



UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI NAPOLI
"FEDERICO II"

DOTTORATO DI RICERCA IN MORFOLOGIA
CLINICA E PATOLOGICA
- XXV CICLO-

**IGH FISH DNA PROBE NEI PROCESSI
LINFOPROLIFERATIVI B CELLULARI
CUTANEI**

Coordinatrice Prof. Stefania Montagnani

Relatore:
Prof. Gaetano De Rosa

Candidato:
Dott. Falletti Jessica

INDICE

Introduzione	pag.3
Materiale e metodi	pag.13
Risultati	pag.19
Discussione	pag.22
Bibliografia	pag.27

INTRODUZIONE

I linfomi sono delle neoplasie solide del sistema immunitario, originano dalle cellule immunocompetenti o dai loro precursori, vengono distinti in linfoma di Hodgkin e linfomi non-Hodgkin e coinvolgono prevalentemente il sistema linfonodale. Il linfoma di Hodgkin rappresenta il 10% di tutti i linfomi, il restante 90% è costituito dai cosiddetti “linfomi non-Hodgkin” (1).

Meno frequentemente i linfomi possono originare da tessuti diversi dai linfonodi e anche da siti che normalmente non contengono tessuto linfoide: queste forme sono indicate come linfomi extranodali primitivi. I linfomi extralinfonodali possono originare da quasi ogni sito anatomico come il tratto gastrointestinale (più comune), il distretto testa e collo (anello di Waldeyer, naso/seni paranasali/rinofaringe, ghiandole salivari, ecc), la cute, il sistema nervoso centrale, le ossa, i testicoli, la tiroide, la mammella, l'orbita, e raramente il surrene, il pancreas e il tratto genitourinario. La frequenza dei linfomi non-Hodgkin extranodali varia nelle diverse parti del mondo: nei paesi dove l'incidenza totale per linfoma è elevata anche quella per i linfomi extranodali tende ad essere alta. Studi condotti nei paesi occidentali hanno segnalato un'incidenza di linfomi non-Hodgkin extranodali pari a circa il 24-48% di tutti i linfomi non-Hodgkin (2).

Dopo i linfomi del tratto gastro-intestinale, i linfomi primitivi della cute rappresentano il secondo gruppo più comune tra i linfomi non-Hodgkin

extranodali con una incidenza annua stimata pari a 1/100000 (3) rappresentando circa il 25% di tutti i linfomi non-Hodgkin extranodali (4).

I linfomi primitivi della cute sono linfomi non-Hodgkin a presentazione cutanea in assenza di patologia sistemica al momento della diagnosi e per i sei mesi successivi (5,6). Vengono distinti in due grossi capitoli: i linfomi cutanei T ed i linfomi cutanei B. In Europa i linfomi cutanei T rappresentano circa il 75-80% di tutti i linfomi cutanei mentre quelli B ne rappresentano il 20-25% (5).

I linfomi primitivi cutanei dovrebbero essere classificati in accordo ai criteri della classificazione WHO-EORTC (5).

I linfomi primitivi cutanei T rappresentano la categoria diagnostica più frequente con numerose entità descritte, la prima in ordine di incidenza è la micosi fungoide, cui seguono i disordini linfoproliferativi cutanei primitivi CD30+, il linfoma T sottocutaneo simil panniculitico, il linfoma extranodale NK/T nasal-type, il linfoma T periferico primitivo cutaneo NOS (5).

Nell'ambito delle forme cutanee B, la classificazione WHO-EORTC distingue tre tipi di linfoma: il linfoma marginale primitivo cutaneo, il linfoma follicolare primitivo cutaneo e il linfoma B diffuso a grandi cellule leg-type.

Sia il linfoma cutaneo marginale che quello follicolare sono forme indolenti con sopravvivenza malattia-correlata a 10 anni superiore al 90%,

mentre il linfoma B diffuso a grandi cellule leg-type ha una prognosi più sfavorevole con una sopravvivenza malattia-correlata a 5 anni pari a circa al 50% (5).

I tassi di incidenza aumentano costantemente con l'aumentare dell'età al momento della prima diagnosi, con un range compreso fra lo 0.09 per milione nei soggetti con meno di 30 anni e il 10.8 per milione nei pazienti con età superiore o uguale a 80 anni. Il rapporto maschi/femmine è pari a 1.4:1 per l'intero gruppo dei linfomi B primitivi della cute. Le forme di basso grado (marginale e follicolare) colpiscono più frequentemente gli individui di mezza età, tra i 53 e i 58 anni, mentre il linfoma B diffuso a grandi cellule leg-type è una patologia delle persone anziane con età superiore ai 70 anni (7).

