

NOVEDADES EN DERMATOLOGÍA

Aplicación de los protocolos de PCR BIOMED-2 en el análisis genotípico de los linfomas cutáneos primarios

F. Gallardo^a, B. Bellosillo^b, S. Serrano^b y R.M. Pujol^a

^aServicio de Dermatología. ^bLaboratorio de Biología Molecular. Servicio de Patología. Hospital del Mar, IMAS. Barcelona. España.

Resumen. El proyecto europeo BIOMED-2 Concerted Action BMH4-CT98-3936 describe protocolos estandarizados de amplificación por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) de los diferentes *loci* de los genes del receptor de la célula T (TCR) e inmunoglobulinas (Ig) con el objetivo de obtener una mayor sensibilidad y especificidad en el estudio de clonalidad de las neoplasias linfoides. En el estudio de clonalidad T, además del TCR γ se propone el estudio adicional de los reordenamientos del gen TCR β y del *locus* TCR δ (útil en casos de neoplasias de células T $\gamma\delta$ +). En el estudio de clonalidad B, junto al segmento FRIII del gen IgH se diseña el estudio de otros segmentos (FRI, FRII), así como de los genes Ig λ e Ig κ o reordenamientos incompletos DJ del gen IgH y κ de (*kappa deleting element*). La lectura de los resultados de la amplificación se realiza mediante sistemas automatizados de lectura (GeneScan) o mediante el sistema heterodúplex.

Palabras clave: linfoma cutáneo, reordenamiento genético, clonalidad, reacción en cadena de la polimerasa, BIOMED-2, GeneScan.

GENOTYPIC ANALYSIS IN PRIMARY CUTANEOUS LYMPHOMAS USING THE STANDARDIZED BIOMED-2 POLYMERASE CHAIN REACTION PROTOCOLS

Abstract. The European Biomedicine and Health (BIOMED-2) Concerted Action Project BMH4-CT98-3936 has defined standardized protocols for polymerase chain reaction (PCR) amplification of different loci of the T-cell receptor (TCR) and immunoglobulin (Ig) genes with a view to achieving greater sensitivity and specificity in the assessment of clonality of lymphoid neoplasms. To assess T-cell clonality, analysis of TCR β gene and TCR δ rearrangements (useful in cases of T $\gamma\delta$ + cell neoplasms) is proposed alongside that of TCR γ . For analysis of B-cell clonality, along with the framework (FR) III segment of the IgH gene, other segments are studied (FRI, FRII) in addition to Ig λ and Ig κ genes or incomplete DJ rearrangements of the IgH gene and the κ deleting element. The results of the amplification are read using automatic reading systems (GeneScan) or using a heteroduplex system.

Key words: cutaneous lymphoma, gene rearrangement, clonality, polymerase chain reaction, BIOMED-2, GeneScan.

Introducción

En los últimos años, en los laboratorios de Biología Molecular y servicios de Patología se han incorporado a la rutina diagnóstica una serie de técnicas de biología molecular

basadas en la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (*polymerase chain reaction* [PCR]) con el objetivo de demostrar la presencia de una proliferación linfóide monoclonal T o B dominante en infiltrados cutáneos linfoides atípicos (análisis genotípico)¹⁻³. Los resultados del análisis genotípico, interpretados en un contexto clínico-patológico apropiado, constituyen una herramienta importante en el diagnóstico de los procesos linfoides malignos (linfomas), especialmente en aquellos casos en los que los hallazgos morfológicos e inmunofenotípicos no son concluyentes^{4,5}.

Las técnicas de PCR pueden realizarse no sólo a partir de muestras en fresco o congeladas, sino también a partir de biopsias de archivo incluidas en parafina, precisando únicamente la conservación de fragmentos de ADN rela-

Este trabajo ha sido financiado parcialmente por la beca FIS 03/394 del Ministerio de Sanidad y Consumo.

Correspondencia:
Fernando Gallardo Hernández.
Servicio de Dermatología.
Hospital del Mar, IMAS.
Passeig Marítim, 25-29.
08003 Barcelona. España.
FGallardo@imas.imim.es

Aceptado el 28 de febrero de 2008.

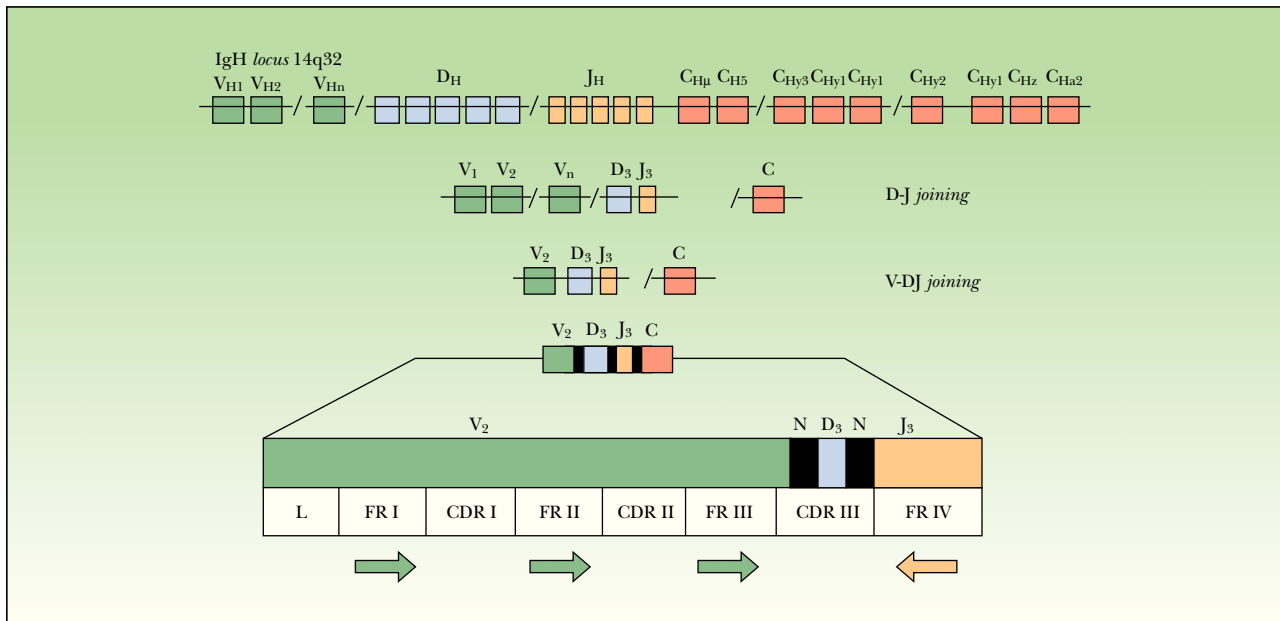


Figura 1. Reordenamiento VDJ del gen IgH. Las regiones V del gen IgH están formadas por tres regiones hipervariables o «complementary determining regions» [CDR] I, CDRII y CDRIII. Estos segmentos CDR se alternan con cuatro segmentos de poca variabilidad denominados *framework* (FR) sobre los que se hibridan los cebadores de la PCR (flechas).

tivamente pequeños (> 100-200 pares de bases [pb])¹. Esto supone una ventaja incuestionable respecto a otras técnicas, como la técnica de *Southern Blot* que precisa de fragmentos de ADN de gran tamaño (> 1.000 pb), lo que limita su estudio a material en fresco o congelado^{6,7}. Los métodos basados en técnicas de PCR evitan la exposición a material radiactivo, permiten una mayor rapidez en la obtención de resultados y menor tiempo de trabajo de laboratorio. Las diferencias metodológicas existentes entre los distintos laboratorios difieren fundamentalmente en la selección de los oligonucleótidos cebadores y en los sistemas de lectura o análisis de los fragmentos de PCR amplificados²⁻⁸⁻¹⁴.

El proyecto europeo BIOMED-2 Concerted Action BMH4-CT98-3936 se ha diseñado con la finalidad de desarrollar unos protocolos estandarizados de PCR para el estudio de clonalidad linfocito B y T en el diagnóstico de los procesos linfoproliferativos. Define diferentes protocolos para múltiples cebadores dirigidos frente a distintos *loci* de los genes del receptor de las células T y B en un intento de alcanzar una mayor sensibilidad y especificidad en la detección de clonalidad linfocito T y B, respectivamente^{15,16}.

Reordenamiento de los genes TCR/IgH

El receptor de la célula B es una inmunoglobulina (Ig) específica para cada célula formada por 2 cadenas pesadas y

2 cadenas ligeras (kappa [κ] o lambda [λ]). El receptor de la célula T (TCR) está formado por la unión o bien de una subunidad alfa (α) con una beta (β) (fenotipo α/β) o bien una subunidad gamma (γ) con una delta (δ) (fenotipo γ/δ). Los genes que codifican las Ig y el TCR contienen diferentes segmentos variables (V), de diversidad (D) y de unión (J) que sufren un proceso de reordenamiento durante las primeras fases de la diferenciación de la célula linfocito^{17,18}.

