

# Estudios citogenéticos, citomoleculares y moleculares en linfomas cutáneos

Irma Slavutsky

Departamento de Genética,  
Instituto de Investigaciones Hematológicas "Mariano R. Castex"  
Academia Nacional de Medicina.  
Pacheco de Melo 3081, 1425 - Buenos Aires, Argentina  
TE: 4805-8803/5759 int 241/291 - FAX: 4803-9475

Fecha de recepción: 15/10/04  
Fecha de aceptación: 11/11/04



REVISIÓN

HEMATOLOGIA, Vol. 8 N° 3: 68-74  
Setiembre-Diciembre, 2004

Los linfomas cutáneos primarios (LCP) representan un grupo heterogéneo de linfomas no-Hodgkin (LNH) extranodales, cuya patogénesis es poco conocida. Constituyen el segundo sitio en frecuencia de LNH extranodal, con una incidencia estimada de 0,3/100.000 en USA y Europa Occidental y se subdividen en linfomas a células B (30%-40%), T (60%-70%) y NK (<2%)<sup>1</sup>. En el presente trabajo analizaremos las características genéticas de los LCP, con particular énfasis en el análisis molecular de clonalidad y en los estudios citogenéticos y citomoleculares de los diferentes subtipos histológicos.

## ANÁLISIS DE CLONALIDAD

En la mayoría de los pacientes con sospecha de un desorden linfoproliferativo, la histo o citomorfología, suplementada con la inmunohistoquímica o el inmunofenotipo por citometría de flujo pueden discriminar un desarrollo maligno de uno reactivo. Sin embargo, existe un 5%-10% de los casos en los que el diagnóstico se torna más complicado y es en estos pacientes donde resulta de importancia el análisis molecular de clonalidad.

Por largo tiempo, el Southern blot, que consiste en la detección de fragmentos rearrreglados obtenidos después de la digestión del ADN genómico con enzimas de restricción, fue la técnica de elección para el estudio molecular de clonalidad. Una correcta elección de las enzimas de restricción y de las sondas para hibridar permite una buena detección de los rearrreglos clonales de Igs y receptores de células T (TCR), con resultados óptimos para IgH, IgK y TCRB, debido a su amplio repertorio combinacional, intermedios para IgL y TCRA, que requieren la utilización de múltiples sondas, y limitados para TCRG y TRCD, que tienen un repertorio combinacional reducido, que a veces dificulta la discriminación entre monoclonalidad

y policlonalidad. No obstante, esta técnica presenta algunas desventajas: requiere mucho ADN (10 µg) de alto peso molecular, emplea fósforo radioactivo, su realización es muy laboriosa e implica mucho tiempo (15-20 días), no se puede partir de material incluido en parafina y tiene una sensibilidad limitada al 5%-10% (sólo detecta una población clonal correspondiente al 5% o más del total de las células del tejido)<sup>2,3</sup>. Simultáneamente, la posibilidad de falsos positivos o negativos así como la detección errónea de una población pseudoclonal u oligoclonal son eventos poco frecuentes con esta técnica.

Las limitaciones planteadas determinaron que el Southern blot haya sido gradualmente reemplazado por la técnica de PCR (polymerase chain reaction), que requiere el conocimiento preciso del segmento génico rearrreglado a fin de poder diseñar los 'primers' apropiados que se van a pegar a ambos lados de la región en estudio. La PCR tiene como ventajas: su rapidez, el empleo de menor cantidad de ADN, la posibilidad de usar ADN extraído de tacos de parafina (aún parcialmente degradado) y una mayor sensibilidad (puede detectar una población clonal correspondiente al <1%-5% del total de las células de la muestra). Sin embargo, esta técnica presenta también algunas desventajas y limitaciones que dificultan la interpretación de los resultados, entre las que cabe destacar:

- Tiene una *sensibilidad limitada* relacionada con la presencia del componente policlonal normal que puede dificultar la detección de un clon pequeño que represente menos del 5%-10% de las células linfoides clonales.
- *Pseudoclonalidad y oligoclonalidad*: Puede detectar en forma errónea una población linfóide aparentemente clonal (pseudoclonal) u oligoclonal, situación que puede ocurrir cuando las muestras son muy pequeñas o corresponden a ganglios linfá-

tivos reactivos que tienen una reducida diversidad del repertorio Ig/TCR. Esto puede observarse en pacientes con enfermedad activa por EBV o CMV o en cuadros clínicos de inmunosupresión<sup>4, 5</sup>.