Il gold standard nella diagnosi di un linfoma cutaneo sta in una solida correlazione clinico-patologica (8). Tuttavia la valutazione dei processi linfoproliferativi B cutanei dal punto di vista morfologico, può essere talvolta difficile, nonostante l'utilizzo di metodiche ancillari quali l'immunoistochimica e gli studi di riarrangiamento genico.

Questa difficoltà diagnostica è particolarmente evidente nella distinzione tra l'iperplasia linfoide reattiva e i linfomi B di basso grado: esiste un "overlap" morfologico tra le forme reattive e i linfomi di basso grado soprattutto in presenza di antigeni stimolanti come morsi di insetto o farmaci; le metodiche ancillari possono dare risultati equivoci mostrando

una espressione politipica delle catene leggere nelle lesioni sospette oppure evidenziando una popolazione clonale in un infiltrato altrimenti reattivo. Inoltre non è da dimenticare che le lesioni linfoproliferative sembrano esistere in un “continuum” morfologico in cui la prolungata stimolazione antigenica potrebbe esitare nell’evoluzione di una iperplasia reattiva in un linfoma di basso grado (9).

La diagnosi istopatologica delle malattie linfoproliferative cutanee è uno dei problemi più “fastidiosi” in dermatopatologia. Le manifestazioni proteiformi di tali malattie, la confusione terminologica ed i frequenti cambiamenti negli schemi classificativi, contribuiscono alla difficoltà in questa area diagnostica. Va ricordato che in molti casi una diagnosi corretta è possibile solo sulla correlazione dei reperti istopatologici con le caratteristiche cliniche, e che la mancanza di informazioni cliniche si traduce in una diagnosi non certa (10).

Prima della disponibilità della biologia molecolare e dell’immunoistochimica, i disturbi linfoproliferativi primitivi della cute caratterizzati da una buona risposta alla terapia locale e assenza di diffusione extracutanea sono stati generalmente considerati processi benigni o reattivi e designati come iperplasia linfoide, lymphadenosis benigna cutis o pseudolinfoma (4).

Con il termine “pseudolinfoma” si intende un processo linfoproliferativo reattivo benigno policlonale composto in predominanza sia da cellule B

che T; in genere regredisce spontaneamente dopo cessazione dell'agente causale o dopo trattamento non aggressivo (3).

In alcuni casi la causa è conosciuta o può essere identificata mediante ulteriori indagini come nei casi di borreliosi, infezioni da herpes virus o da leishmania dove l'utilizzo di una PCR specifica è dirimente; in altri infiltrati la causa non è inequivocabile e vengono suggeriti quale origine possibile i farmaci o i morsi di insetto (11).

Lo pseudolinfoma cutaneo non costituisce una entità distinta ma è un termine utilizzato per descrivere quegli infiltrati linfoidi che simulano la malignità istologicamente e a volte anche clinicamente: genericamente possono essere suddivisi in infiltrati che mimano il linfoma T e in quelli che dissimulano le neoplasie B-cellulari. E' una distinzione abbastanza arbitraria basata sul pattern istologico e sul tipo cellulare predominante (12). Il pattern istologico può mostrare un infiltrato linfoide superficiale band-like nel derma superiore (T-cell pattern) oppure un infiltrato linfoide nodulare o diffuso nel derma o a volte nel sottocute (B-cell pattern): tuttavia, come già anticipato, è una distinzione artificiale poiché le proliferazioni T-cellulari possono avere un pattern nodulare di infiltrazione dermica mentre nelle forme a B-cell pattern, le cellule T possono essere più abbondanti (13).

La già anticipata difficoltà diagnostica degli infiltrati linfoidi cutanei è particolarmente evidente nella differenziazione di un infiltrato maligno “precoce” da uno pseudolinfoma.

