



Técnicas de inmunohistoquímica

Discrepancias y correlaciones en los resultados entre la inmunohistoquímica y la biología molecular*

J.R. Riera

Servicio de Anatomía Patológica, Hospital Valle del Nalón, Asturias.

INTRODUCCIÓN

El invento de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en 1983 y el desarrollo de técnicas de desenmascaramiento antigénico en 1991 han permitido a los patólogos la utilización de los tejidos fijados en formol y embebidos en parafina para realizar todo tipo de técnicas diagnósticas, bien sea con inmunohistoquímica o con técnicas de genética molecular. Estas técnicas han sido más frecuentemente empleadas en orden a establecer el diagnóstico de malignidad o para identificar un determinado tipo de tumor. El descubrimiento de los mecanismos íntimos que regulan el crecimiento celular ha permitido, además, emplear la inmunohistoquímica y la biología molecular para otros objetivos relacionados con el grado de agresividad de los tumores malignos.

En esta revisión se intenta exponer algunas de las dificultades inherentes a la integración de la biología molecular y la inmunohistoquímica, ya que no siempre van en la misma dirección. De hecho, hemos de tener en cuenta que en muchos casos las técnicas de biología molecular no pueden utilizarse para confirmar las observaciones inmunohistoquímicas.

Los factores que pueden explicar la falta de correspondencia de los resultados inmunohistoquímicos con los de las técnicas de biología molecular pueden agruparse en dos grandes categorías: factores de orden técnico y factores que tienen que ver con la interpretación de los resultados propiamente dichos.

La sensibilidad de los procedimientos inmunohistoquímicos varía significativamente dependiendo del estado en que se encuentren los epítomos que se quieren demostrar. Éstos dependen fundamentalmente de los procedimientos a

*Presentado en el 1^{er} Curso de Patología Molecular, CUN, junio de 2000.

los que han sido sometidos los tejidos. Por otro lado, en cuanto a los criterios de interpretación, siempre es difícil establecer cuándo un determinado caso es positivo, qué intensidad de tinción se necesita y qué número de células es obligatorio observar para etiquetar un determinado caso como positivo. La unificación, tanto de los patrones de tinción para cada antisuero como el umbral de intensidad mínimo, ha de ser establecida claramente. Por otro lado, las técnicas de biología molecular también se encuentran bajo el influjo de factores técnicos similares a los descritos para la inmunohistoquímica. El tipo de fijador y el tiempo de fijación, por ejemplo, son factores que influyen en los ácidos nucleicos y su preservación. Otra de las causas más frecuentes de falta de correspondencia entre la detección de productos génicos y sus genes son las modificaciones postraslacionales que se producen en numerosas proteínas (1).

Son también bastante subjetivos algunos diagnósticos que se hacen con técnicas moleculares cuando se trata, sobre todo, de interpretar bandas electroforéticas: ¿cómo de clara debe ser definida la banda?, ¿cuál debe ser la anchura para considerar el caso como positivo?, etc.

El diagnóstico de malignidad en los linfomas nos puede proporcionar algunos ejemplos interesantes de la correlación y diferencias que existen entre la inmunohistoquímica y la biología molecular. Estudiaremos, a continuación, las discrepancias referidas a la clonalidad y a las traslocaciones cromosómicas t(14;18) y t(2;5). Esta exposición se completa con la discusión de algunos problemas que surgen en torno a la correlación de los resultados de la inmunohistoquímica y de la biología molecular, y del gen MIC2.

CONTRIBUCIÓN DE LA INMUNOHISTOQUÍMICA FRENTE A LOS ESTUDIOS DE GENÉTICA MOLECULAR A LOS LINFOMAS DE LINFOCITOS B

El estudio histológico de los linfomas malignos y leucemias sigue siendo esencial. En algunos casos puede ser insuficiente para completar el diagnóstico, siendo necesario recurrir a estudios inmunofenotípicos y de genética molecular. Los estudios inmunofenotípicos, por medio de citometría de flujo o inmunohistoquímica, usualmente representan el primer paso en el trabajo diagnóstico de linfomas y leucemias. Las técnicas de genética molecular son un segundo paso que usualmente se efectúan después de que los estudios inmunofenotípicos han sido completados. En este artículo solamente estudiaremos la contribución de la inmunohistoquímica a la demostración de clonalidad en las neoplasias de linfocitos B frente a la biología molecular.

Desde el punto de vista de la inmunohistoquímica podemos afirmar, con las limitaciones correspondientes, que una determinada proliferación de linfocitos B es monoclonal cuando muestra restricción de cadenas ligeras de inmunoglobulinas, coexpresa además marcadores de linfocitos B, CD43, o bien se observan linfocitos B fuera de sus lugares habituales en los tejidos (alteración de la inmunoarquitectura).