- Los rearrreglos de Ig y TCR *no son marcadores de linaje*, dado que no están necesariamente restringidos a los linajes B y T, respectivamente, habiéndose observado rearrreglos de TCR en neoplasias a células B y de Ig en neoplasias a células T, así como de ambos en leucemias mieloides<sup>6, 7</sup>.
- La posibilidad de tener *falsos positivos* constituye un problema serio de la reacción de PCR, por lo que se considera de importancia complementar el estudio con técnicas más sofisticadas que permiten discriminar las bandas rearrregladas entre las policlonales, tales como: PCR/SSCP (single strand conformation polymorphism)<sup>8, 9</sup>, PCR/TGGE (temperature gradient gel electrophoresis)<sup>10</sup>, PCR/DGGE (denaturing gradient gel electrophoresis)<sup>11</sup>, heteroduplex<sup>12</sup>; microdissección con heteroduplex<sup>13</sup>, PCR/GeneScanning y secuenciación<sup>14-16</sup>.
- La presencia de *falsos negativos* que puede deberse a un mala unión de los 'primers' al segmento rearrreglado, relacionada en estos casos, con el uso de 'primers' diseñados para familias de genes o para regiones consenso, que generalmente resultan óptimos para una parte de los genes estudiados pero pueden mostrar una menor homología (70%-80%) con algunos segmentos génicos (problema que es mayor en los genes con muchos segmentos diferentes), o bien la presencia de mutaciones que impiden el buen pegado de los 'primers'. En términos generales podemos decir que el rearrreglo génico de una única muestra no es suficiente para establecer clonalidad, siendo necesario observar la misma banda en dos o más muestras del mismo paciente, que pueden ser de diferentes lesiones de piel o bien de una lesión de piel y de sangre periférica (SP)<sup>17</sup>.

Asimismo, resulta importante tener en cuenta que *la clonalidad no es equivalente de malignidad*, dado que la detección de la misma no siempre implica la presencia de una neoplasia. Se ha observado clonalidad en diferentes lesiones benignas (linfocitosis T CD8+ o CD4+, gammapatías monoclonales benignas, fases iniciales de procesos linfoproliferativos EBV+ en pacientes inmunodeprimidos, proliferaciones cutáneas benignas a células T, etc.) así como en individuos normales<sup>18-22</sup>. Esto implica que los resultados de los estudios moleculares de clonalidad deben ser siempre interpretados en el contexto del diagnóstico clínico, morfológico e inmunofenotípico.

Respecto de la clonalidad T, el análisis molecular de TCRG constituye un marcador genético preferen-

cial en los LCCT dado que se rearregla en estadios tempranos del desarrollo linfoide T<sup>23</sup>, siendo detectado en el 50%-70% de los pacientes<sup>3, 12, 24, 25</sup>. Simultáneamente, tiene una estructura menos compleja que los restantes receptores T: presenta 4 familias V (variable) (I-IV) y dos regiones J (joining) (J<sub>1</sub>/J<sub>2</sub>) cada una con una región consenso, con lo cual se requieren 4 pares de 'primers' que se procesan en dos reacciones multiplex<sup>3, 26</sup>.

En la micosis fungoides (MF) que, conjuntamente con su variante leucémica, el síndrome de Sézary (SS), constituyen el subtipo más frecuente de los linfomas cutáneos a células T (LCCT), la presencia de clonalidad T demostró ser un factor pronóstico independiente de la edad al diagnóstico, el sexo y la extensión cutánea de las lesiones, siendo un parámetro predictivo de respuesta al tratamiento<sup>9, 25</sup>. En el 89% de los casos, la presencia o no del rearrreglo TCRG se mantiene estable durante el curso de la enfermedad<sup>27</sup>, observándose en los pacientes negativos una mayor probabilidad de alcanzar la remisión completa después del tratamiento<sup>25</sup>. Asimismo, Vega et al.<sup>17</sup> detectaron una asociación significativa entre la presencia de clones idénticos en múltiples lesiones y progresión clínica, a diferencia de aquellos casos con heterogeneidad clonal o pérdida del clon durante el curso de la enfermedad, que mostraban un curso más indolente. Finalmente, diferentes estudios han demostrado que la detección del rearrreglo TCRG en SP constituye un factor pronóstico independiente, asociado a rápida evolución de la enfermedad y corta supervivencia<sup>9</sup>.