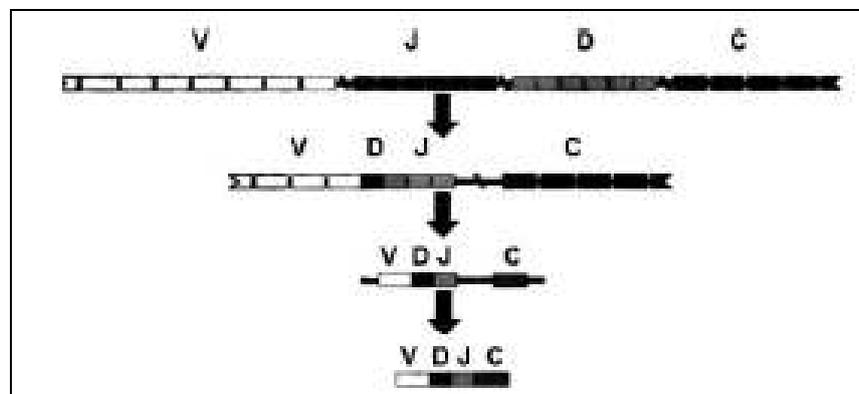
La determinazione della clonalità è un utile ed importante metodo per distinguere se un infiltrato linfocitario è benigno o maligno. Come regola generale, la dimostrazione di una popolazione clonale è in molti casi una prova di malignità. Ulteriori informazioni possono ottenersi da tipizzazione immunofenotipica. Esistono criteri diversi per la dimostrazione della clonalità negli infiltrati linfocitari a cellule B e in quelli a cellule T (14).

L'assenza di antigeni normalmente espressi, l'anormale espressione di antigeni o la restrizione delle catene leggere sono i criteri per definire la clonalità negli infiltrati linfoidi B-cellulari; per gli infiltrati linfoidi T-cellulari, i criteri utilizzati sono la restrizione per un sottoinsieme di antigeni delle cellule T, l'espressione anormale di un antigene o perdita di uno o più antigeni pan-T. Tuttavia, l'analisi immunoistochimica, in molti casi, non è sufficiente per poter classificare una lesione linfoproliferativa come maligna o benigna pertanto la dimostrazione della clonalità mediante indagini molecolari è un ulteriore passo utile per giungere verso una corretta diagnosi. Il principio alla base di tali tecniche è la dimostrazione di un riarrangiamento genico clonale (14).

La dimostrazione di una popolazione monoclonale può aiutare a distinguere un linfoma da un processo reattivo. Tuttavia, clonalità di per sé

non implica malignità, e allo stesso modo, un risultato negativo non implica un processo benigno. Mediante l'esposizione a cellule presentanti l'antigene, i linfociti sono iniziati a reagire contro epitopi specifici. Durante questo processo, vengono riarrangiati, per le cellule B, i geni codificanti il recettore delle immunoglobuline, mentre, per le cellule T, i geni eterodimeri del recettore per le cellule T (TCR) (8).

La catena pesante del gene delle immunoglobuline ha molte regioni variabili (V), parecchie regioni di diversità (D) ed alcune regioni di giunzione (J) in configurazione non riarrangiata. Durante la maturazione e lo sviluppo dei linfociti B, un segmento V è selezionato e vincolato ad un segmento D, e il segmento D è nuovamente unito al segmento J (14).



(da J Cutan Pathol 2002:29:447-452)

Durante questo processo, frammenti di nucleotidi vengono sia eliminati che inseriti, risultando in una enorme varietà di un unico recettore per l'antigene fornendo un'elevata specificità per una vasta gamma di antigeni (8).

Nel caso di un infiltrato monoclonale (linfoma), quasi tutti i linfociti B contengono lo stesso riarrangiamento VDJ, mentre in un infiltrato policlonale (pseudolinfoma) i linfociti B mostrano differenti riarrangiamenti VDJ (14).

I geni codificanti i recettori per l'antigene delle cellule B o le immunoglobuline includono un gene per la catena pesante (14q32), un gene per la catena leggera kappa (2p12) e un gene per la catena leggera lambda (22q11). Ci sono quattro regioni strutturali conservate che sono bersagli affidabili per i primer PCR per la catena pesante delle immunoglobuline: tre all'interno della regione variabile (V) e uno nella regione di giunzione (J) (8).

Secondo alcuni autori la sensibilità della PCR per la catena pesante delle immunoglobuline è inferiore a quello per il TCR: in alternativa, l'espressione delle catene leggere kappa e lambda può essere valutata nel citoplasma delle plasmacellule su sezioni di tessuto fissato in formalina ed incluso in paraffina mediante tecniche di immunoistochimica e/o di ibridazione in situ (8).

Il locus della catena pesante IgH delle immunoglobuline umane è situato sulla banda 32 del braccio lungo del cromosoma 14 ed è coinvolto in diverse traslocazioni con partner cromosomici specifici in numerosi linfomi non Hodgkin (LNH) (Tabella 1).