La demostración de restricción de cadenas ligeras de inmunoglobulinas en trastornos linfoproliferativos de linfocitos B es una de las formas más específicas de identificar una neoplasia y de descartar un proceso reactivo. Muchos patólogos de EE.UU. todavía creen que el tejido congelado es más adecuado para la demostración de restricción de cadenas. La experiencia es bastante mala en cuanto a la evaluación de estos cortes en congelación, dado que es difícil establecer la relación que existe entre cadenas kappa y lambda, y mucho más demostrar cuáles son las células que expresan o no estas cadenas. Es preferible, por lo tanto, trabajar con material fijado en formol y embebido en parafina, o fijado en B5, que también da buenos resultados (2). Los problemas surgen cuando intentamos determinar la presencia de estas cadenas en la superficie de los linfocitos, sobre todo en aquellos casos en los cuales no hay expresión citoplásmica de cadenas ligeras. Con métodos de recuperación antigénica adecuados, como el calentamiento con *buffer* citrato y posterior digestión enzimática, o bien sólo con digestión enzimática o sólo con calentamiento, se pueden obtener resultados excelentes con tinción, tanto de células plasmáticas en sus citoplasmas como de los linfocitos que se encuentran en el centro del folículo, así como de aquellos que están localizados en el manto (3). Se han demostrado casos monotípicos en un 84% de los linfomas de linfocitos B. Siempre se recomienda la utilización de cadenas ligeras policlonales y no monoclonales. Precisamente por este hecho de la utilización de anticuerpos policlonales muchos autores tienen grandes dudas respecto a la interpretación de los patrones de membrana. A veces la tinción de

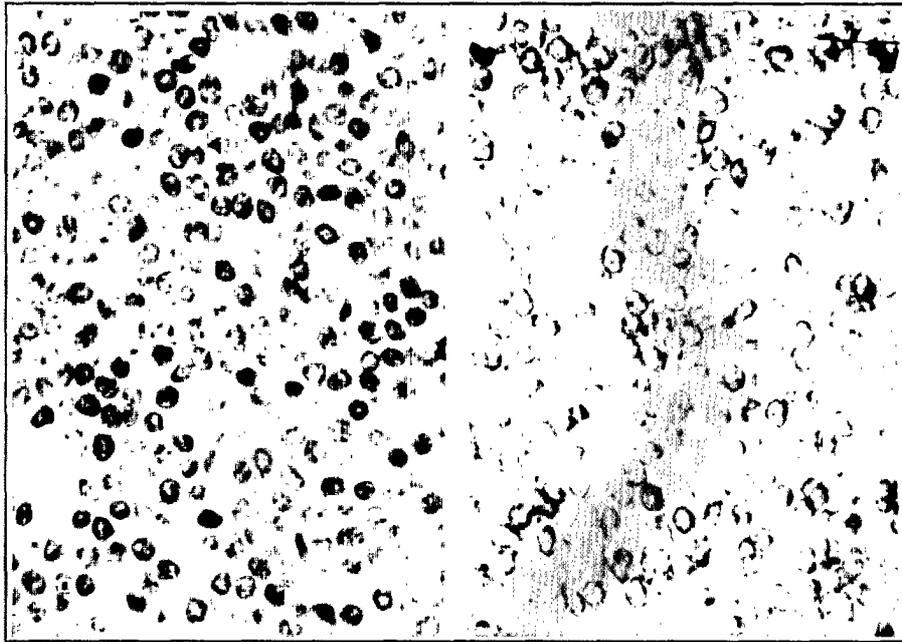


Figura 1. Restricción de cadenas lambda (izquierda) en un linfoma de la zona marginal esplénico.

fondo intersticial de las inmunoglobulinas semeja la positividad de membrana; esto ocurre particularmente en los linfomas de la zona marginal, pero hemos visto casos incluso de linfomas de células grandes con este problema. Por eso es mucho más fiable la interpretación de la tinción citoplásmica como indicador de expresión de inmunoglobulinas kappa o lambda en las células neoplásicas (4) (Fig. 1).

Se ha afirmado que la coexpresión de CD43 en linfocitos B es un rasgo inmunofenotípico sugestivo de malignidad, que incluso tiene el mismo valor que la detección de monoclonalidad.

El antígeno CD43 es una proteína glucosilada de la superficie celular más comúnmente encontrada en linfocitos T e histiocitos. Los linfocitos B no neoplásicos son negativos para CD43. No obstante, hemos de tener en cuenta que en el seno de una mononucleosis infecciosa pueden ser positivos. La importancia diagnóstica de la expresión de CD43 es grande, dado que es la alteración inmunofenotípica más común en neoplasias de linfocitos B. Hay varios anticuerpos monoclonales para CD43, como Leu-22, MT1 y DF51. Nosotros utilizamos Leu-22 (Becton-Dickinson, San José, CA), con excelentes resultados. El criterio para determinar positividad es la presencia de más del 10% de las células marcadas con un patrón característico de tinción de membrana (Fig. 2).

La frecuencia de expresión de CD43 en linfomas de células B no Hodgkin es la siguiente: el 96% en linfomas linfocíticos pequeños de linfocitos B, el 94% en linfomas de células del manto, el 22% en linfomas linfoplasmocitoides, el 29% en linfomas de células marginales, y solamente un 2% en linfomas foliculares. Los linfomas de células B grandes difusos tienen un porcentaje del 28%. El linfoma de Burkitt alcanza un 100% en algunas series. Como puede observarse por estos datos, la mayoría de los linfomas del manto y los de células pequeñas son positivos para CD43, por lo cual éste es un elemento de diagnóstico muy importante. Parece claro también que los linfomas de Burkitt son positivos para CD43, lo que puede contribuir a diferenciarlos de los linfomas de células B de alto grado *Burkitt like*, que no expresan con esta frecuencia CD43 (5).