## ESTUDIOS CITOGENÉTICOS Y CITOMOLECULARES

### Micosis fungoides/Síndrome de Sézary (MF/SS)

Si bien en las últimas décadas, diferentes estudios han analizado las aberraciones genéticas presentes en pacientes con MF/SS, el nivel de información sobre las mismas resulta muy escaso, no habiéndose identificado aún ninguna anomalía cromosómica recurrente ni un perfil molecular específico<sup>28-31</sup>. Esto se encuentra relacionado con diferentes causas, entre las que cabe consignar: la dificultad de desarrollo *in vitro* de las células tumorales provenientes de las biopsias de piel debido a su alto grado de diferenciación, la presencia de una importante población adicional de células reactivas, la mala calidad de las metafases obtenidas que impide una buena caracterización citogenética y las dificultades para el establecimiento de líneas celulares.

No obstante, los diferentes estudios han detectado anomalías cromosómicas en el 50%-60% de los pacientes<sup>28-31</sup>, habiéndose identificado algunos cromos-

somas que se encuentran más frecuentemente involucrados, entre los que cabe destacar la participación de los pares 1, 2, 6, 10 y 17, con frecuencias entre el 20%-50% (Tabla 1).

La correlación de los hallazgos citogenéticos con la evolución clínica de los pacientes muestra, en nuestra experiencia (34 pacientes), una asociación entre el estadio clínico y la presencia de anomalías cromosómicas clonales, detectándose en el 87,5% de los casos en estadios III-IV respecto del 46% de los estadios iniciales. Distintos estudios<sup>28, 30</sup> encuentran correlación entre el número de anomalías cromosómicas clonales y el estadio clínico de la enfermedad, siendo éste significativamente más alto en los pacientes con estadios avanzados. Asimismo, se observa una sobrevida significativamente más corta en pacientes con alteraciones estructurales clonales respecto de los que no las poseen<sup>30</sup>.

A fin de profundizar este área, trabajos recientes han estudiado pacientes con MF/SS empleando la técnica de Hibridación Genómica Comparada (CGH)<sup>31-34</sup>, que permite detectar desbalances cromosómicos en el genoma tumoral mediante la hibridación simultánea del ADN normal y del tumoral sobre cromosomas metafásicos de linfocitos normales<sup>35</sup>. Las diferencias en la intensidad de fluorescencia

de ambos ADNs refleja las ganancias o pérdidas de cromosomas o regiones cromosómicas del genoma tumoral. Si bien las alteraciones balanceadas tales como translocaciones o inversiones no pueden ser detectadas por esta metodología, su aplicación permite obtener nueva información que pasa totalmente desapercibida con las otras técnicas en uso. De esta forma constituye un importante complemento de la información cariotípica siendo además de suma utilidad en aquellos casos en que no resulta factible obtener células en división para el estudio citogenético.

En la Tabla 2 se detallan los cromosomas y regiones cromosómicas más frecuentemente involucrados en el desarrollo de MF/SS. Estos datos permitieron confirmar los resultados obtenidos previamente por citogenética convencional<sup>29-31</sup> así como acotar en forma más específica las regiones cromosómicas involucradas. De este modo, se pudo detectar la presencia, en todas las series, de pérdidas de 10q (15%-20% de los casos) y de 17p (20%-30%) y ganancia de 17q (15%-20%)<sup>31-33</sup> así como pérdidas de 1p (25-38%) en los trabajos publicados por Mao et al<sup>31, 33</sup>. Simultáneamente, estos estudios permitieron definir que el SS y los estadios finales de MF presentaban alteraciones similares, sustentando el concepto que ambas entidades son parte del espectro de una misma enfermedad.

Si bien estas anomalías no son específicas de MF/SS ya que han sido descritas también en otras neoplasias hematológicas y en diferentes tumores sólidos<sup>36</sup>, cabe resaltar la importancia de su participación en estas entidades. La pérdida de 10q fue confirmada por estudios de LOH (loss of heterozigosity) que han mostrado regiones mínimas de delección a nivel de 10q26 y 10q23q24<sup>31, 37</sup>, particularmente en pacientes con estadios avanzados, lo que sugeriría que alguno de los genes supresores de tumor ubicados en 10q (PTEN: 10q23.3, MX/1: 10q25-26 y DMBT1: 10q25-26)<sup>38</sup>, podrían estar asociados a progresión de la enfermedad<sup>37</sup>. También la delección de material de 1p ha sido sustentada por los estudios de LOH, que permitieron detectar pérdidas alélicas a nivel de 1p36, 1p22 y 1q25, sugiriendo la participación de numerosas regiones y genes candidatos localizados en este cromosoma en el desarrollo de MF/SS<sup>31</sup>. Finalmente, la pérdida de 17p, región donde se ubica el gen supresor de tumor p53 (17p13.1)<sup>38</sup>, asociado a pronóstico adverso en neoplasias linfoides<sup>39, 40</sup>, no mostró relación con el curso clínico de la enfermedad<sup>32, 41</sup>.