Tabella 1: Traslocazioni più frequenti coinvolgenti il locus IgH (da 20)

NHL Istotipo	Traslocazione	Percentuale
FL	t(14;18)(q32;q21)	70%-95%
DLBCL	t(14;18)(q32;q21)	30%
DLBCL	t(14;19)(q32;q12)	8%
DLBCL	t(3;14)(p14;q32)	Rara
SLL/CLL	t(2;14)(p12;q32)	21%
	t(14;19)(q32;q13)	
	t(14;18)(q32;q21)	
MCL	t(11;14)(q13;q32)	75%
BL	t(8;14)(q24;q32)	75%
Ipl	t(9;14)(p13;q32)	50%
MZL	t(9;14)(p13;q32)	Rara
MZL	t(14;18)(q32;q21)	10%
MALT	t(3;14)(p14;q32)	10%
MM	t(11;14)(q13;q32)	80-90%
	t(6;14)(p21;q32)	
	t(4;14)(p16;q32)	
	t(14;16)(q32;q23)	

BL:linfoma di Burkitt; **DLBCL:**linfoma diffuso a grandi cellule B; **FL:**linfoma follicolare;**Ipl:**linfoma linfoplasmacitico;**MALT:**linfoma del tessuto linfoide mucosa-associato;**MCL:**linfoma mantellare; **MM:**mielosa multiplo;**MZL:**linfoma B della zona marginale; **NHL:**linfoma non-Hodgkin;**SLL/CLL:**linfoma a piccoli linfociti/leucemia linfatica cronica.

La sonda IgH FISH DNA con segnale di split è composta da due fluorocromi coniugati a due filamenti di DNA: un filamento, coniugato a fluoresceina verde, lega il segmento telomerico di 612 Kb fino al breakpoint; il secondo, coniugato a Texas Red, lega il segmento centromerico di 460 Kb fino al breakpoint. Quando il gene è integro, la sonda genera un segnale di fusione; in caso di traslocazione la sonda genera due segnali distinti (split signal) verde e rosso. Pertanto la sonda dovrebbe identificare qualsiasi punto di rottura che coinvolga il locus IgH valutando la clonalità del corrispondente processo linfoproliferativo indipendentemente dal partner coinvolto e da uno specifico sottotipo.

Lo scopo dello studio consiste nel valutare l'efficacia della sonda IgH FISH DNA probe nella diagnosi di processi linfoproliferativi B cellulari su biopsie cutanee.

Come metodica alternativa di confronto è stata utilizzata la PCR.

MATERIALI E METODI

In considerazione del fatto che si tratta di uno studio prospettico, sono stati arruolati nella nostra casistica, 20 casi di disordini linfoproliferativi B-cellulari cutanei diagnosticati presso la Sezione di Anatomia Patologica del Dipartimento di Scienze Biomediche Avanzate dell'Università Federico II di Napoli nel periodo compreso dal 1 Gennaio 2007 al 28 Febbraio 2013.

La nostra serie comprendeva 7 linfomi non-Hodgkin B-cellulari, 12 casi di iperplasia linfoide atipica B-cellulare (sia più probabilmente reattiva e sia possibile espressione di linfoma di basso grado) ed 1 pseudolinfoma da Leishmaniosi cutanea.

E' costituita da 20 pazienti di cui 13 di sesso femminile e 7 di sesso maschile, con range di età compreso tra 6 e 76 anni con età media di 51.2 anni (Tabella 2).

Le biopsie sono state effettuate in diversi distretti cutanei e, nello specifico, tutte da lesioni cutanee singole in assenza di coinvolgimento linfonodale e/o sistemico.

Lo studio non ha influenzato in alcun modo la gestione del paziente in quanto tutti i test necessari sono stati eseguiti routinariamente.

Per l'esame morfologico i campioni sono stati fissati in formalina al 4% e poi inclusi in paraffina. Successivamente si sono ottenute sezioni di spessore di 5 µm per la colorazione standard in E/E e ulteriori sezioni sono state utilizzate per colorazioni speciali ed immunoistochimiche.

Per le indagini immunoistochimiche sono stati utilizzati, come ben descritto in letteratura, i seguenti anticorpi: ki-67, CD3, CD20, bcl-2, bcl-6, CD23, CD5, ciclina-D1, CD10.