Si tenemos en cuenta la restricción de cadenas ligeras y la coexpresión de CD43 podemos observar que, en general, los linfomas de células pequeñas coexpresan CD43, y en estos casos es más difícil demostrar restricción de cadenas; mientras que los linfomas que no expresan CD43, que son los de células grandes, suelen tener expresión de cadenas ligeras en los citoplasmas.

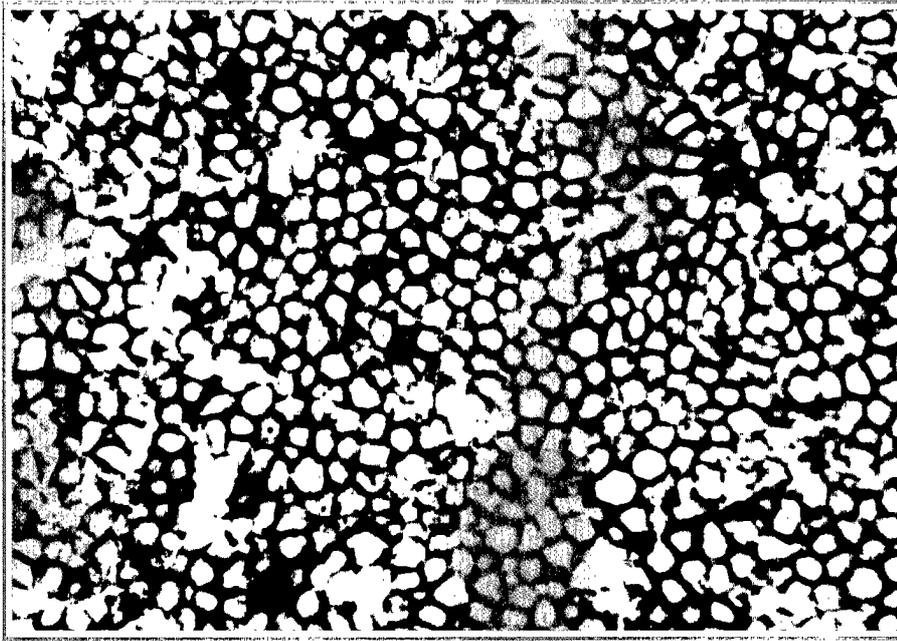


Figura 2. Coexpresión de CD43 (Leu 22) en una leucemia linfocítica crónica. Patrón de tinción de membrana de todas las células proliferantes.

El proceso de reordenamiento génico no está implicado en el desarrollo de malignidad en las células linfoides. Por ello la demostración de reordenamiento génico puede observarse en ausencia de malignidad. Además el reordenamiento génico puede detectarse en pacientes que tengan compromiso del sistema inmunitario, como es el caso de los sujetos sometidos a un trasplante y de los pacientes con sida.

En líneas generales, en pacientes inmunocompetentes que desarrollan proliferaciones linfoides la detección de reordenamiento génico debe representar del 1% al 5% de todas las células en una biopsia, lo cual es el límite de sensibilidad del *Southern blot*. Este porcentaje se correlaciona altamente con linfoma maligno.

Con *Southern blot* tenemos una primera limitación: precisamos DNA, de tejido fresco o congelado. Como hemos mencionado anteriormente, necesitamos al menos de un 1% a un 5% del total de la población celular para que esta técnica sea sensible. Para propósitos diagnósticos únicamente es aplicable el reordenamiento de IgH, y en el caso de los linfocitos T, de TCR β . Si los resultados con reordenamiento de IgH son poco claros, se estudia también el gen de Ig κ . Es ésta una técnica que normalmente no se aplica de forma rutinaria (6).

Técnicas de PCR pueden ser empleadas en tejido fijado en formol e incluido en parafina. Sólo se necesitan pequeñas cantidades de DNA de no muy alta calidad para que la técnica dé resultado. El análisis con PCR se dirige siempre a IgH o a TCR γ en el caso de procesos linfoproliferativos de linfocitos T. El problema de la PCR son los resultados falsos negativos. En el caso de los linfomas foliculares las hipermutaciones somáticas no facilitan la unión de los *primers* al DNA, pero la sensibilidad de la técnica es importante. Hemos de tener en cuenta que para la determinación de reordenamiento génico esta sensibilidad es bastante menor que para la detección, por ejemplo, de traslocaciones. El reordenamiento génico ocurre normalmente en todas las células linfoides; la PCR debe detectar una población monoclonal de células, cada una de las cuales tenga un producto de un tamaño similar amplificable dentro de un *background* de diferentes reordenamientos génicos de distintos tamaños encontrados en las células policlonales. Este *background* policlonal explica la reducción de la sensibilidad. En muchos estudios, la PCR ha detectado una célula monoclonal en una población de 10^2 o 10^3 células policlonales, bastante semejante a la sensibilidad del *Southern blot*, que detecta un linfocito B monoclonal en 100 células de todo tipo, incluyendo B y T (7).