En cuanto a la ganancia de 17q, es un hallazgo consistente con la descripción previa de isocromosoma 17q y translocaciones involucrando esta región en pacientes con MF/SS<sup>28-31</sup>. En esta región se ubican los genes STAT3 y STAT5 (signal transducers and activators of

TABLA 1  
Cromosomas más frecuentemente involucrados en Miosis Fungoides/Síndrome de Sézary.

Referencia	No. de Casos (Patología)	Cromosoma (%)
Whang-Peng et al (28)	41 (MF/SS)	1 (24) 6, 7 (21) 4, 9 (19)
Limon et al (29) *	55 (SS)	1, 2 (43) 6 (38) 17 (34) 10 (32) 14 (28)
Thangavelu et al (30)	19(MF/SS)	1, 8 (32) 10, 17 (26) 2 (21)
Mao et al (31)	28 (SS)	1, 17 (58) 10, 14 (42) 6, 15 (33)
Nuestra experiencia	34 (MF)	14 (23) 2, 16 (15) 9, 17 (12) 6, 8, 10 (8)

\* Cinco casos nuevos y revisión de 50 casos de la literatura.

TABLA 2  
Cromosomas y regiones cromosómicas más frecuentemente involucradas en MF/SS por CGH.

Referencia	No. de Casos (Patología)	Cromosoma (%)	
		Pérdidas	Ganancias
Fisher et al (32)	18 MF, 4 SS, 8 CD30+	17p (28)	7 (25)
		13q (25)	8q (25)
		6q (19)	17q (16)
		10q (16)	
Mao et al (31)	16 MF, 18 SS	1p (38)	4/4q (18)
		17p (21)	18 (15)
		10/10q (15)	17q/17 (12)
Mao et al (33)	20 SS	1p (25)	17q (20)
		10/10q (20)	18 (15)
		17 (20)	
		19 (15)	

transcription 3 and 5)<sup>38</sup>, que se encuentran involucrados en la fosforilación de tirosinas en respuesta a una variedad de citoquinas y factores de crecimiento<sup>42</sup>. Recientemente<sup>43</sup> se ha demostrado la activación *in vivo* de STAT3 en lesiones tumorales pero no en los estadios tempranos de MF, indicando su participación en la transformación de formas indolentes a agresivas. Además, STAT3 estaría involucrada en la resistencia de las células tumorales a entrar en apoptosis, sugiriendo un rol importante de este gen en la patogénesis de MF.

La correlación de los resultados de CGH con la evolución clínica de los pacientes<sup>32</sup> mostró asociación entre el número de anomalías cromosómicas y el estadio clínico de la enfermedad, siendo éste significativamente mayor en los estadios avanzados. La supervivencia media a 5 años fue significativamente más corta en aquellos pacientes con 5 o más desbalances cromosómicos que en el grupo con menos de 5 alteraciones. Asimismo, se observó que las formas indolentes tenían menos desbalances que las agresivas, con predominio de pérdidas genómicas en estas últimas y que la presencia de pérdidas en 6q, 8q, 10q y 13q y la ganancia del cromosoma 7 se encontraban asociadas a corta supervivencia.

Estos estudios han sido recientemente complementados con el ensayo de microarrays<sup>44</sup>. El uso de esta nueva tecnología permitió detectar 27 genes involucrados en la tumorigénesis de MF, con diferentes funciones (control del ciclo celular, apoptosis, transducción de señales), siendo lo más notable el aumento de expresión de genes implicados directamente en la desregulación de las señales antiapoptóticas de TNF (tumor necrosis factor), mecanismo que sería de importancia en la patogénesis de esta entidad. Asimismo, fue

factible identificar dos subgrupos de pacientes con MF: uno con buena evolución clínica, asociado al aumento de expresión de genes supresores de tumor, factores de crecimiento, interleuquinas, oncogenes y reguladores del ciclo celular, y el otro con pronóstico adverso, relacionado al aumento de expresión de genes implicados en el camino de señalización de TNF (tumor necrosis factor), oncogenes, reguladores positivos del ciclo celular y genes antiapoptóticos. Simultáneamente, se pudo detectar un panel de once genes que permitieron separar pacientes con fenotipo común (CD3+/CD4+/CD8-/CD7-) de aquellos con fenotipo aberrante, y otro de cinco genes que identificaron estadio de placa y tumoral, implicados en la inhibición de la activación de NFkB (nuclear factor kB), transducción de señales, regulación de la transcripción y respuesta al stress, todos ellos con expresión disminuida en el estadio tumoral.