Processazione Pre-analitica dei campioni

Ciascun caso è stato revisionato in modo da valutarne l'adeguatezza in base al numero di cellule neoplastiche osservate. Ciascun campione istologico è stato processato come segue: colorazione di una sezione da 5 µm di spessore con ematossilina/eosina (E/E) per la valutazione della cellularità neoplastica, 5 sezioni da 20 µm per la microdissezione manuale dell'area selezionata su E/E, destinate all'analisi molecolare per la valutazione dello stato dell'IGH mediante DHPLC (Cromatografia liquida denaturante ad alte prestazioni) e sequenziamento secondo Sanger, 2 sezioni da 3 µm per l'analisi citogenetica del locus 14q32 dell'IGH mediante FISH.

Estrazione del DNA

Per ogni caso, le sezioni da 20 µm sono state microdissezionate con l'ausilio di un bisturi sterile ed il materiale è stato poi raccolto in un tubo eppendorf da 1.5 ml. Il DNA genomico è stato estratto utilizzando il kit QIAamp DNA Mini kit (Qiagen, Crawley, West Sussex, UK). In breve, il kit fornisce delle colonnine dotate di uno specifico filtro selettivo per il

DNA; ciascun campione è stato sottoposto a digestione overnight con proteinasi K a 56°. Successivamente, il materiale digerito di ciascun caso è stato trasferito all'interno delle colonnine fornite dal kit e trattato secondo il protocollo del kit stesso la cui applicazione consente il recupero di DNA purificato in 40 µl di acqua nanofiltrata (NOT DEPC). La quantità e la qualità del DNA estratto da ciascun campione è stata determinata mediante l'utilizzo del NanoDrop 1000 Spectrophotometer (Thermo Scientific, Milan, Italy).

Analisi molecolare del gene IGH

La reazione di PCR e la successiva analisi dei prodotti amplificati è stata eseguita facendo riferimento al protocollo BIOMED-2 [15,16]. È stata allestita una PCR seminested per amplificare la regione VDJ (variable-diversity-joining region) del gene della catena pesante delle Ig, utilizzando 100 ng di DNA. Le sequenze dei primers consensus utilizzati sono: FR2A-5'TGG (A/G)TC CG(C/A) CAG (G/C)C(T/C) (T/C)NG G3' e FR3A-5'CTG TCG ACA CGG C(C/T)(G/C) TGT ATT ACT GT3' per l'estremità 3' della regione V; LJH-5'TGA GGA GAC GGT GAC C3' e VLJH-5'GTG ACC AGG GTN CCT TGG CCC CAG3' - per l'estremità 3' della regione J. Il sistema seminested prevede quattro reazioni separate di PCR allestite come segue: un primo step utilizzando i primers LJH-FR2A e LJH-FR3A ed un secondo step utilizzando i primers VLJH-FR2A e VLJH-

FR3A. Per l'amplificazione è stata utilizzata la GoTaq® Green Master Mix (Promega, cat n. M7123) e 0,4 µM di ciascun primer. Le reazioni di PCR sono state eseguite utilizzando un termociclatore Veriti® (Applied Biosystems) con le seguenti condizioni: un primo step di denaturazione a 94°C per 7 minuti seguito da altri 30 cicli di denaturazione a 94° per 45 secondi, elongazione a 55°C per 1 minuto e a 72°C per 55 secondi, con un ciclo finale di estensione a 72°C per 7 minuti. Le stesse condizioni di temperatura sono state applicate nel secondo step ma il numero di cicli è stato ridotto a 20.

L'analisi degli eteroduplex è stata eseguita applicando 5 µl dei prodotti di PCR su gel TBE di agarosio al 2% dopo denaturazione dei prodotti stessi a 94°C per 5 minuti e raffreddamento rapido a 4°C per 10 minuti. La presenza sul gel di 1 o 2 bande discrete tra 100-400 bp sono indicative di uno stato di mono o oligo-clonalità, mentre la presenza di uno smear è indice di policlonalità. Il limite di confidenza in questo tipo di indagine nell'identificazione di un clone di cellule B tra cellule normali è di 1×10^3 .