En el trabajo rutinario el empleo de la inmunohistoquímica es muy rentable para favorecer el diagnóstico de malignidad en procesos linfoproliferativos de linfocitos B. Los métodos de biología molecular quedan reservados solamente para aquellos casos en los cuales con la inmunohistoquímica no podamos resolver el problema.

PAPEL DE LA INMUNOHISTOQUÍMICA Y DE LOS MÉTODOS MOLECULARES EN EL DIAGNÓSTICO DEL LINFOMA FOLICULAR

La t(14;18)(q32;q21) es una traslocación cromosómica que ha sido identificada en el 80% de los linfomas foliculares cuando se utilizan métodos rutinarios de cariotipificación. La traslocación t(14;18) es recíproca y yuxtapone el gen *bcl-2* que se encuentra en el cromosoma 18q21 con el gen IgH en el cromosoma 14q32. Como resultado de esta traslocación el gen *bcl-2* se pone bajo el control de los elementos reguladores del gen IgH, más probablemente de la región aumentadora, resultando en una sobreexpresión constitutiva del gen *bcl-2*. Como resultado de esta sobreexpresión se produce en gran cantidad la proteína *bcl-2*.

La proteína *bcl-2* tiene 25 kd, y se ha localizado en las membranas subcelulares como la membrana interna de las mitocondrias. Desempeña un importante papel en la apoptosis, tiene una vida media prolongada y, al impedir la apoptosis, hace a las células más sensibles a cambios genéticos secundarios que pueden resultar en transformación maligna y fenotipo más agresivo. El anticuerpo más utilizado para detectar la proteína *bcl-2* es el del clon 124, y con él se ha podido demostrar que en los ganglios normales se tiñen los linfocitos B, tanto del manto como de las zonas marginales. Los linfocitos B de los centros germinales normales son negativos. Los linfocitos T expresan fuertemente *bcl-2*. En los tejidos neoplásicos aproximadamente el 80% de los linfomas foliculares expresa *bcl-2*, en contraste con los centros germinales reactivos (Fig. 3). Además, hay una variedad de otros linfomas de linfocitos B particularmente de bajo grado que expresan *bcl-2*, si bien en estos tumores no se demuestra el reordenamiento del gen *bcl-2*, de manera que la expresión de la proteína *bcl-2* puede ocurrir de manera independiente de la traslocación t(14;18) (6).

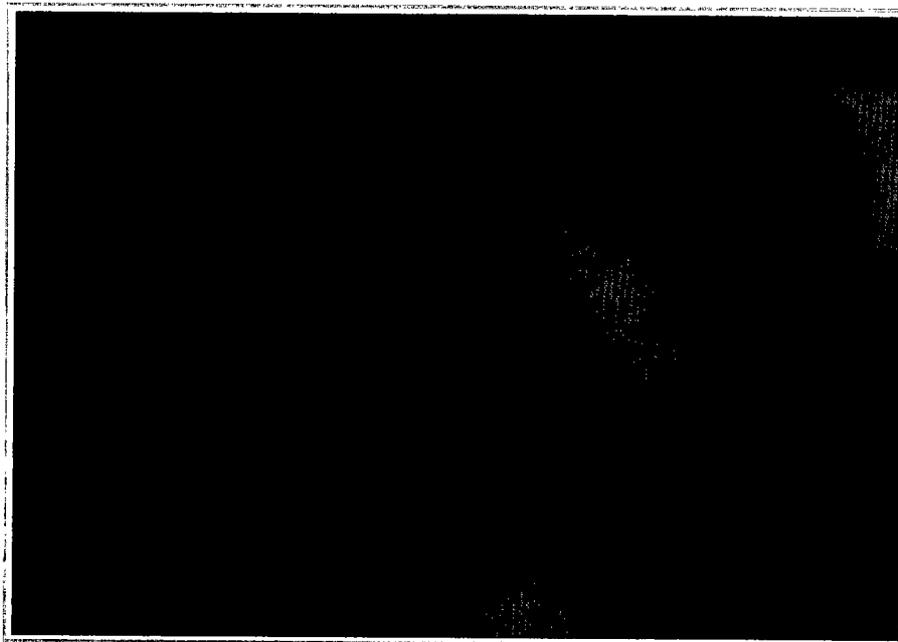


Figura 3. Positividad para *bcl-2* en un linfoma folicular de grado II.

Los puntos de rotura en el cromosoma 14 están muy próximos a la región J de la cadena IgH. Los puntos de rotura en el cromosoma 18 están muy diseminados, pero hay dos regiones de mayor frecuencia: la *MBR* (del inglés *Major Breakpoint Cluster Region*), localizada dentro de la porción 3' del tercer exón donde se encuentran el 50% a 60% de todos los casos de traslocación t(14;18), y la *MCR* (*Minor Breakpoint Cluster Region*), que está localizada 20 kb más debajo de la *MBR* y donde se encuentran el 10% a 20% de los casos. Hay otras regiones que han sido descritas y se extienden en los linfomas foliculares.