#### Linfomas de grandes células anaplásicas CD30+ (LCGCA)

Al igual que lo descrito para MF/SS, este linfoma no presenta anomalías cromosómicas específicas, siendo raramente observada la t(2;5)(p23;q35), característica de su contraparte nodal<sup>45</sup>, sugiriendo una patogénesis diferente, para cada uno de estos linfomas<sup>46, 47</sup>. Trabajos recientes con la técnica de CGH han podido identificar alteraciones relacionadas con la recaída de la enfermedad (pérdidas de 6q y 18p y ganancia del cromosoma 9)<sup>48</sup> así como detectar la amplificación de genes específicos: MYCN, RAF1, CTSB, FGFR1 y JUNB, identificados por microarrays y PCR en tiempo real<sup>49</sup>.



### Papulosis linfomatoide

La información resulta escasísima, con una publicación<sup>50</sup> que incluye tres casos, uno con cariotipo complejo y dos pacientes estudiados en nuestro laboratorio<sup>51</sup> uno portador de un cromosoma 4 marcador, con punto de ruptura en 4q35.

### Linfomas cutáneos a células B

También en estos casos la información a nivel citogenético y citomolecular es reducida. No obstante, resulta de interés señalar que los linfomas cutáneos primarios foliculares (LCPF) muestran mucho menor frecuencia de expresión de la proteína Bcl-2 y/o de la t(14;18) (q32;q21) que los linfomas foliculares nodales, con estudios que no encuentran casos positivos<sup>52</sup> y otros con frecuencias del 20%-30%<sup>53-55</sup>, sugiriendo la presencia de diferentes mecanismos moleculares en la patogénesis de ambos tipos de LF.

Los linfomas B difusos a células grandes (LBDCG) constituyen otro de los subtipos histológicos frecuentes en piel. En estos linfomas no se observa expresión de la proteína Bcl-2 ni se encuentra la t(14;18) (q21;q32), que determina el rearreglo BCL-2/IgH<sup>56, 57</sup>. Recientemente, se describió un caso de LBDCG cutáneo primario portador de la t(14;18) (q32;q21), que si bien involucra los mismos puntos de ruptura, determina la desregulación del gen MALT1, ubicado en la misma banda 18q21 pero centromérico a BCL-2, generando el rearreglo MALT1/IgH<sup>58</sup>. Por el contrario, la mayoría de casos con LBDCG de la pierna expresan Bcl-2<sup>59</sup>.

Por otra parte, sabemos que las translocaciones t(11;18) (q21;q21) y t(1;14) (p22;q32) son características de los linfomas de MALT (Mucosa associated lymphoma tissue). Un análisis de estos linfomas en diferentes sitios, muestra ausencia de la t(11;18) en todos los casos de localización cutánea y detecta un paciente (7,7%) con fuerte expresión nuclear de Bcl-10, sugiriendo la presencia de la t(1;14)<sup>60, 61</sup>.

Asimismo, hay un solo estudio de CGH en linfomas cutáneos a células B que incluye diferentes subtipos histológicos<sup>62</sup>. El mismo detectó las frecuencias más altas de inestabilidad genómica en los LBDCG, intermedias en los linfomas de la zona marginal (33%) y menores en los LCPF (8%), observándose mayor proporción de ganancias de material genómico. Los LBDCG mostraron un patrón específico de desbalances que incluyeron pérdida de 6q (42% de los casos) y ganancia de 3/3q (33%). Simultáneamente, el análisis de CGH por microarray de 4 pacientes con esta última histología permitió observar con mayor frecuencia ganancia de los genes SAS/CDK4 (12q13.3) y pérdidas de AKT1 (14q32.3), IGF1R1 (15q25-26) y JUNB (19p13.2), sugiriendo la presencia

de alteraciones consistentes, probablemente asociadas con la patogénesis de estos linfomas.

Estos hallazgos resultan totalmente alentadores y estimulan la continuidad de estos estudios que, sin duda, contribuirán a un mayor conocimiento de los rearreglos genómicos involucrados en el desarrollo y progresión de estas neoplasias así como a una mejor delineación de las características biológicas de estas entidades.

**Agradecimientos:** El presente trabajo fue realizado con subsidio del Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET).