In parallelo è stata allestita una DHPLC (Transgenomic Wave™ System Model 3500HT - DHPLC, Transgenomic TM, Omaha, NE, USA) su una matrice ad alta risoluzione in condizioni semi-denaturanti, per determinare l'assetto clonale di ciascun prodotto di PCR. I profili di eluizione sono stati eseguiti a 50°C (DNA nativo) ed è stata utilizzata una colonna C18 in fase

inversa con particelle di polistirene-divinilbenzene non poroso (DNA Sep, Transgenomic) in cui sono stati caricati 10 µl di ciascun campione. Ciascun campione è stato eluito su gradiente lineare di acetonitrile costituito da un buffer A (0,1 mol/L TEAA) ed un buffer B (0,1 mol/L TEAA, 250 mL/L acetonitrile), aumentando ogni minuto il buffer B del 2%. Il DNA isolato da una popolazione eterogenea di cellule B policlonali e successivamente amplificato ed analizzato mediante DHPLC, assume una distribuzione Gaussiana, mentre il DNA isolato da una popolazione monoclonale genera un singolo picco di eluizione. Gli ampliconi sono stati quindi sequenziati in ambo le direzioni (forward e reverse) utilizzando il metodo Sanger. I geni riarrangiati sono stati indentificati mediante omologia con la sequenza germinale disponibile nel database IMGT® (<http://imgt.cines.fr>; European Bioinformatics Institute, Montpellier, France) su IgBLAST-NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/igblast/>; National Center for Biotechnology Information, U.S. National Library of Medicine, Bethesda MD, USA).

Fluorescence In Situ Hybridization Assay

La metodica FISH (Ibridazione in situ fluorescente) è stata eseguita sulle sezioni da 3µ utilizzando il kit Hystology FISH Accessory Kit e la sonda IGH FISH DNA probe (DakoCytomation, Denmark). Brevemente, le sezioni sono state prima incubate a 60°C per 1 ora, poi deparaffinate in

xilene, digerite parzialmente con trattamento blando con pepsina a 37 °C ed ibridate overnight a 45 °C con la sonda IGH FISH DNA.

Il giorno successivo ad ogni campione sono stati applicati 15 µl di DAPI Fluorescente Mounting Medium ed ogni campione è stato poi analizzato al microscopio a fluorescenza (Olympus BX61) dotato di un singolo filtro DAPI e un doppio filtro Texas Red/FITC per consentire la visualizzazione dei rispettivi segnali e di una CCD Photometrics camera per l'acquisizione delle immagini.

L'elaborazione delle immagini è stata effettuata avvalendosi del software Cyto Vision (vers. 3.93.2.) (Genus Technologies, Minneapolis, MN).

Sono stati contati un totale di 200 nuclei per ciascun campione, attribuendo un segnale di split o fusione solo quando il nucleo si presentava integro e non sovrapposto ad altri nuclei; sono stati esclusi dalla conta i nuclei senza alcun segnale. Inoltre, due segnali (verde e rosso), quando presenti ad una distanza minore del doppio del diametro del singolo segnale sono stati valutati come un singolo segnale, ossia come un segnale di fusione e non di split.

Campioni corrispondenti a casi di iperplasie reattive e a NHL sono stati utilizzati rispettivamente come controlli negativi e positivi.

Per quanto riguarda la valutazione dei risultati ottenuti, sono stati considerati come positivi quei casi in cui sono stati contati un numero di segnali di split $\geq 10\%$.

RISULTATI

Le caratteristiche cliniche sono sintetizzate nella Tabella 2.

Si osserva una netta prevalenza del sesso femminile con 13 donne arruolate a fronte di 7 uomini con un range di età variabile fra 6 e 76 anni con età media di 51.2 anni. Tutti i pazienti presentavano lesioni cutanee singole in assenza di coinvolgimento linfonodale e/o sistemico: in 13 casi era disponibile la sede del prelievo e quella più frequente era il tronco (includente torace, dorso ed addome) essendo la localizzazione riferita in sei casi, seguiva poi la localizzazione al volto in cinque casi e, per ultima con due localizzazioni, la regione glutea.

I dati relativi al follow-up sono disponibili solo per il caso 1 e il caso 6 dove è riferita l'evoluzione in franco linfoma cutaneo rispettivamente dopo mesi tre e cinque dalla prima biopsia .

