

FULL PAPERS /LAVORI ORIGINALI

Quantificazione mediante PCR dell'EBV-DNA da biopsie cutanee di pazienti con linfomi cutanei primitivi (micosi fungoide e sindrome di Sèzary)

Chiara Merlino, Massimiliano Bergallo, Cristina Costa, Mauro Novelli¹, Renata Ponti¹, Samuela Margio, Francesca Sidoti, Maria Elena Terlizzi, M. Ortoncelli¹, Rossana Cavallo, Maria Grazia Bernengo¹

Dip. Sanità Pubbl. e Microbiol., SCU Virologia,

¹Dip. Scienze Biom. Oncol. Umana, Sez. Dermatol., Lab. Immunopatol. Cutanea; Università di Torino

Key words: QC-PCR, EBV-DNA, CTCL

Quantification of EBV-DNA by PCR in skin biopsies from patients with primary cutaneous lymphomas (micosis fungoides and Sezary syndrome)

SUMMARY

Mycosis fungoides (MF), the most indolent form of CTCL, originates from a clonal expansion of epidermotropic helper/memory T cells. Sezary syndrome (SS) is a rare primary epidermotropic cutaneous T-cell lymphoma in leukemic. The aetiopathogenesis of MF and SS remains obscure despite several investigations. Infectious, environmental and genetic factors have been implicated as potential aetiological agents.

The studies investigating the role of EBV in CTCL present conflicting results. The different sensitivities of the technical methods used in the evaluation of the presence of viral DNA or virus-related antigens make comparison of the results difficult.

The aim of this study was to retrospectively evaluate the EBV-DNA load in skin biopsies from MF and SS patients by a highly sensitive (1-10 EBV-DNA copies/reaction) quantitative-competitive PCR (QC-PCR) developed in our lab to better assess the relationship between EBV and CTCL.

Skin biopsies were obtained from 21 MF and 10 SS patients; skin biopsies from 8 patients with inflammatory skin disease were used as controls. EBV-DNA was detected in 70% of biopsies from SS patients vs. 0% of MF patients. No control patients resulted EBV-DNA positive, as expected. In addition, in SS patients, the survival from diagnosis is lesser in EBV-positive patients vs. EBV-negative patients even if not statistically significant. We are going to investigate the presence of EBV-DNA in peripheral blood of a larger number of patients and to evaluate the pattern of viral genes expression, to better assess the aetiopathogenetical role of EB virus in this kind of neoplasias.

INTRODUZIONE

La micosi fungoide (MF) (1) è la forma più comune dei linfomi cutanei a cellule T (CTCL) e può essere definita come un linfoma non-Hodgkin periferico, epidermotropo a basso grado di malignità. Generalmente confinata alla cute, anche di tutto il corpo, mostra una graduale progressione clinica con una sequenziale comparsa di chiazze, placche e noduli tumorali.

La stadiazione è effettuata utilizzando la classificazione TNM. L'istologia evidenzia un infiltrato linfo-istiocitario dermico con variabile grado di epidermotropismo, cioè la presenza di elementi linfoidi atipici infiltranti l'epidermide o gli annessi, con singole cellule e/o piccoli clusters, filiere lungo la membrana basale o caratteristiche raccolte denominate "microascessi di Pautrier". I linfociti atipici presentano in genere nucleo convoluto o cerebriforme (cellule di Sézary). Dal punto

di vista fenotipico sono cellule T, generalmente helper CD4+ e raramente suppressor CD8+ (1).

La Sindrome di Sézary (SS) (1) è una rara variante leucemica dei linfomi cutanei primitivi a cellule T, inclusa tra le forme aggressive.

Interessa esclusivamente gli adulti, in genere in età avanzata. La presentazione clinica è una triade caratterizzata da prurito, eritrodermia e linfadenopatia. Spesso sono presenti distrofia ungueale, cheratosi palmo-plantare, facies leonina.

La prognosi è sfavorevole ed oltre alla progressione in linfoma ad alto grado, meno frequente, la morte spesso risulta dovuta alle complicanze infettive che insorgono per diminuzione delle difese legate alle barriere cutanee ed alla immunodepressione conseguente sia alla terapia che alla malattia stessa.

L'istologia è simile a quella della MF, con minor grado di epidermotropismo e in alcuni casi è dif-

facilmente differenziabile dalle dermatiti croniche. Le cellule di Sézary, presenti nella cute, ma soprattutto a livello ematico, sono linfociti atipici con nucleo ipercromico e convoluto (cerebriforme). Il fenotipo è generalmente CD4+, CD26-, CD7- (50% dei casi) (2).