Este proceso de reordenamiento genético se inicia con la unión de uno de los posibles segmentos D a uno de los posibles segmentos J. Posteriormente se produce la unión de uno de los segmentos V en el caso de los genes IgH, TCR β y TCR δ (fig. 1). En el caso de los genes Ig λ , Ig κ , TCR α y TCR γ se produce la unión directa entre los segmentos V y J (fig. 2). Este reordenamiento sigue un orden jerárquico. En la diferenciación hacia una célula B, primero se reordena el gen IgH, seguido del gen Ig κ , produciéndose la delección de éste para formar una célula Ig λ +. En la diferenciación hacia una célula T, primero se reordena el gen TCR δ , luego el TCR γ seguido por el TCR β con posterior delección del TCR δ y finalmente se reordena el gen TCR α . El reordenamiento funcional de los genes Ig y TCR genera la expresión de los distintos receptores (Ig, TCR $\gamma\delta$ o TCR $\alpha\beta$) en la superficie celular. Estas configuraciones TCR $\gamma\delta$ o TCR $\alpha\beta$ aparecen en las células T postmíticas, siendo la configuración TCR $\gamma\delta$ la menor fracción¹⁸.

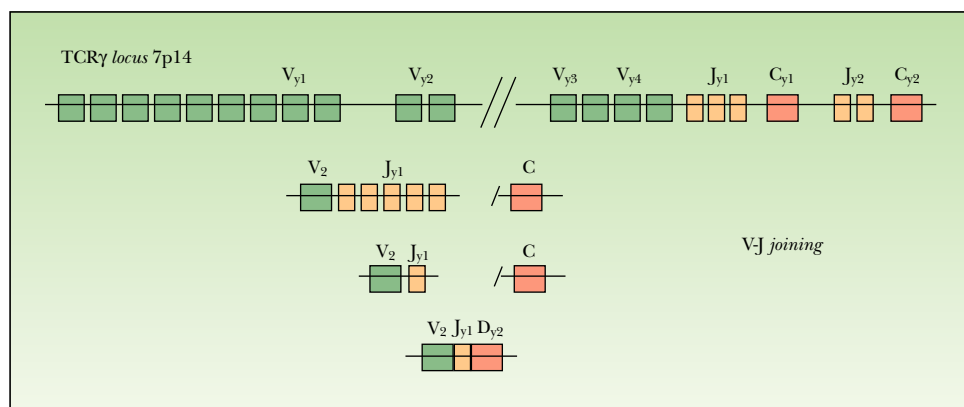


Figura 2. Reordenamiento VJ del gen TCRγ.

El gen IgH (*locus* 14q32.3) dispone de 46-52 V_H segmentos funcionales dependiendo del haplotipo de cada individuo, los cuales pueden agruparse en 6-7 subgrupos o familias según su homología. Además, existen 27 segmentos D_H funcionales agrupables en 7 familias (D_H1-7) y 6 segmentos funcionales J_H. El gen Igκ (*locus* 2p11.2) contiene múltiples V_κ agrupados en 7 familias y 5 segmentos funcionales J_κ. El gen Igλ (*locus* 22q11.2) dispone de 73-74 V_λ agrupables en 11 familias y 7 J_λ (4 funcionales J_λ1, J_λ 2, J_λ 3 y J_λ7) que codifican los 4 isotipos de Igλ^{17,19}.

El *locus* TCRγ (cromosoma 7p14) tiene 14 segmentos genéticos variables Vγ (10 funcionales o reordenables), 5 segmentos de unión Jγ agrupados en 2 grupos Jγ1 (Jγp1, Jγp y Jγ1) y Jγ2 (Jγp2 y Jγ2) y dos regiones constantes Cγ1 y Cγ2. Los segmentos Vγ se separan en cuatro subgrupos según su secuencia homóloga: el grupo I (Vγ1-8) contiene 5 segmentos funcionales y 4 pseudogenes; los grupos II, III, IV están formados por un solo segmento Vγ9, Vγ10 y Vγ11. El gen TCRβ (7q34) se forma por reordenamiento de uno de los 65 segmentos V_β (39-47 de los cuales son funcionales y se agrupan por su homología en 23 familias) con uno de los segmentos J_β (2 familias, J_β1-2)¹⁸.

La existencia de estos múltiples segmentos V, D y J combinables hace que se produzca un repertorio de combinaciones posibles de $2 \cdot 10^6$ en el caso de las Ig, $3 \cdot 10^6$ posibles reordenamientos TCRαβ y $5 \cdot 10^3$ moléculas TCRγδ. Por otro lado, estas posibilidades combinatorias aumentan su diversidad mediante la inserción o delección de nucleótidos en las áreas de unión de los segmentos, lo cual supone un total repertorio de moléculas de Ig y TCR superiores a 10^{12} . Finalmente, en el caso de la célula B la variabilidad puede aumentar aún más mediante un proceso de hipermutaciones somáticas en el segmento V del gen IgH y de las cadenas ligeras de las células B maduras a su paso por el centro germinal de los folículos linfoides, lo cual aumenta asimismo la diversidad y especificidad antigénica¹⁷⁻¹⁹.

Aspectos técnicos del proyecto BIOMED-2

Control de calidad del ADN

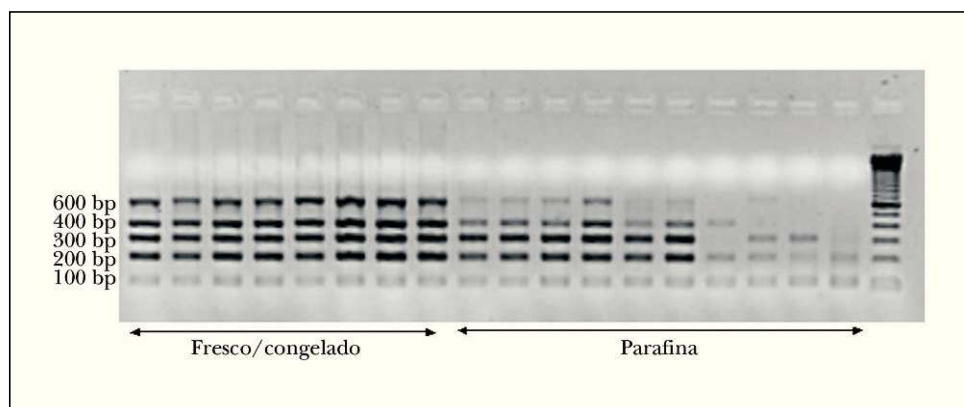
El control de calidad del ADN es un aspecto crucial en la aplicación del programa BIOMED-2, principalmente a muestras incluidas en parafina. Se aconseja el desarrollo de una PCR para amplificar genes control con 5 pares de cebadores que permiten amplificar fragmentos de 100, 200, 300, 400 y 600 pb de longitud, lo cual nos orientará sobre la calidad del ADN de la muestra analizada. Todos los fragmentos de PCR del proyecto BIOMED-2 miden menos de 600 pb (fig. 3). Se recomienda realizar la PCR con 2 cantidades de ADN para excluir el efecto de inhibidores de la PCR (tabla 1)¹⁵.

El material fresco o congelado es el mejor tipo de muestra para obtener ADN de calidad, sin embargo, la mayor parte de las muestras estudiadas en la rutina diagnóstica suelen corresponder a material fijado en formol y paraafinado. El ADN obtenido de estas muestras suele ser de mala calidad, sobre todo si la biopsia fue archivada durante más de 2 años. El proceso de fijación seguido y la calidad del tejido estudiado son asimismo factores determinantes²⁰. Por ello, resulta fundamental realizar un control de calidad del ADN previo a la amplificación. Si el ADN obtenido no supera en el control de calidad una longitud en pb superior al tamaño del gen o segmento amplificado, los resultados obtenidos no suelen ser valorables. Se aconseja asimismo la práctica de un control histológico simultáneo a la obtención del tejido para la extracción del ADN para corroborar que la muestra estudiada es representativa.

Análisis de los fragmentos de reacción en cadena de la polimerasa

Recientemente, se han descrito sistemas automatizados de lectura de los fragmentos de PCR amplificados que permi-

Figura 3. PCR de control de calidad del ADN. Control de calidad del ADN obtenido de muestras frescas/congeladas y en parafina. La banda de mayor tamaño indica el tamaño máximo amplificable mediante PCR de un segmento de ADN.



ten aumentar la capacidad de discriminación con respecto a los sistemas clásicos de lectura en geles de electroforesis²¹⁻²⁸. El proyecto BIOMED-2 recomienda la lectura de los productos amplificados de PCR mediante electroforesis capilar utilizando cebadores marcados con fluorocromos (GeneScan [GS]) o utilizando geles de poliacrilamida en los que se analiza la formación de heterodúplex (análisis heterodúplex [AH])²⁹⁻³¹.

En una neoplasia linfoide, al proceder todas las células de un clon maligno éstas presentarán el ADN reordenado de la misma forma, por lo que al estudiar mediante PCR el reordenamiento VDJ se obtendrá uno o 2 productos de PCR (reordenamiento de uno o 2 alelos). Por el contrario, si el ADN procede de una población policlonal existirán numerosos reordenamientos VDJ. La visualización del producto de PCR se puede realizar mediante electroforesis en geles de acrilamida o electroforesis capilar. En el primer caso observaremos múltiples bandas discretas si se trata de una población policlonal o una o dos bandas si se trata de una población monoclonal. Mediante electroforesis capilar observaremos múltiples picos con una distribución gaussiana de pesos moleculares en el caso de poblaciones policlonales y uno o dos picos en las poblaciones monoclonales.

El AH utiliza productos de PCR de doble cadena y los separa en función de su longitud y conformación, mientras que GS analiza productos de una sola cadena y los separa únicamente en función de su longitud. En el caso de una muestra con una población linfoide monoclonal se formará una proporción variable de homodúplex. Su visualización mediante electroforesis en gel de poliacrilamida permite ver una banda de una longitud adecuada. Las muestras con una elevada proporción de células policlonales producen elevada cantidad de heterodúplex con poca probabilidad de unión de homodúplex.