Tabella 2

Caso	Età	Sesso	Sede	Diagnosi
1	76	M	Dorso	ILA B ai limiti con linfoma B di basso grado
2	59	M	ND	LnH B-cellulare
3	59	M	ND	LnH B-cellulare
4	59	M	ND	LnH B-cellulare
5	60	F	ND	ILA B
6	59	F	Sopracciglio destro	ILA B
7	60	F	Palpebra superiore destra	ILA B possibile espressione SCL/LLC
8	44	F	Addome	ILA B spia incipiente linfoma B follicolare
9	58	M	ND	ILA B probabilmente reattiva
10	6	M	ND	Leishmaniosi cutanea
11	39	F	Sottomammaria destra	LnH B-cellulare
12	72	F	Gluteo destro	ILA B possibile espressione iniziale linfoma B
13	44	F	Mammaria destra	ILA B microgranulomatosa
14	55	F	Solco naso-genieno sinistro	ILA B probabilmente reattiva
15	26	F	Frontale destro	ILA B probabilmente reattiva
16	59	F	Gluteo sinistro	ILA B altamente sospetto per LnH B-cellulare
17	52	F	Palpebra inferiore sinistra	ILA B
18	32	F	Intercostale	LnH B-cellulare di tipo marginale
19	54	F	Tronco	LnH B-cellulare di tipo follicolare
20	51	M	ND	LnH B-cellulare probabilmente marginale

ND: non disponibile; ILA B: iperplasia linfoide atipica B-cellulare; LnH: linfoma non Hodgkin; SCL/LLC: linfoma a piccole cellule/leucemia linfatica cronica

Come si può evincere dalla tabella 2 la diagnosi è stata di linfoma non Hodgkin B in sette casi (di cui due linfomi di tipo marginale ed uno di tipo follicolare), di iperplasia linfoide atipica B-cellulare in 12 casi (di cui 5 suggestivi ma non diagnostici per linfoma) ed un caso di pseudolinfoma da leishmaniosi cutanea.

Per quanto riguarda i risultati dell'indagine molecolare, sintetizzati in Tabella 3, nel caso della PCR nove casi su venti studiati hanno mostrato bande monoclonali per IgH, nove sono risultati policlonali e due erano non amplificabili.

I risultati della FISH, invece, hanno mostrato la presenza del segnale di split in 13 casi su 20 con percentuale variabile fra il 10% e il 45%, sei casi sono risultati negativi, mentre uno era tecnicamente insoddisfacente.

In rapporto alla diagnosi lo pseudolinfoma da leishmaniosi cutanea è risultato negativo alla PCR ed alla FISH, i sette linfomi cutanei hanno mostrato una FISH positiva in tutti i casi mentre la PCR ha dato un risultato monoclonale in 5 casi, policlonale in uno ed è risultata non amplificata in un altro; i 5 casi diagnosticati come "iperplasia linfoide atipica B-cellulare suggestiva ma non diagnostica per linfoma" hanno mostrato una banda monoclonale alla PCR ed un segnale di split alla FISH solo in un caso; uno è risultato tecnicamente insoddisfacente per entrambe le metodiche, mentre i restanti 3 sono risultati negativi sia alla PCR che alla FISH.

Per ultimo i casi diagnosticati semplicemente come “iperplasia linfoide atipica B-cellulare” hanno mostrato una banda monoclonale alla PCR ed un segnale di split positivo alla FISH in 3 casi, una PCR negativa ed un segnale di split positivo alla FISH in 2 casi e negatività per entrambe le metodiche in due casi.

Tabella 3

Caso	Diagnosi	Determinazione	PCR	FISH (segnale di split)	FISH (% di split)
1	ILA B ai limiti con linfoma B di basso grado	IgH	Monoclonale	+	20%
2	LnH B-cellulare	IgH	NA	+	45%
3	LnH B-cellulare	IgH	Monoclonale	+	40%
4	LnH B-cellulare	IgH	Monoclonale	+	35%
5	ILA B	IgH	Policlonale	+	18%
6	ILA B	IgH	Monoclonale	+	35%
7	ILA B possibile espressione SML/LLC B	IgH	NA	Inadeguato	
8	ILA B spia incipiente linfoma B follicolare	IgH	Policlonale	-	2%
9	ILA B probabilmente reattiva	IgH	Policlonale	+	20%
10	Leishmaniosi cutanea	IgH	Policlonale	-	<2%
11	LnH B-cellulare	IgH	Policlonale	+	10%
12	ILA B possibile espressione iniziale linfoma B	IgH	Policlonale	-	4%
13	ILA B microgranulomatosa	IgH	Monoclonale	+	10%
14	ILA B probabilmente reattiva	IgH	Policlonale	-	5%
15	ILA B probabilmente reattiva	IgH	Monoclonale	+	10%
16	ILA B Altamente sospetto per LnH B-cellulare	IgH	Policlonale	-	1%
17	ILA B	IgH	Policlonale	-	<1%
18	LnH B-cellulare di tipo marginale	IgH	Monoclonale	+	10%
19	LnH B-cellulare di tipo follicolare	IgH	Monoclonale	+	10%
20	LnH B-cellulare probabilmente marginale	IgH	Monoclonale	+	10%

NA: non amplificato

DISCUSSIONE

La valutazione dei disordini linfoproliferativi B cutanei può presentare notevoli difficoltà, soprattutto nella distinzione fra iperplasia linfoide reattiva e linfoma B di basso grado.