El análisis de rutina de la t(14;18) utilizando métodos de *Southern blot* o PCR es práctico en el laboratorio clínico, pero el grado de detección depende del método empleado. En caso de que utilizemos *Southern blot* para *MBR* y *MCR* podemos detectar el 80% de los linfomas foliculares, aproximadamente un 10% menos de lo que se detecta por citogenética convencional. La PCR, usando dos *sets* de *primers* para *MBR* y *MCR*, puede detectar aproximadamente entre el 60% y el 70% de los casos, siendo más baja la detección por PCR que por *Southern blot* porque se evalúan menos puntos de rotura (8).

Si utilizamos FISH probablemente se detecten una mayor cantidad de traslocaciones aproximándonos a más del 95% de los casos y, en algunas series, del 100%. La determinación de la t(14;18) por métodos moleculares se enfrenta con dos problemas. El primero de ellos es que aproximadamente un 20% de todos los linfomas foliculares no presenta reordenamiento para *bcl-2* o bien reordenamientos en puntos de rotura que no son detectables por los métodos moleculares convencionales. Por otro lado hay falsos positivos, dado que sabemos que en tejidos benignos como amígdalas o ganglios linfáticos e incluso en sangre periférica de donantes voluntarios se han identificado traslocaciones t(14;18).

Las recomendaciones para el diagnóstico de linfoma folicular incluyen utilizar siempre la inmunohistoquímica para demostrar la expresión de la proteína *bcl-2* y, en aquellos casos en que por criterios morfológicos sea dudoso el diagnóstico y la proteína negativa, puede recurrirse a los métodos de biología molecular. Hemos de tener en cuenta que la presencia de *bcl-2* por inmunohistoquímica, como se ha dicho, no es indicativa de un origen en el centro folicular de las células de un linfoma, y que tampoco la demostración de t(14;18) es indicativa con certeza absoluta del diagnóstico de linfoma folicular (6).

PAPEL DE LA INMUNOHISTOQUÍMICA FRENTE AL DIAGNÓSTICO MOLECULAR EN EL LINFOMA DE CÉLULAS GRANDES ANAPLÁSICAS

Recientemente el comité encargado de la nueva clasificación de linfomas de la OMS ha sugerido que no existe un diagnóstico estándar para el linfoma de células grandes anaplásicas. No obstante, este diagnóstico siempre requiere morfología e inmunofenotipo. No puede dejar de realizarse el diagnóstico de linfoma de células grandes anaplásicas en aquellos casos que son negativos con anticuerpos anti-ALK, pero, no obstante, sabemos que los casos que son positivos para estos anticuerpos son los que tienen mejor pronóstico (9).

La proteína ALK (*anaplastic lymphoma kinasa*) es una tirosincinasa que está relacionada con la tirosincinasa leucocitaria. Es una proteína transmembrana que pesa 200 kd. No es expresada en las células linfoides normales. Su sobreexpresión está relacionada con la linfomatogénesis. Los anticuerpos designados como ALK1 y ALKc son anticuerpos monoclonales que se han obtenido tras inmunización con secuencias de aminoácidos de la porción intracitoplásmica de ALK (10). No obstante, ALK1 y ALKc reconocen diferentes epitopos. Las tinciones de ambos anticuerpos son, sin embargo, muy superponibles. Los anticuerpos frente a ALK sólo reconocen esta proteína cuando se encuentra sobreexpresada en los linfomas anaplásicos de células grandes. ALK está codificada por el gen ALK, que se encuentra en el cromosoma 2p23. La traslocación que ha sido identificada en un 20% a 60% de los linfomas de células grandes anaplásicas es la t(2;5); en ella el gen ALK se yuxtapone con el gen NPM (nucleofosmina) en el cromosoma 5, formando un nuevo gen que se encuentra en este cromosoma 5, denominado NPM/ALK. Este gen codifica una proteína de fusión de 80 kd que está constituida por la porción aminoterminal de la proteína NPM y por la porción citoplásmica del ALK (11).

Los anticuerpos antes mencionados tienen un patrón de tinción difuso citoplásmico y, en la mayoría de los casos, también se tiñe el núcleo. La tinción nuclear resulta de la presencia de dominios de unión con DNA nuclear que están presentes en la porción de NPM. Cuando se observa en un caso de linfoma de células grandes anaplásicas tinción citoplásmica y nuclear, se puede inferir que va a presentar traslocación t(2;5). Si la tinción es solamente citoplásmica se puede pensar que ALK está sobreexpresado, fruto de una traslocación distinta con otro gen. Se han identificado traslocaciones t(1;2) y t(2;13) (12) (Fig. 4).

Se debe mencionar que el primer anticuerpo utilizado para identificar la traslocación t(2;5) fue uno policlonal que se denominó p80, por ser éste el peso de la proteína de fusión resultante de este gen fusión. Aunque los datos coinciden bastante con las tinciones de los anticuerpos monoclonales anteriormente mencionados, p80 tiene menor sensibilidad y especificidad que los anticuerpos monoclonales. Hasta la fecha no se ha encontrado sobreexpresión de linfoma de células grandes anaplásicas en linfomas diferentes de ALK, salvo excepción hecha de un nuevo grupo de linfomas que expresan ALK pero no presentan traslocación t(2;5) (13). Estos linfomas son de fenotipo B y muestran tinción de membrana cuando se utiliza un anticuerpo monoclonal frente a la porción extracelular de ALK. A diferencia de los linfomas de células grandes anaplásicas ALK positivos, estos linfomas tienen muy mal pronóstico y son CD30 negativos.