L'eziopatogenesi della MF e della SS è ancora ignota e sono stati suggeriti fattori genetici, ambientali ed infettivi (1). Recentemente, il retrovirus HTLVI ed herpesvirus umani sono stati coinvolti sia per la loro potenzialità di trasformazione oncogena diretta, sia perché capaci di infettare le cellule T e stabilire uno stato di latenza nei tessuti dell'ospite (3, 4).

Il virus di Epstein Barr (EBV), gamma-herpesvirus in grado di infettare in vivo i linfociti B e le cellule epiteliali dell'orofaringe, agente eziologico della mononucleosi infettiva, è notoriamente correlato al carcinoma nasofaringeo ed al linfoma endemico di Burkitt. Esso è stato anche associato ad altre forme tumorali sia epiteliali (carcinoma gastrico) che linfoproliferative (linfoma di Hodgkin, linfomi in situazioni di immunodepressione o immunodeficienza, linfomi T/NK extranodali) (5).

Alcuni studi molecolari sul ruolo del virus di Epstein-Barr (EBV) nell'eziopatogenesi dei CTCL, hanno portato a risultati controversi, anche a causa della diversa sensibilità delle tecniche impiegate (6, 7, 8).

In questo lavoro è stata indagata retrospettivamente la presenza e l'eventuale carica virale di EBV in biopsie cutanee di pazienti con MF e SS utilizzando una PCR quantitativa-competitiva (QC-PCR) con analisi densitometrica degli amplificati, altamente sensibile (1-10 copie di EBV-DNA/reazione) e riproducibile, messa a punto nel ns. laboratorio (9, modif).

MATERIALI E METODI

Pazienti

Sono stati studiati 21 pazienti con MF (17 MF, 11 maschi, 6 femmine, età mediana 63 anni, range 14-84 anni; 4 MF in evoluzione verso linfoma ad alto grado di malignità, 2 maschi, 2 femmine, età mediana 74 anni, range 59-82 anni); 10 pazienti con SS (3 maschi, 7 femmine, età mediana 72 anni, range 46-84 anni) e 8 pazienti con patologie cutanee infiammatorie (6 maschi, 2 femmine, età mediana 64, 5 anni, range 33-79 anni) come gruppo di controllo.

Estrazione del DNA

Sono state tagliate sezioni di tessuto congelato (OCT criopreservante) di 20 mm e poste in provette da 1.5 ml. Le sezioni sono state lavate con PBS e sottoposte a digestione con proteinasi K

per 3 ore a 56°C. Il DNA è stato estratto utilizzando un kit per estrazioni da tessuto (QIamp DNA Mini Kit, QIAGEN) secondo le istruzioni fornite dal fabbricante.

Quantificazione dell'EBV-DNA mediante PCR quantitativa-competitiva (QC-PCR)

E' stata utilizzata una double-step QC-PCR messa a punto nel nostro laboratorio (9, Bergallo et al., 2004 modificata).

In breve, il DNA estratto è stato sottoposto a screening mediante una PCR semiquantitativa basata sull'amplificazione in provette separate dei campioni clinici e di diluizioni scalari di uno standard esterno (4 diluizioni del plasmide bersaglio pEB171 contenenti 50, 100, 500 e 1000 copie, rispettivamente).

Sia i campioni clinici che lo standard esterno sono stati co-amplificati in presenza di 50 copie di plasmide pEB-C, utilizzato come controllo interno di amplificazione per valutare l'eventuale presenza di inibitori della Taq-polimerasi.

I primers utilizzati (WF1 e WR1) e le condizioni di amplificazione (32 cicli; 1 min a 94°C, 1 min a 57°C, 1 min a 72°C) sono quelli descritti precedentemente (Bergallo et al., 2004). I prodotti di amplificazione sono stati analizzati mediante migrazione elettroforetica in gel di agaroso al 2% e le bande sono state visualizzate mediante illuminazione UV dopo colorazione con bromuro di etidio.

Il numero di copie di EBV-DNA è stato determinato confrontando l'intensità delle bande del campione con quelle corrispondenti al numero di copie noto delle diluizioni di pEB171.

I campioni stimati contenere un numero di copie di EBV-DNA \geq a 1000 sono quindi stati quantificati mediante una QC-PCR con lettura densitometrica delle bande di amplificazione. E' stata generata una curva standard co-amplificando 1000, 5000, 10000 e 50000 del plasmide bersaglio pEB171 e 5000 copie del plasmide competitore pEB-C.

I prodotti di amplificazione sono stati analizzati mediante gel-elettroforesi, e le bande sono state quantificate utilizzando un software per l'acquisizione digitale di immagini (Quantity One 1-D Analysis Software; BIO-RAD, USA).

I campioni sono stati quantificati co-amplificando il DNA estratto in presenza di 5000 copie del plasmide competitore pEB-C (controllo interno) e confrontando le bande digitalizzate degli amplificati con la curva standard.

