H. Detection of Epstein-Barr virus genome in primary cutaneous T and B cell lymphomas and pseudolymphomas. *Arch Dermatol Res* 1994;286:364-8.

45. Jumbou O, Huet S, Bureau B, Litoux P, Dréno B. Recherche de l'Epstein-Barr virus par hybridation in situ chez 65 malades atteints de lymphomes cutanés T épidermotropes. *Ann Dermatol Venerol* 1998;125:90-3.

46. Korbjuhn P, Anagnostopoulos I, Hummel M, y cols. Frequent latent Epstein-Barr virus infection of neoplastic T cell and bystander B cells in human immunodeficiency virus-negative European peripheral pleomorphic T-cell lymphomas. *Blood* 1993;82:217-23.

47. Khan G, Norton AJ, Slavin G. Epstein-Barr virus in angioimmunoblastic T-cell lymphomas. *Histopathology* 1993;22:145-9.

48. González CL, Medeiros LJ, Brazier RM, Jaffe ES. T-cell lymphoma involving subcutaneous tissue. A clinicopathologic entity commonly associated with hemophagocytic syndrome. *Am J Surg Pathol* 1991;15:17.

49. Peris K, Niedermeyer H, Chimenti S, Radaskiewicz T, Kerl H, Höfler H. Detection of Epstein-Barr virus in cutaneous and lymph nodal anaplastic large cell lymphomas (Ki-1+). *Br J Dermatol* 1995;133:542-6.

50. Sangüeza OP, Galloway J, Eagan PA, Brazier RM, Gulley ML. Absence of Epstein-Barr virus in lymphomatoid papulosis: an immunohistochemical and in situ hybridization study. *Arch Dermatol* 1996;132:279-82.

51. Iwatsuki K, Ohtsuka M, Harada H, Han G, Kaneko F. Clinicopathologic manifestations of Epstein-Barr virus-associated cutaneous lymphoproliferative disorder. *Arch Dermatol* 1997;133:1081-6.