El GS permite distinguir entre los productos amplificados incluso cuando difieren en un solo pb de longitud, permitiendo detectar un mismo clon en diferentes muestras o tejidos sin necesidad de realizar una secuenciación. Se con-

sidera que el sistema AH podría mostrar una sensibilidad y especificidad superiores al GS, especialmente en las amplificaciones de los reordenamientos de $Ig\kappa$, κ de e $Ig\lambda$. En el análisis de los segmentos DJ del gen IgH pueden usarse indistintamente AH o GS¹⁵.

Análisis de fragmentos fluorescentes (GeneScan)

En el sistema GS uno de los cebadores es marcado con fluorocromo y después de la amplificación los productos de PCR se discriminan o se separan en sistema de electroforesis en capilares de polímeros. Para dicho proceso, un microlitro del producto de PCR se mezcla con 0,5 μ l de un producto de peso molecular estándar (GeneScan 400-ROX, Applied Biosystems, Foster City, CA) en 9 μ l de formamida desionizada (Applied Biosystems) para su separación por desnaturalización en cadenas simples de ADN. Los productos son detectados de forma automática por lectura de fluorescencia mediante un sistema láser en un secuenciador automático de ADN (ABIPrism 3100, Applied Biosystems). Un resultado se considera monoclonal si se obtienen uno o 2 picos de producto amplificado con una longitud en pb apropiada para la técnica de PCR que se está analizando. Si se detectan de 3 a 5 picos puede considerarse como un resultado oligoclonal y más de 5 picos de longitudes diferentes como un resultado policlonal. Para considerar un resultado como un patrón monoclonal verdadero, la altura de un pico debe ser de al menos el doble de la distribución normal de los picos policlonales, correspondientes a las células reactivas acompañantes del infiltrado (fig. 4).

La sensibilidad global en la detección de clonalidad linfoide B o T de los protocolos BIOMED-2 y lectura mediante GS es de aproximadamente 0,5-5%. Los límites de la sensibilidad dependen de la técnica empleada, de la calidad de la muestra (las muestras parafinadas tienen menor rendimiento) y de la proporción de la población linfoide reactiva acompañante. Una técnica se considera suficien-

Tabla 1. Protocolos de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) BIOMED-2

| |
|---|
| <p>En el protocolo BIOMED-2, para la PCR-V_H se emplean 3 sets de cebadores, cada uno con 6 o 7 cebadores, un set para cada FR (FRI, FRII, FRIII), capaces de unirse a los correspondientes V_H (V_H1-7). Se emplea un simple set J_H capaz de unirse a los 6 J_H funcionales. El producto PCR-V_H esperado es de aproximadamente 100-170 pb, 250-295 pb y 310-360 pb para FRIII, FRII y FRI, respectivamente. La PCR-D_H emplea 7 cebadores, uno por familia, y el mismo set J_H de la PCR-V_H. El producto de PCR esperado es de un tamaño entre 100-420 pb. La longitud del gen VJ de Ig_κ varía entre 120-300 pb y para Ig_λ de 140-165 pb. Además, el locus Ig_κ puede sufrir el reordenamiento del segmento κ de directamente al V_κ, de una longitud de 210-390 pb. Este reordenamiento produce la inactivación del alelo Ig_κ. El tamaño de los productos de la PCR del TCR_γ varía entre 231-283 pb para el grupo I, 147-207 pb para el grupo II, 132-182 pb para el grupo III y 116-165 pb para el grupo IV. El tamaño del producto final del reordenamiento β es de aproximadamente 170-325 pb, dependiendo del grupo de cebadores empleados</p> |
| <p>Reactivos de la PCR</p> |
| <p>100 ng ADN</p> |
| <p>10 pmol de cada <i>primer</i> (marcados con fluorocromo o no dependiendo del sistema de lectura que se emplee). El número y tipo de <i>primer</i> o cebador para cada tubo depende de cada PCR específica</p> |
| <p>Nucleótidos para una concentración final de 200 μM</p> |
| <p>Cloruro de magnesio (MgCl₂) a una concentración final de 1,5 mM</p> |
| <p>Taq polimerasa 1-2 unidades (dependiendo de si el tubo de PCR tiene más o menos cebadores) (AmpliTaQ Gold [Applied Biosystems, Foster City, CA, USA])</p> |
| <p>ABI Buffer II o ABI Gold para un volumen final de 50 μl (AmpliTaQ Gold [Applied Biosystems])</p> |
| <p>Condiciones de la PCR</p> |
| <p>Preactivación de la Taq polimerasa durante 7 minutos a 95 °C</p> |
| <p>Temperatura de hibridación 60 °C</p> |
| <p>Número de ciclos: 35</p> |
| <p>Fases por ciclo: Desnaturalización 30 (a 45) segundos (equipos nuevos de PCR son más rápidos) Hibridación 30 (a 45) segundos Extensión 30 segundos (a minuto y medio)</p> |
| <p>Extensión final de 10 minutos</p> |
| <p>Mantenimiento posible del producto a temperatura ambiente o 15 °C</p> |

temente sensible si detecta al menos una población clonal que suponga el 5-10% de la población linfocítica total del infiltrado.

Análisis de heterodúplex

Los productos de PCR se desnaturalizan por calor (95 °C durante 5 minutos) y posteriormente se renaturalizan rápidamente a temperatura baja (4 °C durante 1 hora) para buscar de nuevo su hibridación espontánea, ahora de forma aleatoria, de tal modo que se obtienen fragmentos de ADN homo- o heterodúplex con diferente conformación. Las diferentes conformaciones obtenidas dan distintas características físicas a los heterodúplex, lo que permite separarlos mediante electroforesis en geles de poliacrilamida no desnaturalizantes. Los homodúplex logran una hibridación perfecta y emigran de forma más rápida. Los productos de PCR correspondientes a muestras monoclonales forman una elevada proporción de homodúplex mezclados con heterodúplex obtenidos de los linfocitos policlonales o reactivos acompañantes y se separan claramente en el gel de poliacrilamida en forma de una banda. Las muestras policlonales producen únicamente heterodúplex (fig. 5).

La técnica de AH es rápida y sencilla y posee una sensibilidad global en la detección de clonalidad linfocítica B o T (aplicando los protocolos BIOMED-2) de aproximadamente el 1-10%, incluso cuando se estudian biopsias de archivo incluidas en parafina.

Sensibilidad y especificidad

Falsos negativos (sensibilidad)

Los fallos en la detección de clonalidad pueden explicarse cuando el peso molecular del fragmento que se quiere amplificar es mayor que el que indica la PCR del control de calidad del ADN. El empleo de múltiples cebadores dirigidos contra diferentes segmentos diseñados en el proyecto BIOMED-2 permite minimizar los resultados falsos negativos como consecuencia de errores en la hibridación por la falta de especificidad u homología de los cebadores, particularmente en el estudio de clonalidad B donde las hipermutaciones somáticas en el segmento V_H son las responsables de este fallo de hibridación¹⁹.

Falsos positivos (especificidad)

La detección de falsos positivos o pseudoclonalidad es particularmente un problema importante en casos en los que el infiltrado linfocítico es de características reactivas, con escasa celularidad, o cuando se estudian muestras de pequeño tamaño³². Éste es un elemento crucial en los protocolos de BIOMED-2 y para minimizar este fenómeno se aconseja realizar el análisis por duplicado y si es posible estudiar más de una muestra del mismo paciente. Algunos autores recomiendan que este tipo concreto de muestras deben analizarse simultáneamente por el sistema GS y AH, dado el mayor índice de falsos positivos de GS en tales situaciones.