I primers (WF1 e WR1) e le condizioni di amplificazione (30 cicli; 1 min a 94°C, 1 min a 57°C, 1 min a 72°C) sono quelli descritti precedentemente (9 Bergallo et al., 2004).

Analisi statistica

L'analisi statistica è stata effettuata utilizzando il software Graph Pad Prism, versione 3.00 per Windows, (Graph Pad Software, San Diego, Calif., USA). Per l'analisi univariata è stato utilizzato il test χ^2 o il t test a seconda dei casi. Per quanto riguarda la Sézary, la sopravvivenza dalla diagnosi è stata determinata mediante il metodo di Kaplan&Meier e l'analisi statistica effettuata mediante il log-rank test di Mantel.

RISULTATI

Nelle biopsie ottenute dai 21 pazienti con MF non è stata dimostrata la presenza di EBV-DNA; in particolare, né nei 17 pazienti con MF, né nei 4 pazienti con MF in evoluzione verso linfoma con alto grado di malignità. Nelle biopsie dei 10 pazienti con SS, l'EBV-DNA è stato dimostrato in 7 su 10 (70%). Nelle biopsie degli 8 controlli con patologie cutanee infiammatorie non è stata riscontrata presenza di EBV-DNA (Tabella 1).

Nella Tabella 2 è riportato il numero delle copie genomiche di EBV/ μg DNA estratto per i 10 pazienti con SS, oltre alla data della diagnosi, del campione biotipico cutaneo ed alla presenza di clonalità per il T Cell Receptor (TCR).

Come riportato in Tabella 1, nei pazienti con SS EBV-positivi, la media delle copie di EBV-DNA/ μg è di 313.4 (range 1-2160).

Lo studio del follow-up di questi pazienti copre un intervallo di circa 5 anni. E' stato riscontrato un unico decesso tra i 3 pazienti EBV negativi (33.3%), mentre si sono osservati 5/7 (71.4%) decessi tra i pazienti EBV positivi.

La sopravvivenza dalla diagnosi è stata valutata secondo il metodo di Kaplan&Meier. Secondo il logrank test la differenza tra le due curve non è statisticamente significativa. Tuttavia i pazienti EBV positivi denotano una probabilità di sopravvivenza peggiore (hazard ratio 2.55) rispetto ai pazienti EBV negativi (Figura I).

DISCUSSIONE

E' stato ipotizzato che una stimolazione antigenica prolungata contribuisca allo sviluppo di CTCL epidermotropi, quali la MF e la SS, caratterizzati da infiltrazione cutanea di cellule T helper in proliferazione (10). L'identificazione di EBV nei CTCL suggerisce che questo virus possa giocare un ruolo nell'eziopatogenesi di tali neoplasie o più probabilmente come agente di stimolazione antigenica cronica (6, 10).

Diversi studi sul ruolo dell'EBV nei CTCL riportano risultati differenti anche in relazione alle tecniche impiegate: le positività per EBV variano dallo 0 al 32%.

Nella nostra casistica, la prevalenza dell'EBV-DNA, valutata su biopsie cutanee mediante la

Tabella 1.

Paziente	Sospetto clinico	Data nascita	S	diagnosi	clonalità TCR	I° diagn	data biopsia	copie EBV/ μg
3988	SS	15/04/1927	F	SS	PRESENTE	28/04/2003	29-apr-03	1
3098	SS?	15/02/1927	F	SS	PRESENTE	11/01/1999	25-gen-00	1
3020	SS?	25/04/1915	M	SS	PRESENTE	25/05/1999	10-ago-99	9
2804	SS	21/12/1943	F	SS	PRESENTE	29/09/1998	29-set-98	21
3881	SS	09/07/1931	M	SS	ASSENTE	08/05/2001	04-dic-02	1
3861	SS	25/08/1941	F	SS	PRESENTE	08/07/1999	12-nov-02	NEG
3587	SS	11/09/1924	M	SS	PRESENTE	01/05/1994	06-dic-01	NEG
3351	MF suberitrodermica?	08/10/1954	F	SS	PRESENTE	03/03/1999	16-gen-01	1
3321	SS	06/06/1934	F	SS	PRESENTE	08/09/1999	29-nov-00	2160
2785	SS	27/03/1924	M	SS	PRESENTE	01/05/1997	14-set-98	NEG

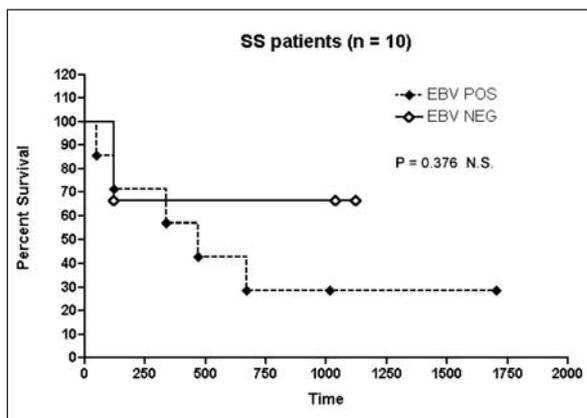


Figura I. Sopravvivenza alla diagnosi di 10 pazienti con SS, 7 EBV-positivi e 3 EBV-negativi (Kaplan&Meier).