Cuando se revisa la literatura se observa que es difícil demostrar la traslocación t(2;5), dadas sus peculiaridades moleculares. Los puntos de rotura se producen dentro de grandes intrones que hacen imposible un estudio con PCR estándar. Es necesario recurrir a RT-PCR, lo que implica trabajar con RNA, lo cual es muy difícil. Cuando se utiliza RT-PCR, los productos de amplificación siempre son del mismo tamaño, de manera que no puede demostrarse fácilmente una contaminación. En donantes de sangre sanos se ha detectado t(2;5), descartándose contaminación (14). El significado de este hallazgo no se ha explicado bien (15).

Además, como hemos señalado anteriormente, hay varios tipos de traslocaciones que pueden encontrarse en este tipo de linfomas que se escapan a los primeros utilizados en la RT-PCR estándar, cuya significación clínica no nos es conocida.

Por lo tanto, el diagnóstico inmunohistoquímico de la presencia de ALK parece poder ofrecer más rendimiento que el diagnóstico molecular y es, hoy por hoy, recomendable e imprescindible para hacer un diagnóstico de linfoma de células grandes anaplásicas.

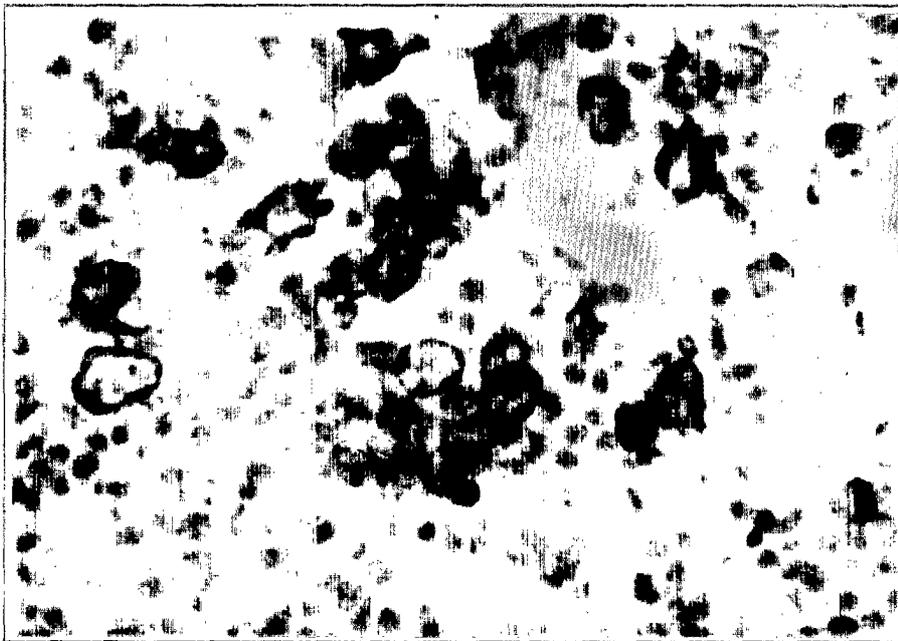


Figura 4. Expresión de ALK (ALK1) en citoplasma con refuerzo periférico en un linfoma anaplásico de células grandes.

LOS ANTICUERPOS PARA MIC2 NO SUPERAN LA CERTEZA DEL DIAGNÓSTICO MOLECULAR EN LOS TUMORES DE LA FAMILIA DEL SARCOMA DE EWING

Los anticuerpos para MIC2 que configuran la designación de grupo CD99 tiñen una glucoproteína de 30 a 32 kd de la superficie de las células. Esta glucoproteína parece estar involucrada en los procesos de adhesión celular. El gen MIC2 está localizado en la región pseudoautosómica tanto del cromosoma X como del cromosoma Y. Los anticuerpos más conocidos son los denominados O13, HBA71, 12E7 y RFP-1. En los tejidos normales la glucoproteína MIC2 se expresa de manera intensa en los timocitos corticales (inmaduros), células de los islotes pancreáticos, células de Sertoli, células de la granulosa y algunos epitelios glandulares, entre los que destacan los túbulos renales y la próstata. Los resultados con los anticuerpos O13, 12E7 y HBA71, que funcionan en tejidos fijados en formol e incluidos en parafina, son bastante similares de acuerdo con los datos publicados en la literatura, aunque no existen amplias series destinadas a comprobar la sensibilidad y especificidad de estos anticuerpos (16).