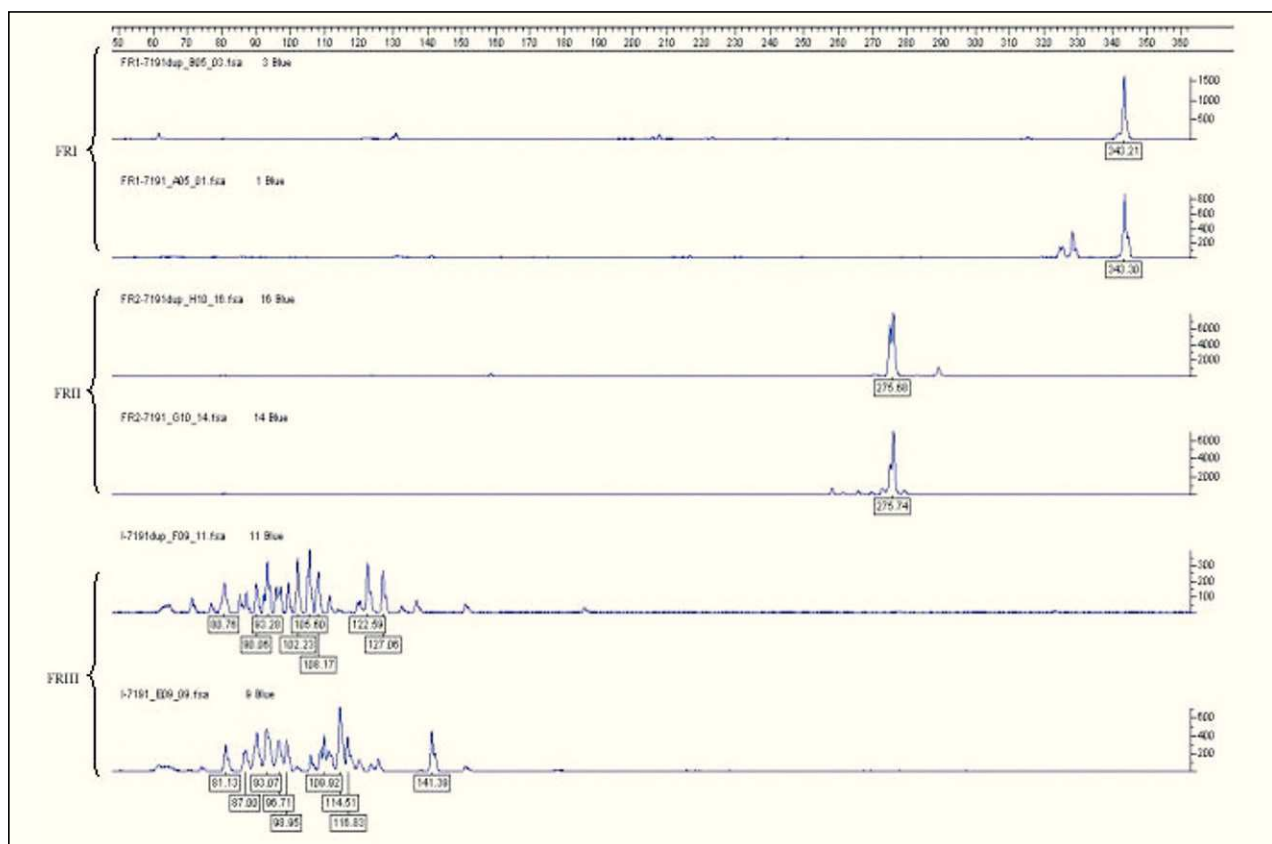


Figura 4. Sistema automatizado de lectura de fragmentos de reacción en cadena de la polimerasa, GeneScan. En la figura se muestra un resultado monoclonal mediante el análisis de FRII y FRI en un caso policlonal en el estudio FRIII.

En aquellos casos en los que no se repita el mismo pico de clonalidad deberían ser considerados como resultados negativos o pseudoclonales. También resulta recomendable comprobar por duplicado la naturaleza clonal de un proceso linfoproliferativo mediante la detección de un clon dominante sobre diferentes dianas o segmentos genéticos de las Ig o del TCR.

Finalmente, conviene recordar que la detección de un reordenamiento monoclonal del gen TCR o Ig no implica inequívocamente un marcador de un linaje o estirpe celular concreto. Si se excluye la posibilidad excepcional de un linfoma compuesto, se pueden detectar o bien reordenamientos aberrantes dobles T y B en una misma muestra o bien reordenamientos cruzados (infidelidades de linaje), sobre todo en neoplasias de células inmaduras, aunque también hasta en el 5-10% de las neoplasias de células maduras³³.

Estudio de clonalidad linfoide T

Aspectos técnicos y metodológicos

La amplificación del gen VJ de la subunidad TCR γ mediante PCR es el método más empleado en la evaluación de

la clonalidad de un infiltrado cuando se sospecha un origen de estirpe celular T^{4,8,10-12,23,26,29,30,34,35}. Es una técnica relativamente simple, ya que el gen se reordena empleando un repertorio limitado de segmentos genéticos. La longitud del segmento amplificado (aproximadamente de unos 200 pb) permite la obtención de resultados en la mayor parte de muestras de material de archivo. El gen TCR γ se encuentra reordenado en la mayor parte de las células T tanto si expresan en superficie el TCR $\alpha\beta$ como el TCR $\gamma\delta$.^{15,36,37}

El análisis de PCR del gen completo VDJ o incompleto DJ que codifica la subunidad TCR β es una técnica de mayor complejidad^{9,38,39}. La subunidad TCR β posee un mayor número de segmentos potencialmente reordenables, por lo que obliga a utilizar un mayor número de cebadores, siendo los segmentos amplificables de mucha mayor longitud o tamaño (fig. 6). El gen TCR β se encuentra reordenado no sólo en todas las células TCR $\alpha\beta$, sino también en muchas TCR $\gamma\delta$.^{15,36,37} El análisis de PCR del gen TCR β representa un estudio complementario a realizar cuando exista una sospecha razonable de linfoma de células T con resultados de PCR-TCR γ no concluyentes. La combinación de ambos estudios puede permitir la detección de clonalidad T en prácticamente el 100% de las muestras de linfomas de células T¹⁵.

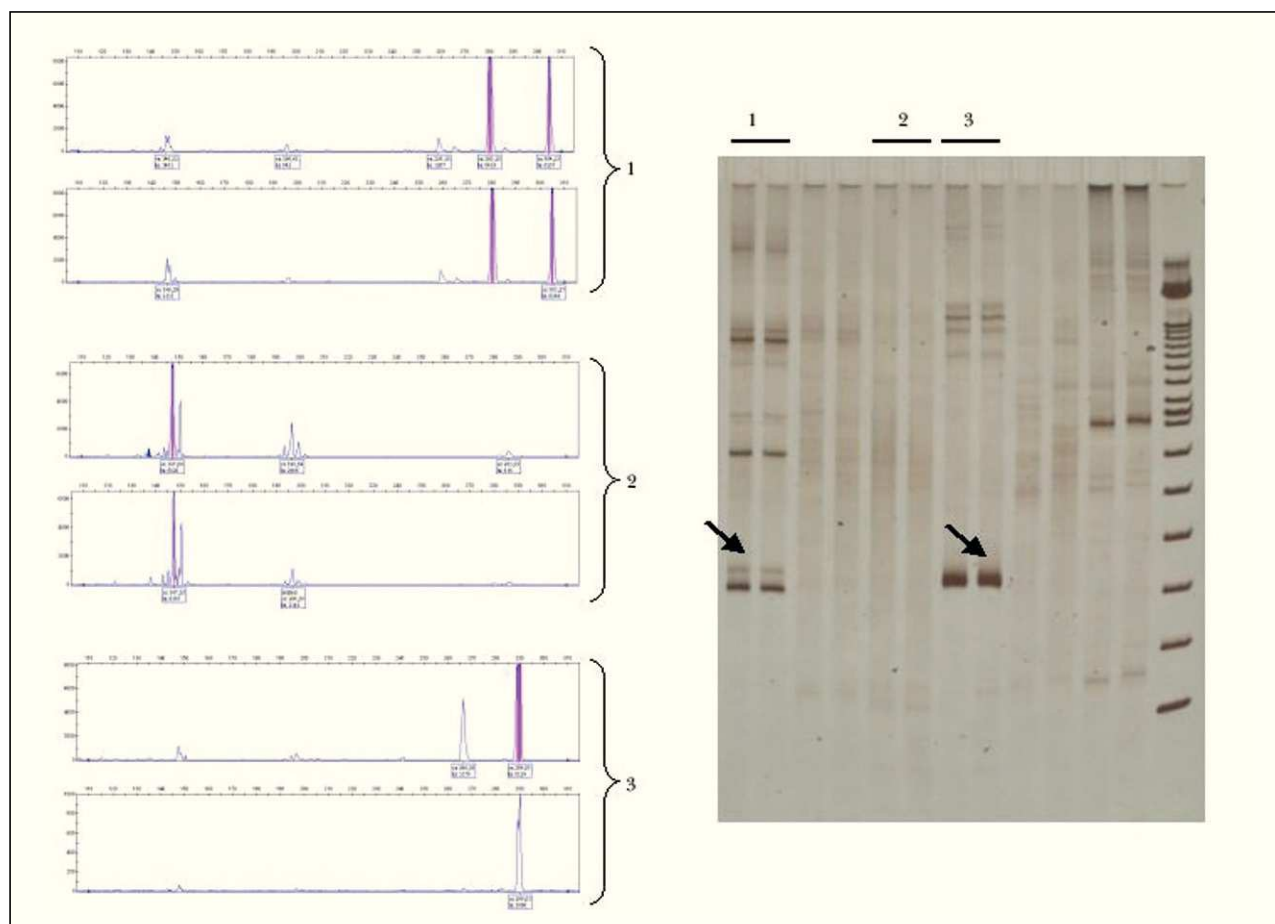


Figura 5. Análisis heterodúplex. El AH puede ser más informativo que el GS en determinados reordenamientos como en el caso de Igλ representado en la figura.

Pueden detectarse asimismo los reordenamientos del gen TCRδ y pueden ser de utilidad tanto en el estudio de neoplasias de células linfoides inmaduras como en los procesos linfoproliferativos derivados de células TCRγδ^{36,37}. Como consecuencia de su complejidad (con un elevado número de segmentos posibles a combinar y muy separados entre sí en su distribución en el genoma), el gen TCRα no se incluye en el proyecto BIOMED-2¹⁵.

Resultados en linfomas cutáneos de células T

La mayor parte de los trabajos publicados empleando sistemas de lectura de geles de electroforesis muestran tasas de clonalidad en linfomas cutáneos de células T (LCCT) en un rango variable del 40-90% de las muestras³⁵. Diferentes aspectos técnicos, tipo de sistema de lectura de los productos amplificados, características de las muestras (parafinadas o congeladas, proporción variable entre estadios precoces o avanzados) pueden explicar las diferencias en las

distintas series. Suele detectarse con mayor frecuencia una proliferación linfocitoide T monoclonal en los casos de micosis fungoide (MF) en estadios avanzados y de síndrome de Sézary (SS) (90-100%) en relación con lesiones de MF en fases precoces (50-70%)^{8,10-12,23,26,29,30,34,35,38-42}.