Tabella 2.

	Prevalenza EBV	%	Media copie EBV-DNA/ μg
MF	0/17	0	----
MF AG	0/4	0	----
SS	7/10	70%	313.4
Controlli	0/8	0	----

Legenda:

Prevalenza EBV: numero di casi positivi nella popolazione studiata %: percentuale di casi positivi

Media copie EBV-DNA/ μg : media copie di EBV-DNA per μg di DNA estratto

MF = micosi fungoide

MF AG = micosi fungoide evoluta il linfoma ad alto grado di malignità

SS = Sindrome di Sézary

QC-PCR altamente sensibile da noi messa a punto, è risultata del 70% nella SS e dello 0% nella MF. Come atteso, nei pazienti di controllo non è stata riscontrata la presenza di EBV-DNA. I pazienti con SS EBV-DNA positivi denotano un Hazard Ratio più che doppio (2.55) rispetto a quelli EBV-DNA negativi. Questo risultato, anche se le curve di sopravvivenza non sono statisticamente significative per la bassa numerosità dei campioni, è in accordo con quanto riportato da Foulc et al., 2003 (10) che hanno dimostrato per la prima volta il valore prognostico negativo del riscontro del genoma di EBV nella cute, probabilmente correlato con un marcato deficit immunitario nel corso di forme severe di SS.

Abbiamo intenzione di estendere lo studio ad un numero maggiore di pazienti, di valutare la presenza di EBV-DNA nel sangue periferico ed inoltre di studiare, utilizzando un approccio molecolare (nested RT-PCR), l'espressione dei geni litici e di latenza di EBV, allo scopo di approfondire le conoscenze sulla relazione tra questo virus ed i CTCL.

BIBLIOGRAFIA

1. Willemze R, Kerl H, Sterry W, et al. 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.
2. Bernengo MG, Novelli M, Quaglino P, et al. The relevance of the CD4+ CD26- subset in the identification of circulating Sezary cells. *Br J Dermatol* 2001; 144: 125-35.
3. Pancake BA, Zucker-Franklin D, Coutavas EE. The cutaneous T cell lymphoma, mycosis fungoides, is a human T cell lymphotropic virus-associated disease. A study of 50 patients. *J Clin Invest.* 1995 Feb; 95(2): 547-54.
4. Erkek E, Senturk N, Dincer I, et al. Identification of herpes simplex virus DNA and lack of human herpesvirus-8 DNA in mycosis fungoides. *Acta Derm Venereol.* 2002; 82(3): 214-6.
5. Jaffe ES. Nasal and nasal-type T/NK cell lymphoma: a unique form of lymphoma associated with the Epstein-Barr virus. *Histopathology.* 1995 Dec; 27(6): 581-3.
6. Dreno B, Celerier P, Fleischmann M, Bureau B, Litoux P. Presence of Epstein-Barr virus in cutaneous lesions of mycosis fungoides and Sezary syndrome. *Acta Derm Venereol* 1994; 74: 355-57.
7. Jumbou O, Mollat C, N'Guyen JM, Billaudel S, Litoux P, Dreno B. Increased anti-Epstein-Barr virus antibodies in epidermotropic cutaneous T-cell lymphoma: a study of 64 patients. *Br J Dermatol.* 1997 Feb; 136(2): 212-6.
8. Foulc P, N'Guyen JM, Dreno B. Prognostic factors in Sezary syndrome: a study of 28 patients. *Br J Dermatol.* 2003; 149: 1152-8.
9. Bergallo M, Merlino C, Daniele R, et al. Double-step PCR assay to quantify Epstein Barr viral load in peripheral blood. *Mol Biotechnol* 2004; 27: 187-96.
10. Kim EJ, Hess S, Richardson SK, et al. Immunopathogenesis and therapy of cutaneous T cell lymphoma. *J Clin Invest.* 2005 Apr; 115(4): 798-812.

Chiara Merlino
 Dipartimento di Sanità Pubblica e
 di Microbiologia
 SCU Virologia
 Via Santena 9; 10126 Torino
 Tel.: 011 6705639 - Fax: 011 2365639
 E-mail: chiara.merlino@unito.it