Estudio de clonalidad mediante análisis automatizado de fragmentos en linfomas cutáneos primarios

RM. Pujol[1,2], Fernando Gallardo[1,2], Beatriz Bellosillo[2,3], Carlota Costa[2,3], Carlos Barranco[2,3], Francesc Solé[2,3], Teresa Estrach[2,4], Octavio Servitje[2,5], María Pilar García-Muret[2,6] y Sergi Serrano[2,3].

[1]Hospital del Mar-IMAS. [2]Red Temática de Linfomas Cutáneos de Catalunya. [3]Servicio de Patología y Laboratorio de Citogenética y Biología Molecular Hospital del Mar-IMAS. [4]Hospital Clínic, IDIBAPS. [5]Ciutat Sanitària i Universitària de Bellvitge. [6]Hospital Santa Creu i Sant Pau. Barcelona. España.

Introducción

El estudio de los reordenamientos de los genes del receptor de la célula T (TCR) y de las cadenas pesadas de las inmunoglobulinas (IgH) (análisis genotípico) mediante PCR representa el método diagnóstico más utilizado para la demostración del carácter monoclonal o policlonal de una proliferación linfoide cutánea y extracutánea. Representa en la actualidad un elemento importante en el diagnóstico definitivo de un linfoma cutáneo. Sin embargo, el resultado del análisis genotípico debe siempre valorarsedentro de un contexto clínico, histopatológico e inmunofenotípico particular.

El objetivo del trabajo es analizar la sensibilidad en la detección de clonalidad (reordenamiento del TCR-γ e IgH obtenidos mediante PCR) en una serie de linfomas cutáneos primarios células T y B en material de archivo parafinado empleando un sistema automatizado de análisis de fragmentos de ADN (Genescan [GS]).

Material y Métodos

Se analizan un total de 149 muestras de archivo parafinadas correspondientes a pacientes con linfoma cutáneo primario de células T (LCCT) y B (LCCB). Se estudiaron un total de 113 LCCT (incluyendo 52 micosis fungoide [MF] [46 MF en placas, 3 MF tumorales, 3 síndrome de Sézary], 30 proliferaciones linfoides T CD30+ y 8 linfomas T no-MF) y 36 LCCB (24 LCCB zona marginal, 3 LCCB foliculares, 6 LCCB de célula grande tipo de las piernas, 3 LCCB secundarios). Sólo aquellos casos en los que se pudo demostrar restricción monotípica de cadenas ligeras fueron considerados como LCCB y analizados. En 23 casos que no cumplían criterios histopatológicos de MF el diagnóstico establecido fue de parapsoriasis (PP). Como controles se estudiaron 23 lesiones inflamatorias cutáneas (psoriasis, eccema) y 18 pseudolinfomas B.

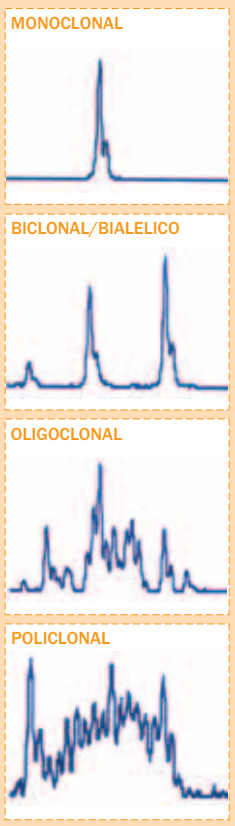
Se utilizaron cebadores ("primers") previamente descritos siguiendo un protocolo estándar de PCR (BIOMED-2 Concerted Action BMH4-CT98-3936) tanto para el estudio del reordenamiento de los genes IgH como del TCR-? mediante PCR y análisis de los fragmentos obtenidos mediante GS. En todos los casos, el análisis se hizo por duplicado para evitar la interpretación de una falsa clonalidad (seudoclonalidad).

Extracción ADN
2 x 15 µm secciones parafinadas
Kit QIAamp Tissue Kit (QIAGEN GmbH, Hilden, Germany)

PCR- TCRγ
200 ng ADN genómico
$V\gamma 2_{1\text{-}9}$ (5´ACG GCG TCT TC(AT) GTA CTA TGA C 3´)*FAM
JGT_3 (5´AGT TAC TAT GAG C(CT) AGT CCC 3´)
$JGT_{1/2}$ (5´AAG TGT TGT TCC ACT GCC AAA 3´)

PCR-IgH
Primers FR(framework region)1, FR2 o FR3 y JH
BIOMED-2 (Van Dogen 2003)

GeneScan análisis [GS]
1 µl de producto PCR en 9 µl formamida
0.5 µl peso molecular estándar
Genescan system ABI 3100
Genescan 400-ROX, Applied Biosystems



Discusión

Nuestros resultados indican que el protocolo de PCR BIOMED-2 representa una sistemática diagnóstica sensible, útil y reproducible en el diagnóstico de lesiones precoces de LCCT con cambios histológicos compatibles en material de archivo parafinado. La especificidad es óptima, no detectándose clonalidad en lesiones con un escaso infiltrado linfoide y de características no diagnósticas de MF (PP). La sensibilidad en la detección de clonalidad en los LCCB aumenta sustancialmente cuando se analizan además del FR3 también FR2 y/o FR1 del gen IgH.