La aplicación de técnicas de PCR y sistemas de lectura de elevada sensibilidad y especificidad (GS, AH) permiten detectar monoclonalidad linfocitoide en torno al 60-70% de las muestras de LCCT^{8,12,23,26,29,30,40-42}. En la serie de Ponti et al al 162/194 (83,4%) muestras de LCCT resultaron clonales mediante PCR para la amplificación del TCRγ y análisis mediante AH³⁵. Resultados similares (84%) fueron obtenidos por los mismos autores empleando el sistema GS³⁴. Parece existir una buena correlación entre las características del infiltrado (densidad, epidermotropismo), inmunofenotipo (pérdida de antígenos de células T) y estadio con la detección de la presencia de un clon dominante. Excepcionalmente, Cherny et al⁴¹ sólo detectaron un 42% de muestras clonales mediante AH en una serie de LCCT, sin embargo, este resultado parece poco representativo debido al reducido número de casos analizados (n = 7).

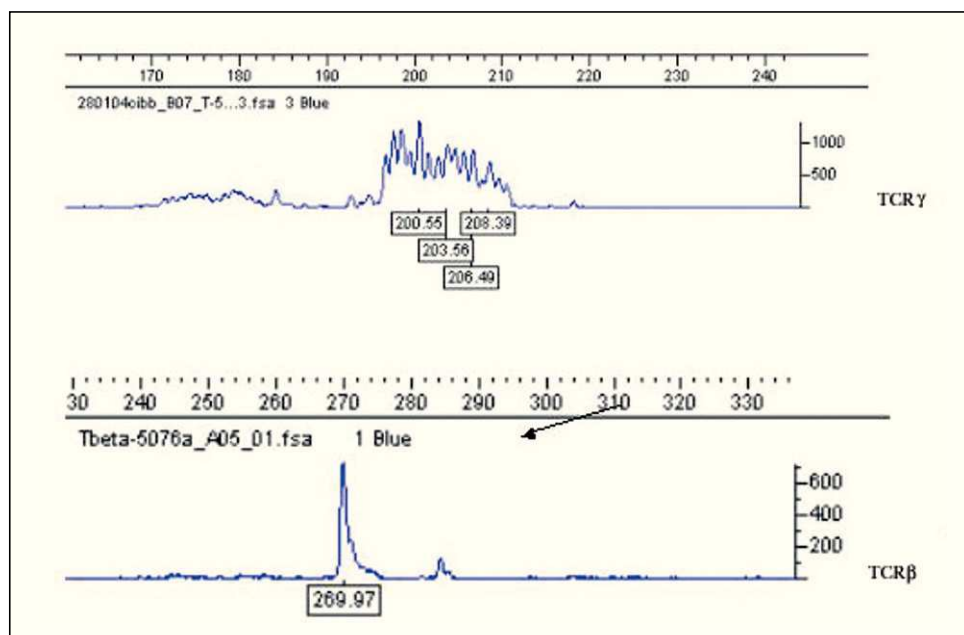


Figura 6. Reordenamiento del gen TCR β . La figura muestra un resultado clonal TCR β no detectado por TCR γ .

La aplicación de los protocolos BIOMED-2 y análisis por GS ha demostrado tener una alta sensibilidad en el estudio de distintos procesos linfoproliferativos cutáneos de células T. Aunque faltan resultados sobre series amplias de muestras en parafina, se han detectado clones T en un 63-85 % de muestras cutáneas de MF/SS mediante PCR-GS del TCR γ y en un 63-75 % mediante PCR-GS del TCR β ^{38,42}.

La detección de un clon dominante en los procesos linfoproliferativos CD30+ es sensiblemente menor que en el resto de LCCT, quizás en parte debido a las características peculiares de un infiltrado linfomatoso que suelen tener una celularidad variada⁴³⁻⁴⁵. En nuestra experiencia, la mitad de las muestras de papulosis linfomatoide (PL) de material congelado suelen ser clonales, así como las dos terceras partes de los LCCT CD30+. En un trabajo reciente realizado sobre muestras parafinadas de PL y LCCT CD30+ mediante PCR-GS sólo se detectó un clon T en un 22 % de los casos (4/18) de PL, particularmente en aquellas formas con un porcentaje elevado de células atípicas. En dicho trabajo en las muestras de LCCT CD30+ la tasa de detección alcanza el 65 % de los casos⁴⁶.

Estos resultados indican que la demostración de un clon dominante es una característica importante en el diagnóstico de un LCCT, siendo infrecuente la presencia de un patrón de reordenamiento policlonal. Sin embargo, también se ha detectado la presencia de un clon linfóide T en un número variable de casos de dermatosis inflamatorias crónicas consideradas benignas y con una relación incierta respecto del desarrollo de un verdadero LCCT^{39,47,48}. Algunos autores han propuesto el concepto de «discrasias linfoides cutáneas» para designar a este grupo de procesos, que in-

cluirían la pitiriasis liquenóide, algunos casos de dermatosis purpúricas pigmentadas, paniculitis lobulillares atípicas, ciertas reacciones a fármacos o incluso un grupo de entidades incluidas bajo el concepto de «parapsoriasis» (PP)⁴⁹.

El diagnóstico diferencial entre las lesiones de PP, definidas como placas eritemato-descamativas persistentes sin criterios histopatológicos diagnósticos de MF, con respecto de las lesiones precoces de MF puede plantear importantes dificultades prácticas. Existe una cierta controversia con respecto a la tasa de detección de clonalidad T en estos casos. Algunos autores detectan clonalidad linfóide T en casi un 50 % de las muestras, proponiendo que estos casos deben considerarse bien como lesiones pre-MF, bien como verdaderas MF incipientes. Sin embargo, otros autores no detectan clonalidad en prácticamente ningún caso⁵⁰⁻⁵⁴. Probablemente la razón de estas discrepancias se deba a la falta de unos criterios homogéneos empleados en la definición del concepto de PP (tabla 2)⁵⁵. En nuestra experiencia, con la aplicación de PCR para el TCR γ la tasa de detección de clonalidad en lesiones de PP es muy baja, menor del 5 %, mientras que aproximadamente el 70 % de los casos de MF en estadios precoces son clonales⁵⁶.

Finalmente, el análisis mediante GS permite la evaluación de la concordancia clonal entre muestras de distintos procesos linfoides que acontecen de forma simultánea o sucesiva en un mismo paciente (por ejemplo, lesiones de MF y de PL). En el caso de que se trate de un mismo clon, el pico monoclonal debe ser idéntico, de la misma longitud, pudiéndose evitar la realización de una secuenciación de los productos de PCR^{57,58}.

Los datos publicados en la literatura referentes a la detección de un clon dominante en procesos linfoproliferati-

Tabla 2. Criterios para el diagnóstico de la micosis fungoide incipiente (*International Society of Cutaneous Lymphoma*)

| Criterios | Mayores (2 puntos) | Menores (1 punto) |
|--|-----------------------|----------------------|
| Clínicos | 2 años | 1 año |
| Persistentes y/o progresivas Máculas o placas MAS Zona no expuesta Variada forma/tamaño Poiquilodermia | | |
| Histológicos | Ambos | Cualquiera |
| Infiltrado linfocitario superficial + Epidermotropismo sin espongiosis Atipia | | |
| Moleculares | | Presente |
| Reordenamiento monoclonal del TCR | | |
| Inmunohistoquímicos | | 1 año |
| CD2, CD3, CD5 < 50 % CD7 < 10 % Discordancia epidermis/dermis | | |

El diagnóstico definitivo de micosis fungoide se realiza con una puntuación de 4 puntos o superior.

vos reactivos T es muy variable (0-24%)⁵⁹⁻⁶¹, tratándose en general de trabajos que emplean sistemas clásicos de electroforesis. Ponti et al demostraron la existencia de un clon dominante hasta en un 2% de muestras de una serie extensa de lesiones reactivas T, indicando una buena especificidad del AH (97,7%), siendo particularmente útil en la distinción entre eritrodermias de origen inflamatorio y SS³⁵. La especificidad de los protocolos BIOMED-2 en el análisis de muestras cutáneas de origen o carácter reactivo es elevada⁴². En este sentido, ante la necesidad de confirmar la presencia de un clon T en un infiltrado linfocitario reactivo, el estudio del gen TCR β , por su mayor repertorio genético, quizá ofrezca una mayor especificidad³⁹.

Estudio de clonalidad linfocitaria B

Aspectos técnicos y metodológicos

El estudio del reordenamiento del gen IgH se realiza mediante cebadores consensuados para las regiones FRI, FRII o FRIII del segmento V_H y para el segmento J_H. El estudio del segmento FRIII-J_H es el más habitualmente realizado por razones de índole técnica, ya que el número de genes combinables es menor y ambos segmentos están muy próximos en el gen reordenado (aproximadamente 100 pb).

Dentro de un contexto clínico-patológico adecuado, en casos en los que no se detecta clonalidad linfocitaria B tras la amplificación por PCR del segmento FRIII-J_H, se recomienda el estudio de los segmentos FRII y el FRI. Sin embargo, el segmento FRI tiene una longitud considerable y su estudio requiere muchos más cebadores, por lo que pocas veces es factible realizarlo a partir de muestras incluidas en parafina¹⁵.

En los protocolos BIOMED-2 se incluye no sólo el análisis del gen completo VDJ del gen IgH, sino también el diseño de una PCR para el estudio del reordenamiento incompleto DJ¹⁵. Este segmento se ve afectado con menor frecuencia por el proceso de hipermutaciones somáticas, fenómeno muy habitual en las neoplasias maduras de células B¹⁹. El elevado número de hipermutaciones somáticas, que ocurren en los segmentos V_H durante el tránsito de la célula B por el centro germinal, condiciona una mayor probabilidad de fallo en la hibridación del *primer* y, por tanto, de resultados falsamente negativos.