### REFERENCIAS

- Harris NL, Jaffe ES, Diebold J, et al. 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. *J Clin Oncol* 1999; 12: 3835-3849.
- van Dongen JJM, Wolvers-Tettero ILM. Analysis of immunoglobulin and T cell receptor genes. Part I: Basic and technical aspects. *Clin Chim Acta* 1991; 198: 1-91.
- van Dongen JJM, Langerak AW, Brüggemann M, 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: 2257-2317.
- Kluin-Nelemans HC, Kester MG, van DeCorput L, et al. Correction of abnormal T-cell receptor repertoire during interferon-alpha therapy in patients with hairy cell leukemia. *Blood* 1998; 91: 4224-4231.
- Sarzotti M, Patel DD, Li X, et al. T cell repertoire development in humans with SCID after non-ablative allogeneic marrow transplantation. *J Immunol* 2003; 170: 2711-2718.
- Szczepanski T, Langerak AW, van Dongen JJ, van Krieken JH. Lymphoma with multi-gene rearrangements on the level of immunoglobulin heavy chain, light chain, and T-cell receptor beta chain. *Am J Hematol* 1998; 59: 99-100.
- Boeckx N, Willwms MJ, Szczepanski T, et al. Fusion gene transcripts and Ig/TCR gene rearrangements are complementary but infrequent targets for PCR-based detection of minimal residual disease in acute myeloid leukemia. *Leukemia* 2002; 16: 368-375.
- Davis TH, Yockey CE, Balk, SP. Detection of clonal immunoglobulin gene rearrangements by polymerase chain reaction amplification and single-strand conformational polymorphism analysis. *Am J Pathol* 1993; 142: 1841-1847.
- Fraser-Andrews EA, Woolford AJ, Russell-Jones R, Seed PT, Whittaker SJ. Detection of a peripheral blood T cell clone is an independent prognostic marker in mycosis fungoides. *J Invest Dermatol* 2000; 114: 117-121.
- Scheller U, Munche JM, Sterry W, Lukowsky A. Detection of clonal T cells in cutaneous T-cell lymphomas 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: 653-658.
- 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: 8536-8540.
12. Bottaro M, Berti E, Biondi A, Migone N, Crosti I. Heteroduplex analysis of T-cell receptor gamma gene rearrangements for diagnosis and monitoring of cutaneous T-cell lymphomas. *Blood* 1994; 83: 3271-3278.
  13. Dereure O, Levi E, Vonderheid EC, Kadin ME. Improved sensitivity of T-cell clonality detection in mycosis fungoides by hand microdissection and heteroduplex analysis. *Arch Dermatol* 2003; 139: 1571-1575.
  14. 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: 3930-3937.
  15. Linke B, Bolz I, Fayyazi A, et al. Automated high resolution PCR fragment analysis for identification of clonally rearranged immunoglobulin heavy chain genes. *Leukemia* 1997; 11: 1055-1062.
  16. Vega F, Medeiros LJ, Jones D, et al. A novel four-color PCR assay to assess T-cell receptor gamma gene rearrangements in lymphoproliferative lesions. *Am J Clin Pathol* 2001; 116: 17-24.
  17. Vega F, Luthra R, Medeiros J, et al. Clonal heterogeneity in mycosis fungoides and its relationship to clinical course. *Blood* 2002; 100: 3369-3373.
  18. Kolowos W, Hermann M, Ponner BB, et al. Detection of restricted junctional diversity of peripheral T cell in SLE patients by spectratyping. *Lupus* 1997; 6: 701-707.
  19. Muche JM, 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: 1409-1417.
  20. Lukowsky A, Muche JM, Sterry W, Audring H. Detection of expanded T cell clones in skin biopsy samples of patients with lichen sclerosus et atrophicus by T cell receptor- $\gamma$  polymerase chain reaction assays. *J Invest Dermatol* 2000; 115: 254-259.
  21. Posnett DN, Sinha R, Kabak S, Russo C. Clonal populations of T cells in normal elderly humans: The T cell equivalent to "benign monoclonal gammopathy". *J Exp Med* 1994; 179: 609-618.
  22. Van den Beemd MWM, Boor PPC, Van Lochem EG, et al. Flow cytometric analysis of the V $\beta$  repertoire in healthy controls. *Cytometry* 2000; 40: 336-345.
  23. Blom B, Verschuren MC, Heemskerk MH, et al. TCR gene rearrangements and expression of the pre-T cell receptor complex during human T-cell differentiation. *Blood* 1999; 93: 3033-3043.
  24. Theodorou I, Delfau-Larue MH, Bigorgne C, 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: 305-310.
  25. Delfau-Larue M-H, Dalac S, Lepage E, et al. Prognostic significance of a polymerase chain reaction-detectable dominant T-lymphocyte clone in cutaneous lesions of patients with mycosis fungoides. *Blood* 1998; 92: 3376-3380.