MIC2 es uniformemente expresado en más del 90% de casos de sarcoma de Ewing y tumor neuroectodérmico primitivo, pero está ausente en neuroblastomas (17). Esta positividad de membrana presenta una discreta tinción citoplásmica periférica en algunos casos, y en los tumores de la familia Ewing-tumor neuroectodérmico primitivo más del 90% de las células aparecen teñidas cuando los casos son positivos para este antígeno. El problema más importante de los anticuerpos CD99 es su falta de especificidad ya que también pueden teñir otros tumores de partes blandas como mesoteliomas, histiocitomas fibrosos malignos, tumor de células redondas desmoplásico, tumor fibroso solitario, sarcoma sinovial y condrosarcoma mesenquimal (Fig. 5). También pueden teñirse algunos casos de rabdomiosarcoma alveolar. Fuera de los tumores de partes blandas es característica la tinción en linfomas linfoblásticos, algunos de los cuales pueden tener una presentación ósea y ser por ello un motivo de confusión con el sarcoma de Ewing/tumor neuroectodérmico primitivo. Los tumores de células de la granulosa y los de glándulas suprarrenales son característicamente positivos con anticuerpos frente a CD99. En raras ocasiones los tumores de células de Merckel pueden teñirse con CD99, lo que también puede ser motivo de confusión con el sarcoma de Ewing de presentación cutánea (18). Algunos carcinomas, sobre todo de origen renal y prostático, también pueden expresar MIC2 (19-21).

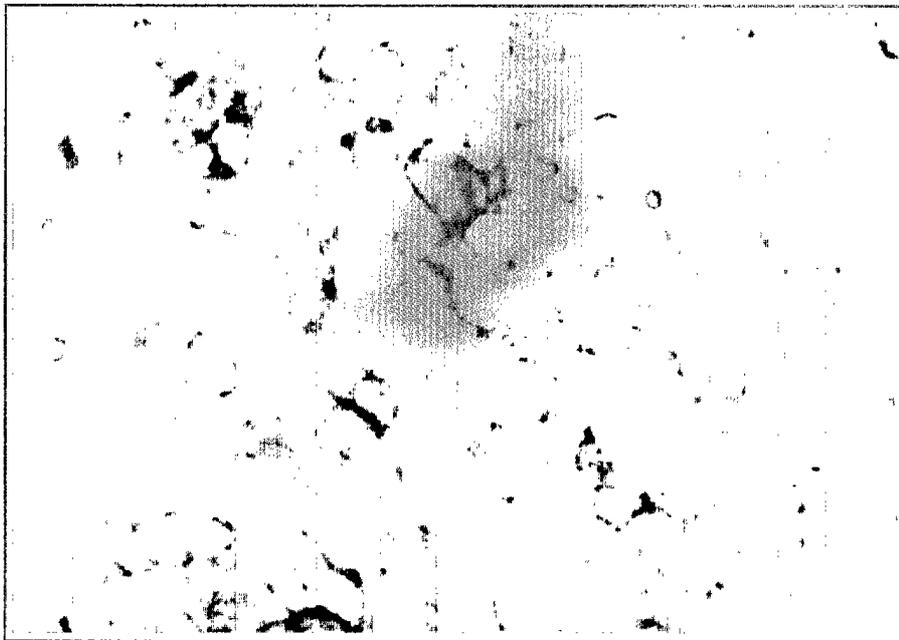


Figura 5. Tinción membranosa con CD99 (O13) en metástasis de carcinoma suprarrenal.

La traslocación t(11;22)(q24;q12) fue descrita inicialmente en 1984 en un sarcoma de Ewing. Demostrada primero citogenéticamente, también se observó en los tumores neuroectodérmicos periféricos y en sus variantes, como el tumor de Askin. La identificación de los genes EWS y FLI-1 que flanquean los puntos de traslocación ha permitido emplear técnicas de RT-PCR para detectar el transcrito quimérico producido por el gen de fusión (22). Molecularmente, no obstante, los reordenamientos de EWS-FLI1 muestran una gran diversidad. Las diferentes combinaciones de exones de EWS y FLI1 codifican transcritos que producen proteínas quiméricas de una composición de aminoácidos variable que funcionan como factores de transcripción anormales. El tipo más frecuente de fusión se conoce con el nombre de tipo 1, en el cual el exón 7 del gen EWS se une al exón 6 de FLI1 y es, asimismo, el más frecuente en los sarcomas de Ewing. Se ha demostrado que la presencia de este tipo de traslocación confiere un mejor pronóstico a los pacientes que la presentan en sus tumores que a aquellos otros con tumores con otros tipos de fusión. Otras traslocaciones descritas son la EWS con ETW1 y la EWS con ERG (23).

La utilización de RT-PCR tanto en material congelado como fijado en formol e incluido en parafina para demostrar la traslocación t(11;22) es de gran interés diagnóstico. Las dificultades técnicas inherentes al tratamiento del RNA son las mismas que para cualquier otra técnica de RT-PCR, pero esta traslocación es muy específica de esta familia de tumores. Hasta la fecha no se han encontrado, salvo en un caso de leucemia mieloblástica aguda, traslocaciones t(11;22) en otros tumores de partes blandas. Los casos positivos para el transcrito EWS/FLI-1 alcanzan en algunas series más del 97%.

El diagnóstico molecular parece claramente superior, en el caso del tumor de Ewing/tumor neuroectodérmico primitivo, a la inmunohistoquímica. Se ha encontrado, sin embargo, una buena correlación entre los tumores positivos para la traslocación t(11;22) y aquellos que son positivos para MIC2.