Por otro lado, se describen las PCR para la amplificación de los genes Ig λ e Ig κ que en determinadas circunstancias pueden permitir aumentar la sensibilidad en la detección de clonalidad B⁶². Además, no sólo puede realizarse el estudio del gen completo Ig κ , sino también la detección del reordenamiento del segmento κ de, tampoco afectado por hipermutaciones somáticas. El reordenamiento del κ de suele estar presente en todas las neoplasias Ig λ y una tercera parte de las de origen Ig κ . El estudio de los reordenamientos incompletos DJ, así como de los genes Ig λ e Ig κ y del κ de, se emplea en aquellos casos en los que no se ha podido demostrar la presencia de una población monoclonal B después del análisis del gen completo (VDJ) IgH (fig. 7)¹⁵.

Resultados en linfomas cutáneos de células B

El estudio de la clonalidad linfocitaria B mediante PCR de la región FRIII permite detectar clonalidad en un 30-70% de los linfomas B dependiendo del tipo de muestra y técnica de laboratorio empleada^{1,27,63,64}. La aplicación del protocolo BIOMED-2 en muestras de linfomas sistémicos de células B de calidad adecuada estudiando simultáneamente las regiones FRI, FRII y FRIII podría detectar un patrón clonal hasta en un 90-95% de los casos. La razón por la cual no se detecta clonalidad en la totalidad de casos es, muy probablemente, la presencia de hipermutaciones somáticas^{15,16}.

La combinación del estudio del reordenamiento completo de la IgH (VDJ) con el de los reordenamientos incompletos DJ, así como el reordenamiento de las cadenas ligeras, ha permitido alcanzar un porcentaje de detección de clonalidad en prácticamente el 100% de los casos de los linfomas del manto, leucemias linfáticas crónicas, lin-

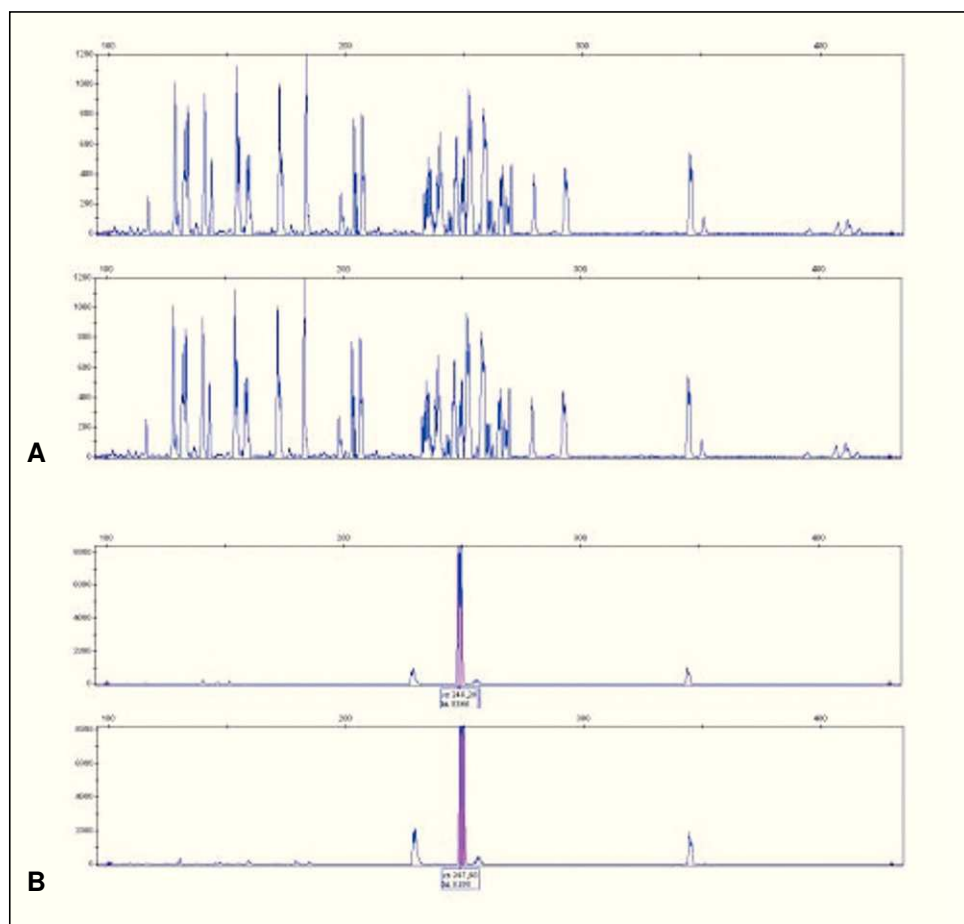


Figura 7. Estudio del reordenamiento incompleto DJ del gen IgH. Caso clonal por DJ (B) no detectado en el estudio del gen completo VDJ (A).

fomas foliculares y los linfomas de la zona marginal, y hasta el 98 % de los linfomas difusos de células B grandes^{15,16}.

En los linfomas cutáneos de células B (LCCB) los diferentes trabajos publicados que emplean técnicas de PCR sobre clonalidad B, y en general con sistemas de lectura en electroforesis, detectan una sensibilidad entre el 34-83 %^{42,63,65-70}. Se ha de tener en cuenta que en la mayor parte de los trabajos publicados se analiza exclusivamente la región o segmento FRIII, por lo que los resultados falsos negativos pueden representar hasta el 50 %⁶⁴.

Gellrich et al, en un trabajo reciente sobre muestras en parafina de LCCB y empleando los protocolos BIOMED-2 para la amplificación del gen completo VDJ IgH (FRIII, FRII, FRI), demostraron una tasa de clonalidad global del 55,8 % (el 100 % en los LCCB tipo de las piernas, el 54,5 % en los LCCB de la zona marginal y el 66,7 % en los LCCB foliculares)⁷¹. En este trabajo la PCR para FRIII detectó un 46,5 % de clonalidad (el 100 % en los tipo de las piernas, el 36,4 % en los linfomas de la zona marginal y el 40,7 % de los linfomas cutáneos foliculares). La PCR de FRI detectó sólo un 20,9 % considerando todas las muestras (hasta un 76 % de las muestras en parafina tenían un control de calidad inferior al aconsejable para amplificar

el fragmento FRI). Sin embargo, si se consideraban sólo las muestras amplificables, la PCR de FRI mostraba la tasa de detección de clonalidad más alta (90 %), lo cual indica que es una excelente técnica, particularmente en material fresco o congelado. El estudio de otras regiones FR parece aumentar de forma significativa la sensibilidad y, probablemente aún más de forma muy considerable si se añaden asimismo en el análisis genotípico B los reordenamientos incompletos DJ, Igλ, Igκ y κde¹⁵.

Conclusión

El proyecto de estudio de clonalidad BIOMED-2 y análisis mediante GS/AH ha demostrado ser una estrategia diagnóstica de elevada sensibilidad y especificidad en el estudio de pacientes con procesos linfoproliferativos cutáneos. El control de la calidad y amplificabilidad del ADN, particularmente cuando es obtenido a partir de material incluido en parafina, es un elemento crucial a la hora de establecer si una muestra en particular puede explorarse mediante una determinada técnica de PCR. El estudio de PCR debe realizarse por duplicado para cada muestra y, si

es posible, en dos muestras diferentes del mismo paciente. Si no se reproduce el mismo pico de clonalidad (con igual longitud) no puede considerarse como un resultado positivo. De esta forma se evita la interpretación errónea de monoclonalidad (falsos positivos o pseudoclonalidad).

En el análisis de clonalidad de un infiltrado linfoide de células T, inicialmente se estudia la amplificación por PCR del TCR γ , ya que representa el prototipo de segmento de longitud corta y pocas regiones variables, lo que permite su preservación en material parafinado de archivo. El TCR γ está reordenado precozmente en la mayor parte de las neoplasias de células T, tanto en las de fenotipo TCR $\alpha\beta$ como en las de TCR $\gamma\delta$. Debido a su mayor complejidad y laboriosidad técnica, el estudio del reordenamiento del gen TCR β genera una estrategia complementaria para aquellos casos en los que ha fallado la detección mediante la amplificación del TCR γ .

La secuencia estratégica en el estudio de clonalidad B sería iniciar el estudio del gen IgH primero en su segmento FRIII y posteriormente los segmentos FRII y FRI. Aunque las frecuencias de la detección de reordenamientos incompletos DJ, Ig κ , Ig λ , κ de son menores que en el estudio del gen completo VDJ, son dianas complementarias interesantes porque no se ven afectadas por las hipermutaciones, presentes particularmente en los LCCB de la zona marginal y los LCCB de células del centro folicular.

Conflicto de intereses

Declaramos no tener ningún conflicto de intereses.