  26. Quertermous T, Murre C, Dialynas D, et al. Human T-cell  $\gamma$  chain genes: organization, diversity, and rearrangement. *Science* 1986; 231: 252-255.
  27. Delfau-Larue MH, Petrella T, Lahet C, et al. Value of clonality studies of cutaneous T lymphocytes in the diagnosis and follow up of patients with mycosis fungoides. *J Pathol* 1998; 184: 185-190.
  28. Whang-Peng J, Bunn PA, Knutsen T, Matthews MJ, Schechter G, Minna JD. Clinical implications of cytogenetic studies in cutaneous T-cell lymphoma (CTCL). *Cancer* 1982; 50: 1539-1553.
  29. Limon J, Nedoszytko B, Brozek I, et al. Chromosome aberrations, spontaneous SCE, and growth kinetics in PHA-stimulated lymphocytes of five cases with Sézary syndrome. *Cancer Genet Cytogenet* 1995; 83: 75-81.
  30. Thangavelu M, Finn WG, Yelavarthi KK, et al. Recurring structural chromosome abnormalities in peripheral blood lymphocytes of patients with mycosis fungoides/Sézary syndrome. *Blood* 1997; 89: 3371-3377.
  31. Mao X, Lillington D, Scarisbrick JJ, et al. Molecular cytogenetic analysis of cutaneous T-cell lymphoma identification of common genetic alterations in Sézary syndrome and mycosis fungoides. *Brit J Dermatol* 2002; 147: 464-475.
  32. Fischer TC, Gellrich S, Muche JM, et al. Genomic aberrations and survival in cutaneous T cell lymphomas. *J Invest Dermatol* 2004; 122: 579-586.
  33. Mao X, Lillington DM, Czepulkowski B, Russell-Jones R, Young BD, Whittaker S. Molecular cytogenetic characterization of Sézary Syndrome. *Genes Chrom Cancer* 2003; 36: 250-260.
  34. Karenko L, Sarna S, Kähkönen M, Ranki A. Chromosomal abnormalities in relation to clinical disease in patients with cutaneous T-cell lymphoma: a 5-year follow-up study. *Brit J Dermatol* 2003; 148: 55-64.
  35. Kallioniemi A, Kallioniemi O-P, Sudar D, et al. Comparative genomic hybridization for molecular cytogenetic analysis in solid tumors. *Science* 1992; 258: 818-821.
  36. Mitelman Database of Chromosome Aberrations in Cancer (2004) Mitelman F, Johansson B and Mertens F (Eds.) <http://cgap.nci.nih.gov/chromosomes/Mitelman>.
  37. Scarisbrick JJ, Woolford AJ, Russel-Jones R, et al. Loss of heterozygosity on 10q and microsatellite instability in advanced stages of primary cutaneous T-cell lymphoma and possible association with homozygous deletion of PTEN. *Blood* 2000; 95: 2937-2942.
  38. GeneMap '99. National Center for Biotechnology Information, National Institutes of Health, Bethesda, MD. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genemap/>
  39. Döhner H, Stilgenbauer S, Benner A, et al. Genomic aberrations and survival in chronic lymphocytic leukemia. *N Eng J Med* 2000; 343: 1910-6.
  40. Stokke T, DeAngelis P, Smedshammer L, et al. Loss of chromosomes 11q21-23.1 and 17p and gain of chromosome 6p are independent prognostic indicators in B-cell non-Hodgkin's lymphoma. *Brit J Cancer* 2001; 85: 1900-1913.
  41. van Haselen CW, Vermeer MH, Toonstra J, et al. p53 and bcl-2 expression do not correlate with prognosis in primary cutaneous large T-cell lymphomas. *J Cutan Pathol* 1997; 24: 462-467.
  42. Shi W, Inoue M, Minami M, et al. The genomic structure and chromosomal localization of the mouse STAT3 gene. *Int Immunol* 1996; 8: 1205-1211.
  43. Sommer VH, Clemmensen OJ, Nielsen O, et al. *In vivo* activation of STAT3 in cutaneous T-cell lymphoma. Evidence for an antiapoptotic function of STAT3. *Leukemia* 2004; 18: 1288-1295.
  44. Tracey L, Villuendas R, Dotor AM, et al. Mycosis fungoides shows concurrent deregulation of multiple genes involved in the TNF signaling pathway: an expression profile study. *Blood* 2003; 102: 1042-1050.
  45. Morris SW, Kirstein MN, Valentine MB, et al. Fusion of a kinase gene, ALK, to a nucleolar protein gene, NPM, in non-Hodgkin's lymphoma. *Science* 1994; 263: 1281-1284.
  46. Wood GS, Hardman DL, Boni R, et al. Lack of the t(2;5) or other mutations resulting in expression of anaplastic lymphoma kinase catalytic domain in CD30+ primary cutaneous lymphoproliferative disorders and Hodgkin's disease. *Blood* 1996; 88: 765-1770.
  47. Wood GS. Analysis of the t(2;5)(p23;q35) translocation in CD30+ primary cutaneous lymphoproliferative disorders and