Recientemente, se han introducido nuevas técnicas de análisis de productos de PCR con el objetivo de implementar la sensibilidad y especificidad del análisis genotípico. La técnica de PCR-GS ha demostrado ser un método sensible y fácil de interpretar. Es un sistema sencillo, rápido, y de bajo coste que ahorra un tiempo considerable en el laboratorio. Permite una valoración más objetiva que los sistemas clásicos de lectura en geles de electroforesis y facilita la diferenciación de incluso fragmentos que difieren únicamente en un par de nucleótidos.

Resultados

La sensibilidad de el método empleado es del 2% en nuestro estudio sobre material parafinado. Los resultados obtenidos se hallan detallados en las **Tablas I y II**.

Se detectó una clona dominante en 56/90 LCCT (sensibilidad global: 62%). Se observaron diferencias según el subtipo de linfoma analizado (35/52 [66%] en el grupo MF/SS, 15/30 [50%] en los procesos linfoproliferativos CD30+ independientemente de si se trataba de una PL o un linfoma CD30+ y 6/8 [75%] en LCCT no-MF). Sin embargo, sólo en 1/23 (4%) de los pacientes con biopsias que no cumplían criterios de LCCT (parapsoriasis en placas) se detectó una proliferación monoclonal linfoide T. Únicamente se detectó una clona dominante en un caso de eccema de contacto secundario a Kathon CG cuya clínica se resolvió después de que el paciente evitara contacto con el alérgeno. (Especificidad: 95%; valor predictivo positivo (VPP): 96%; valor predictivo negativo (VPN): 56%).

La sensibilidad global de la detección de clonalidad en LCCB fue del 77%. El subtipo de la zona marginal era el grupo más numeroso con una sensibilidad del 70% (17 de 24 casos). Si se realizaba unanálisis aislado del fragmento FR3, la sensibilidad era del 57% (50% en los LCCB de la zona marginal), mientras que si se estudiaban asimismo los fragmentos FR2 y FR1 (con cebadores específicos), se constataba un aumento de sensibilidad de un 66% y 87%, respectivamente. En ningún caso de pseudolinfoma se demostró clonalidad. (Especificidad: 100%; VPP:100%; VPN: 77%).

Tabla I. Resultados: LCCT

Tipo LCCT	n	TCR-γ	%	Congelado	IgH	Comentario
MF parche/placa	46	31	67	4/6 (66%)		
MF tumor	3	2	66	6/10 (60%)		
Parapsoriasis	23	1	4			
SS	3	2	66	1/1		
CD30+	4	2	50			
PL	26	13	50		1*/6	*Cross lineage
Otros linfomas T	8	6	75	4/6	0*/6	*Pseudoclona
Psoriasis/dermatitis	23	1*	4		2**/7	*Kathon CG **Pseudoclona T y B

Parapsoriasis incluye en pequeñas y grandes placas

Tabla II. Resultados: LCCB

Tipo LCCB	n	IgH	%	FR3	FR2	FR1	TCR-γ	Comentario
LCCB zona marginal (restricción cadenas)	24	17	70%	8/16 (50%)	8/12 (66%)	7/8 (87%)	1/7*	*Cross lineage
LCCB centro folicular (bcl6+/CD10+/bcl2-)	3	3	100%*	2/3	3/3	1/3	0/2	
LCCB tipo piernas (bcl2+)	6	5	83%	4/6	2/4	3/4	0/2	
LCCB secundario	3	3	100%	2/3	2/2	2/2	0/0	
Pseudolinfoma	18	0	0%	0/18	0/13	0/13	2/16*	*pseudoclona
Dermatosis inflamatorias	9	0	0%	0/9	0/3	0/2	0/2	

FR2+/-FR1 pueden aumentar un 20-100% la detección de clonalidad en LCCB

Bibliografía

1. Dippel E, Assaf C, Hummel M, Schrag HJ, Stein H, Goerdt S, Orfanos CE. 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: 146-154.
2. 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.
3. Vergier B, Dubus P, Kutschmar A, Parrens M, Ferrer J, de Mascarel A, Merlio JP. Combined analysis of T cell receptor gamma and immunoglobulin heavy chain gene rearrangements at the single-cell level in lymphomas with dual genotype. J Pathol 2002; 198: 171-80.
4. Van Dongen JJ, Langerak AW, Bruggemann M, Evans PA, 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.
5. Costa C, Gallardo F, Pujol R, Espinet B, 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.