Bibliografía

1. Trainor KJ, Brisco MJ, Wan JH, Neoh S, Grist S, Morley AA. Gene rearrangement in B- and T-lymphoproliferative disease detected by the polymerase chain reaction. *Blood*. 1991;78:192-6.
2. Volkenandt M, Wienecke R, Tiemann M. Detection of monoclonal lymphoid cells populations by polymerase chain reaction technology. *Dermatol Clin*. 1994;12:341-9.
3. Penneys NS, Leonardi C. Polymerase chain reaction: relevance for dermatopathology. *J Cutan Pathol*. 1991;18:3-7.
4. McCarthy KP, Sloane JP, Kabarowski JHS, Matutes E, Wiedemann LM. A simplified method of detection of clonal rearrangements of the T-cell receptor-gamma chain gene. *Diagn Mol Pathol*. 1992;1:173-9.
5. McCarthy KP, Sloane JP, Kabarowski JH, Matutes E, Wiedemann LM. The rapid detection of clonal T-cell proliferations in patients with lymphoid disorders. *Am J Pathol*. 1991;138:821-8.
6. Bourguin A, Tung R, Galili N, Sklar J. Rapid, non radioactive detection of clonal T-cell receptor gene rearrangements in lymphoid neoplasms. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1990;87:8536-40.
7. Curco N, Servitje O, Lluçia M, Bertran J, Limon A, Carmona M, et al. Genotypic analysis of cutaneous T-cell lymphoma: a comparative study of Southern blot analysis with polymerase chain reaction amplification of the T-cell receptor-gamma gene. *Br J Dermatol*. 1997;137:673-9.
8. Dippel E, Assaf C, Hummel M, Schrag HJ, Stein H, Goerdts S, et al. Clonal T-cell receptor gamma-chain gene rearrangement by PCR-based GeneScan analysis in advanced cutaneous T-cell lymphoma: a critical evaluation. *J Pathol*. 1999;188:146-54.
9. Lessin SR, Rook AH, Rovera G. Molecular diagnosis of cutaneous T-cell lymphoma: polymerase chain reaction amplification of T-cell antigen receptor beta-chain gene rearrangements. *J Invest Dermatol*. 1991;96:299-302.
10. Algara P, Soria C, Martínez P, Sánchez L, Villuendas R, García P, et al. Value of PCR detection of TCR gamma gene rearrangement in the diagnosis of cutaneous lymphocytic infiltrates. *Diagn Mol Pathol*. 1994;3:275-82.
11. Bachelez H, Bioul L, Flageul B, Baccard M, Moulon-guet-Michau I, Verola O, et al. Detection of clonal T-cell receptor gamma gene rearrangements with the use of the polymerase chain reaction in cutaneous lesions of mycosis fungoides and Sézary syndrome. *Arch Dermatol*. 1995;131:1027-31.
12. Wood GS, Tung RM, Haeffner AC, Crooks CF, Liao S, Orozco R, et al. Detection of clonal T-cell receptor gamma gene rearrangements in early mycosis fungoides/Sézary syndrome by polymerase chain reaction and denaturing gradient gel electrophoresis (PCR/DGGE). *J Invest Dermatol*. 1994;103:34-41.
13. Guitart J, Kaul K. A new polymerase chain reaction-based method for the detection of T-cell clonality in patients with possible cutaneous T-cell lymphoma. *Arch Dermatol*. 1999;135:158-62.
14. Wood GS, Uluer AZ. Polymerase chain reaction/denaturing gradient gel electrophoresis (PCR-DGGE). *Am J Dermatopathol*. 1999;21:547-51.
15. van Dongen JJ, Langerak AW, Brüggemann M, Evans PAS, Hummel M, Lavender FL, et al. Design and standardization of PCR primers and protocols for detection of clonal immunoglobulin and T-cell receptor gene recombinations in suspect lymphoproliferations: report of the BIOMED-2 Concerted Action BMH4-CT98-3936. *Leukemia*. 2003;17:2257-317.
16. Evans PA, Pott Ch, Groenen PJ, Salles G, Davis F, Berger F, et al. Significantly improved PCR-based clonality testing in B-cell malignancies by use of multiple immunoglobulin gene targets. Report of the BIOMED-2 Concerted Action BHM4-CT98-3936. *Leukemia*. 2007;21:207-14.
17. Tonegawa S. Somatic generation of antibody diversity. *Nature*. 1983;302:575-81.
18. Davis MM, Bjorkman PJ. T-cell antigen receptor genes and T-cell recognition. *Nature*. 1988;334:395-402.
19. Kuppers R, Klein U, Hansmann ML, Rajewsky K. Cellular origin of human B-cell lymphomas. *N Engl J Med*. 1999;341:1520-9.
20. Slack DN, McCarthy KP, Wiedemann LM, Sloane JP. Evaluation of sensitivity, specificity and reproducibility of an optimised method for detecting clonal rearrangements of immunoglobulin and T-cell receptor genes in formalin-fixed, paraffin-embedded sections. *Diagn Mol Pathol*. 1993;2:223-32.
21. Kneba M, Bolz I, Linke B, Hiddemann W. Analysis of rearranged T-cell receptor beta-chain genes by polymerase chain

- reaction (PCR) DNA sequencing and automated high resolution PCR fragment analysis. *Blood*. 1995;86:3930-7.
22. Scheller U, Muche M, Sterry W, Lukowsky A. Detection of clonal T cells in cutaneous T cell lymphoma by polymerase chain reaction: comparison of mutation detection enhancement-polyacrylamide gel electrophoresis, temperature gradient gel electrophoresis and fragment analysis of sequencing gels. *Electrophoresis*. 1998;19:653-8.
 23. Lukowsky A, Richter S, Dijkstal K, Sterry W, Muche M. A T-cell receptor gamma polymerase chain reaction assay using capillary electrophoresis for the diagnosis of cutaneous T-cell lymphomas. *Diagn Mol Pathol*. 2002;11:59-66.
 24. Assaf C, Hummel M, Dippel E, Goerdts S, Müller HH, Anagnostopoulos I, et al. High detection rate of T-cell receptor beta chain rearrangement in T-cell lymphoproliferations by family specific polymerase chain reaction in combination with the GeneScan technique and DNA sequencing. *Blood*. 2000;96:640-6.
 25. Gutzmer R, Mommert S, Kiehl P, Wittmann M, Kapp A, Werfel T. Detection of clonal T cell receptor gamma gene rearrangements in cutaneous T cell lymphoma by LightCycler-polymerase chain reaction. *J Invest Dermatol*. 2001;116:926-32.
 26. Costa C, Gallardo F, Pujol R, Espinet B, Bellosillo B, Estrach T, et al. Comparative analysis of TCR-gamma gene rearrangements by Genescan and polyacrylamide gel-electrophoresis in cutaneous T-cell lymphoma. *Acta Derm Venereol*. 2004;84:6-11.
 27. Linke B, Bolz I, Fayyazi A, von Hofen M, Pott C, Bertram J, et al. Automated high resolution PCR fragment analysis for identification of clonally rearranged immunoglobulin heavy chain genes. *Leukemia*. 1997;11:1055-62.
 28. Gleissner B, Maurer J, Sindram A, Reinhard R, Thiel E. Comparison of ethidium bromide-stained agarose gel electrophoresis and automated fragment analysis for evaluation of IgH gene products. *Leuk Res*. 2001;25:769-74.
 29. Bottaro M, Berti E, Biondi A, Migone N, Crosti L. Heteroduplex analysis of T-cell receptor gamma gene rearrangements for diagnosis and monitoring of cutaneous T-cell lymphomas. *Blood*. 1994;83:3271-8.
 30. Theodorou I, Delfau-Laure MH, Bigorgne C, Lahet C, Cochet G, Bagot M, et al. Cutaneous T-cell infiltrates: analysis of T-cell receptor gamma gene rearrangement by polymerase chain reaction and denaturing gradient gel electrophoresis. *Blood*. 1995;86:305-10.
 31. Kohler S, Jones CD, Warnke RA, Zehnder JL. PCR-heteroduplex analysis of T-cell receptor gamma gene rearrangement in paraffin-embedded skin biopsies. *Am J Dermatopathol*. 2000;22:321-7.
 32. Elenitoba-Johnson KS, Bohling SD, Mitchell RS, Brown MS, Robetorye RS. PCR analysis of the immunoglobulin heavy chain gene in polyclonal processes can yield pseudoclonal bands as an artifact of low B cell number. *J Mol Diagn*. 2000;2:92-6.
 33. García MJ, Martínez-Delgado B, Granizo JJ, Benítez J, Rivas C. IgH, TCR gamma, and TCR beta gene rearrangement in 80 B- and T-Cell Non-Hodgkin's lymphomas: study of the association between proliferation and the so-called aberrant patterns. *Diagn Mol Pathol*. 2001;10:69-77.
 34. Ponti R, Fierro MT, Quaglino P, Lisa B, Paola FC, Michela O, et al. TCR γ -Chain Gene Rearrangement by PCR-Based GeneScan: Diagnostic Accuracy Improvement and Clonal Heterogeneity Analysis in Multiple Cutaneous T-Cell Lymphoma Samples. *J Invest Dermatol*. 2008;128:1030-8. Epub 2007.
 35. Ponti R, Quaglino P, Novelli M, Fierro MT, Comessatti A, Peroni A, et al. T-cell receptor gamma gene rearrangement by multiplex polymerase chain reaction/heteroduplex analysis in patients with cutaneous T-cell lymphoma (mycosis fungoides/Sézary syndrome) and benign inflammatory disease: correlation with clinical, histological and immunophenotypical findings. *Br J Dermatol*. 2005;153:565-73.
 36. Medeiros LJ, Carr J. Overview of the role of molecular methods in the diagnosis of malignant lymphomas. *Arch Pathol Lab Med*. 1999;123:1189-207.
 37. Hodges E, Krishna MT, Pickard C, Smith JL. Diagnostic role of tests for T cell receptor genes. *J Clin Pathol*. 2003;56:1-11.
 38. Morgan SM, Hodges E, Mitchell T, Harris S, Whittaker S, Smith J. Molecular analysis of T-cell receptor beta genes in cutaneous T-cell lymphoma reveal Jbeta1 bias. *J Invest Dermatol*. 2006;126:1893-9.
 39. Plaza JA, Morrison C, Magro CM. Assessment of TCR-beta clonality in a diverse group of cutaneous T-Cell infiltrates. *J Cutan Pathol*. 2008;35:358-65. Epub 2007.
 40. Chen M, Deng A, Crowson AN, Srinivasan M, Yearsley KH, Jewell S, et al. Assessment of T-cell Clonality via T-cell Receptor-gamma Rearrangements in Cutaneous T-cell-Dominant Infiltrates Using Polymerase Chain Reaction and Single-stranded DNA Conformational Polymorphism Assay. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*. 2004;12:373-9.
 41. Cherny S, Mraz S, Su L, Harvell J, Kholer S. Heteroduplex analysis of T-cell receptor gamma gene rearrangement as an adjunct diagnostic tool in skin biopsies for erythroderma. *J Cutan Pathol*. 2001;28:351-5.
 42. Sandberg Y, Heule F, Lam K, Lugtenburg PJ, Wolvers-Tettero IL, van Dongen JJ, et al. Molecular immunoglobulin/T-cell receptor clonality analysis in cutaneous lymphoproliferations. Experience with the BIOMED-2 standardized polymerase chain reaction protocol. *Haematologica*. 2003;88:659-70.
 43. Harrington DS, Braddock SW, Blocher KS, Weisenburger DD, Sanger W, Armitage JO. Lymphomatoid papulosis and progression to T cell lymphoma: an immunophenotypic and genotypic analysis. *J Am Acad Dermatol*. 1989;21:951-7.
 44. Weiss LM, Wood GS, Trela M, Warnke RA, Sklar J. Clonal T-cell populations in lymphomatoid papulosis. Evidence of a lymphoproliferative origin for a clinically benign disease. *N Engl J Med*. 1986;315:475-9.
 45. El-Azhary RA, Gibson LE, Kurtin PJ, Pittelkow MR, Muller SA. Lymphomatoid papulosis: a clinical and histopathologic review of 53 cases with leukocyte immunophenotyping, DNA flow cytometry, and T-cell receptor rearrangement studies. *J Am Acad Dermatol*. 1994;30:210-8.
 46. Greisser J, Palmedo G, Sander C, Kutzner H, Kazakov DV, Roos M, et al. Detection of clonal rearrangement of a T-cell receptor genes in the diagnosis of primary cutaneous CD30 lymphoproliferative disorders. *J Cutan Pathol*. 2006;33:711-5.
 47. Weiss LM, Wood GS, Ellisen LW, Reynolds TC, Sklar J. Clonal T-cell populations in pityriasis lichenoides et varioliformis.