BIBLIOGRAFÍA

- Koplovic J, Wolman M. *Reasons underlying discrepancies in results between immunohistochemistry and molecular biology*. Eur J Histochem 1996; 40: 177-180.
- Ashton-Key M, Jessup E, Isaacson P. *Immunoglobulin light chain staining in paraffin-embedded tissue using a heat mediated epitope retrieval method*. Histopathology 1996; 29: 525-531.
- Jessup E. *Antigen retrieval techniques for the demonstration of immunoglobulin light chains in formalin-fixed, paraffin-wax embedded sections*. UK NEQAS-ICC 1995: 12-16.
- Kurtin P, Hobday K, Ziesmer S, Caron B. *Demonstration of distinct antigenic profiles of small b-cell lymphomas by paraffin section immunohistochemistry*. Am J Clin Pathol 1999; 112: 319-329.
- Lai R, Weiss L, Chang K, Arber D. *Frequency of CD43 expression in non-Hodgkin lymphoma*. Am J Clin Pathol 1999; 111: 488-494.
- Medeiros J, Carr J. *Overview of the role of molecular methods in the diagnosis of malignant lymphomas*. Arch Pathol Lab Med 1999; 123: 1189-1207.
- Ritter J, Wick M, Adesokan P, Fitzgibbon J, Zhu X, Humphrey P. *Assessment of clonality in cutaneous lymphoid infiltrates by polymerase chain reaction analysis of immunoglobulin heavy chain gene rearrangement*. Am J Clin Pathol 1997; 108: 60-68.
- Segal G, Jorgensen T, Scott M, Braylan R. *Optimal primer selection for clonality assessment by polymerase chain reaction analysis: II Follicular lymphomas*. Hum Pathol 1994; 25: 1276-1282.
- Harris NL, Jaffe E, Diebold J y cols. *The World Health Organization classification of neoplastic diseases of the haematopoietic and lymphoid tissues: Report of the Clinical Advisory Committee Meeting, Airlie House, Virginia, November 1997*. Histopathology 2000; 36: 69-87.
- Pulford K, Lamant L, Morris S y cols. *Detection of anaplastic lymphoma kinase (ALK) and nucleolar protein nucleophosmin (NPM)-ALK proteins in normal and neoplastic cells with the monoclonal antibody ALK1*. Blood 1997; 89: 1394-1404.
- Benharroch D, Meguerian-Bedoyan Z, Lamant L y cols. *ALK-positive lymphoma: A single disease with a broad spectrum of morphology*. Blood 1998; 91: 2076-2084.
- Falini B, Biogerna B, Fizzoti M y cols. *ALK expression defines a distinct group of T/null lymphomas ("ALK lymphomas") with a wide morphological spectrum*. Am J Pathol 1998; 153: 875-876.
- Delsol G, Lamant L, Mariamé M y cols. *A new subtype of large B-cell lymphoma expressing the ALK kinase and lacking the 2;5 translocation*. Blood 1997; 89: 1483-1490.
- Cataldo K, Jalal S, Law M y cols. *Detection of t(2;5) in anaplastic large cell lymphoma*. Am J Surg Pathol 1999; 23: 1386-1392.
- Trumper L, Pfreundschuh M, Bonin F, Daus H. *Detection of the t(2;5)-associated NPM/ALK fusion cDNA in peripheral blood cell of healthy individuals*. Brit J Hem 1998; 103: 1138-1144.
- Chan JKC, Tsang W, Seneviratne S. *The MIC2 antibody O13*. Am J Surg Pathol 1995; 19: 1115-1123.
- Argani P, Pérez-Ordóñez B, Xiao H, Caruana S, Huvos A, Ladanyi M. *Olfactory neuroblastoma is not related to the Ewing family of tumors*. Am J Surg Pathol 1998; 22: 391-398.
- Soslow R, Wallace M, Goris J, Pedemonte-Coira B, Smoller B. *MIC2 gene expression in cutaneous neuroendocrine carcinoma*. Appl Immunohistochem 1996; 4: 235-240.
- Ladanyi M, Lewis R, Garin P y cols. *EWS rearrangement in Ewing's sarcoma and peripheral neuroectodermal tumor: molecular detection and correlation with cytogenetic analysis and MIC2 expression*. Am J Surg Pathol 1993; 141-146.

20. Lee C, Southley M, Waters K y cols. *EWS/FLI1 fusion transcript detection and MIC2 immunohistochemical staining in the diagnosis of Ewing's sarcoma*. *Pediatr Pathol Lab Med* 1996; 16: 379-392.
21. Perlman E, Dickman P, Askin F, Grier H, Miser J, Link M. *Ewing's sarcoma-routine diagnostic utilization of MIC2 analysis: A pediatric oncology Group/Children's Cancer Group Intergroup study*. *Hum Pathol* 1994; 25: 304-307.
22. Sorensen P, Liu X, Delattre O y cols. *Reverse transcriptase PCR amplification of EWS/FLI1-fusion transcripts as a diagnostic test for peripheral primitive neuroectodermal tumors of childhood*. *Diag Mol Pathol* 1993; 2: 147-157.
23. Álava E, Kawai A, Healey JH y cols. *EWS-FLI1 fusion transcript structure is a independent determinant of prognosis in Ewing's sarcoma*. *J Clin Oncol* 1998; 16: 1248-1255.