- Hodgkin's disease. **Leuk Lymphoma** 1998; 29: 93-101.
48. Prochazkova M, Chevet E, Beylot-Barry M, et al. Chromosomal imbalances: a hallmark of tumor relapse in primary cutaneous CD30+ T-cell lymphoma. **J Pathol** 2003; 201: 421-429.
  49. Mao X, Orchard G, Lillington DM, Russel-Jones R, Young BD, Whittaker S. Genetic alterations in primary cutaneous CD30+ anaplastic large cell lymphoma. **Genes Chrom Cancer** 2003; 37: 176-185.
  50. Peters K, Knoll JHM, Kadin ME. Cytogenetic findings in regressing skin lesions of lymphomatoid papulosis. **Cancer Genet Cytogenet** 1995; 80: 13-16.
  51. Slavutsky I, Fernández Alonso GI, Bengiό R, et al. Estudio colaborativo de linfomas cutáneos. **Rev.Arg Dermatol** 1990; 71: 199-208.
  52. Cerroni L, Arzberger E, Putz B, et al. Primary cutaneous follicle center cell lymphoma with follicular growth pattern. **Blood** 200; 95: 3922-3928.
  53. Mirza I, Macpherson N, Paproski S, et al. Primary cutaneous follicular lymphoma: an assessment of clinical, histopathologic, immunophenotypic, and molecular features. **J Clin Oncol** 2002; 20: 647-655.
  54. Aguilera NS, Tomaszewski MM, Moad JC, Bauer FA, Taubenberger JK, Abbondanzo SL. Cutaneous follicle center lymphoma: a clinicopathologic study of 19 cases. **Mod Pathol** 2001; 14: 828-835.
  55. Bergman R, Kurtin PJ, Gibson LE, Hull PR, Kimlinger TK, Schroeter AL. Clinicopathologic, immunophenotypic, and molecular characterization of primary cutaneous follicular B-cell lymphoma. **Arch Dermatol** 2001; 137: 432-9.
  56. Hembury TA, Lee B, Gayscone RD, et al. Primary cutaneous diffuse large B-cell lymphoma: a clinicopathologic study of 15 cases. **Am J Clin Pathol** 2002; 117: 574-580.
  57. Kim BK, Surti U, Pandya AG, Swerdlow SH. Primary and secondary cutaneous diffuse large B-cell lymphomas: a multiparameter analysis of 25 cases including fluorescence in situ hybridization for t(14;18) translocation. **Am J Surg Pathol** 2003; 27: 356-364.
  58. Cook JR, Sherer M, Craig FE, Shekhter-Levin S, Swerdlow SH. T(14;18)(q32;q21) involving MALT1 and IGH genes in an extranodal diffuse large B-cell lymphoma. **Hum Pathol** 2003; 34: 1212-1215.
  59. Geelen FA, Vermeer MH, Meijer CJ, et al. bcl-2 protein expression in primary cutaneous large B-cell lymphoma is site-related. **J Clin Oncol** 1998; 16: 2080-2085.
  60. Ye H, Liu H, Attygalle A, et al. Variable frequencies of t(11,18)(q21;q21) in MALT lymphomas of different sites: significant association with CagA strains of H pylori in gastric MALT lymphomas. **Blood** 2003; 102: 1012-1018.
  61. Gronback K, Ralfkiaer E, Kalla J, Slovgard GL, Guldberg P. Infrequent somatic Fas mutations but no evidence of Bcl10 mutations or t(11,18) in primary cutaneous MALT-type lymphoma. **J Pathol** 2003; 201: 134-140.
  62. Mao X, Lillington D, Child F, Russell-Jones R, Young B, Whittaker S. Comparative genomic hybridization analysis of primary cutaneous B-cell lymphomas: identification of common genomic alterations in disease pathogenesis. **Genes Chrom Cancer** 2002; 35: 144-155.