- formis acuta (Mucha-Habermann disease). *Am J Pathol.* 1987;126:417-21.
48. Gordon KB, Guitart J, Kuzel T, Salard D, Bakouche O, Domer P, et al. Pseudo-mycosis fungoides in a patient taking clonazepam and fluoxetine. *J Am Acad Dermatol.* 1996; 34:304-6.
 49. Guitart J, Magro C. Cutaneous T-cell lymphoid dyscrasia: a unifying term for idiopathic chronic dermatoses with persistent T-cell clones. *Arch Dermatol.* 2007;143:921-32.
 50. Kikuchi A, Naka W, Harada T, Sakuraoka K, Harada R, Nishikawa T. Parapsoriasis in plaque: its potential for progression to malignant lymphoma. *J Am Acad Dermatol.* 1993;29:419-22.
 51. Haefner AC, Smoller BR, Zepter K, Wood GS. Differentiation and clonality of lesional lymphocytes in small plaque parapsoriasis. *Arch Dermatol.* 1995;131:321-4.
 52. Muche M, Lukowsky A, Heim J, Friedrich M, Audring H, Sterry W. Demonstration of frequent occurrence of clonal T cells in the peripheral blood but not in the skin of patients with small plaque parapsoriasis. *Blood.* 1999;94:1409-17.
 53. Stachowitz S, Mempel M, Schmöckel C, von Spanyl R, Abeck D. Variable course of patients with plaque psoriasis: lack of transformation into tumours mycosis fungoides. *Blood.* 2000;95:3635-6.
 54. Klemke CD, Dippel E, Dembinski A, Ponitz N, Assaf C, Hummel M, et al. Clonal T cell receptor γ -chain gene rearrangement by PCR-based GeneScan analysis in the skin and blood of patients with parapsoriasis and early stage mycosis fungoides. *J Pathol.* 2002;197:348-54.
 55. Pimpinelli N, Olsen EA, Santucci M, Vonderheid E, Haefner AC, Stevens S, et al. Defining early mycosis fungoides. *J Am Acad Dermatol.* 2005;53:1053-63.
 56. Costa C, Gallardo F, Bellosillo B, Espinet B, Pujol R, Barranco C, et al. Analysis of T-cell receptor gamma gene rearrangements by PCR-Genescan and PCR-polyacrylamide gel electrophoresis in early-stage mycosis fungoides/large-plaque parapsoriasis. *Dermatology.* 2003;207:418-9.
 57. Gallardo F, Costa C, Bellosillo B, Sole F, Estrach T, Servitje O, et al. Lymphomatoid papulosis associated with mycosis fungoides: clinicopathological and molecular studies of 12 cases. *Acta Derm Venereol.* 2004;84:463-8.
 58. Basarab T, Fraser-Andrews EA, Orchard G, Whittaker S, Russel-Jones R. Lymphomatoid papulosis in association with mycosis fungoides: A study of 15 cases. *Br J Dermatol.* 1998; 139:630-8.
 59. Delfau-Larue MH, Laroche L, Wechsler J, Lepage E, Lahet C, Asso-Bonnet M, et al. Diagnostic value of dominant T-cell clones in peripheral blood in 363 patients presenting consecutively with a clinical suspicion of cutaneous lymphoma. *Blood.* 2000;96:2987-92.
 60. Cordel N, Lenormand B, Courville P, Helot MF, Benichou J, Joly P, et al. Usefulness of cutaneous T-cell clonality analysis for the diagnosis of cutaneous T-cell lymphoma in patients with erythroderma. *Arch Pathol Lab Med.* 2005;129:372-6.
 61. Muche M, Lukowsky A, Asadullah K, Gellerich S, Sterry W. Demonstration of frequent occurrence of clonal T-cells in the peripheral blood of patients with primary cutaneous T-cell lymphoma. *Blood.* 1997;4:1636-42.
 62. Amara K, Trimeche M, Ziadi S, Sriha B, Mokni M, Korbi S. PCR-based clonality analysis of B-cell lymphomas in paraffin-embedded tissues: diagnostic value of immunoglobulin kappa and lambda light chain gene rearrangement investigation. *Pathol Res Pract.* 2006;202:425-31.
 63. Hughes J, Weston S, Bennetts B, Prasad M, Angulo R, Jaworski R, et al. The application of a PCR technique for the detection of immunoglobulin heavy chain gene rearrangements in fresh or paraffin-embedded skin tissue. *Pathology.* 2001;33:222-5.
 64. Hoeve MA, Krol AD, Philippo K, Derksen PW, Veenendaal RA, Schuurung E, et al. Limitations of clonality analysis of B cell proliferations using CDR3 polymerase chain reaction. *Mol Pathol.* 2000;53:194-200.
 65. Alaibac M, Belloni-Fortina A, Mori M, Pigozzi B, Peserico A, Pimpinelli N. Immunoglobulin heavy chain variable region family expression in primary cutaneous follicle centre cell lymphomas. *Br J Dermatol.* 2001;144:862-5.
 66. Bouloc A, Delfau-Larue MH, Lenormand B, Meunier F, Wechsler J, Thomine E, et al. Polymerase chain reaction analysis of immunoglobulin gene rearrangement in cutaneous lymphoid hyperplasias. French Study Group for Cutaneous Lymphomas. *Arch Dermatol.* 1999;135:168-72.
 67. Cerroni L, Signoretti S, Höfler G, Annessi G, Putz B, Lackinger E, et al. Primary cutaneous marginal zone B-cell lymphoma: a recently described entity of low-grade malignant cutaneous B-cell lymphoma. *Am J Surg Pathol.* 1997; 21:1307-15.
 68. Child F, Woolford AJ, Calonje E, Russell-Jones R, Whittaker SJ. Molecular analysis of the immunoglobulin heavy chain gene in the diagnosis of primary cutaneous B cell lymphoma. *J Invest Dermatol.* 2001;117:984-9.
 69. Ritter JH, Wick MR, Adesokan PN, Fitzgibbon JF, Zhu X, Humphrey PA. Assessment of clonality in cutaneous lymphoid infiltrates by polymerase chain reaction analysis of immunoglobulin heavy chain gene rearrangement. *Am J Clin Pathol.* 1997;108:60-8.
 70. Signoretti S, Murphy M, Puddu P, DeCoteau JF, Faraggiana T, Kadin ME, et al. Clonality of cutaneous B-cell infiltrates determined by microdissection and immunoglobulin gene rearrangement. *Diagn Mol Pathol.* 1999;8:176-82.
 71. Lukowsky A, Marchwat M, Sterry W, Gellerich S. Evaluation of B-cell clonality in archival skin biopsy samples of cutaneous B-cell lymphoma by immunoglobulin heavy chain gene polymerase chain reaction. *Leuk Lymphoma.* 2006;47: 487-93.