Sono diversi i fattori che possono contribuire a tale difficoltà: primo fra tutti giova ricordare che esiste una “sovrapposizione” morfologica fra lesioni reattive e linfoma di basso grado, soprattutto se alla base ci sono cause scatenanti come possono essere un morso di insetto o l’uso di farmaci; è dimostrato, inoltre, l’esistenza di un “continuum” morfologico per i disordini linfoproliferativi cutanei dove, in caso di prolungata stimolazione da parte di un fattore scatenante, si può assistere all’evoluzione di una iperplasia reattiva in un linfoma di basso grado (9).

Per “pseudolinfoma” (iperplasia linfoide, lymphadenosis benigna cutis) si intende un processo linfoproliferativo reattivo benigno policlonale composto in predominanza sia da cellule B che T e con, di norma, regressione spontanea dopo cessazione dell’agente causale o trattamento non aggressivo (3), in alcuni casi la causa è conosciuta (es. borreliosi, herpes virus, leishmania), in altri infiltrati la causa non è inequivocabile e sono suggeriti, come fattore scatenante, i farmaci o i morsi di insetto (11).

Il termine “iperplasia linfoide atipica” è stato utilizzato per quelle lesioni in cui esiste una incertezza diagnostica e, più specificamente, si riferisce a lesioni che sono suggestive ma non diagnostiche per linfoma in cui i dati

morfologici e quelli ancillari non permettono una diagnosi definitiva: pertanto tale definizione include sia manifestazioni “atipiche” di iperplasia linfoide reattiva che linfomi B di basso grado “early” (9).

La valutazione della clonalità è un metodo utile ed importante per la distinzione fra un infiltrato linfocitario benigno ed uno maligno. Come regola generale, la dimostrazione di una popolazione clonale è in molti casi una prova di malignità.

Esistono diverse tecniche per valutare la clonalità di un processo linfoproliferativo B-cellulare cutaneo: in letteratura è ben riportato l'utilizzo del protocollo BIOMED-2 PCR per la valutazione del locus delle catene pesanti delle immunoglobuline (17-19). Tuttavia tale metodica, in un infiltrato linfoide che può essere polimorfo come quello delle iperplasie linfoidi atipiche, dove seppur si procede mediante microdissezione laser, non offre alte garanzie di accuratezza per la possibilità di amplificazione del DNA di cellule reattive benigne comunque presenti nel campione (19).

Come ulteriore metodica si può ricorrere all'ibridazione in situ. La FISH è utilizzata per la ricerca di alterazioni cromosomiche maggiori (delezioni o duplicazioni) o di traslocazioni specifiche.

La sonda IgH FISH DNA con segnale di split identifica qualsiasi punto di rottura che coinvolge il locus IgH valutando la clonalità del corrispondente processo linfoproliferativo indipendentemente dal partner coinvolto e da uno specifico sottotipo.

Non esistono in letteratura studi specifici sull'utilizzo di tale sonda su campioni di biopsie cutanee.

E' riportato un unico studio su campioni citologici (20).

La FISH con segnale di split ha diversi vantaggi rispetto a quella con segnale di fusione in quanto la determinazione della traslocazione è indipendente dai geni partner coinvolti e permette di valutare traslocazioni coinvolgenti geni partner multipli come nel caso del locus IgH; inoltre non sono riportati casi falsi positivi a differenza delle sonde FISH con segnale di fusione (20). Recentemente, altri autori hanno dimostrato la superiorità della metodica FISH, anche con l'utilizzo di una sonda FISH con segnale di split, nella valutazione della fusione IGH-BCL2 in casi di linfoma follicolare su campioni di linfonodo (21).

In questo progetto di ricerca abbiamo dimostrato come la sonda IGH FISH DNA segnale di split abbia evidenziato la rottura all'interno del locus per le IgH in tutti i casi di franco linfoma B (casi 2,3,4,11,18,19,20) con una percentuale di split superiore al cut-off del 10% in 3 casi su sette; lo pseudolinfoma da leishmaniosi, come atteso, non ha mostrato segnale di split.

Pertanto tale sonda ha mostrato una sensibilità del 100% sia per i franchi linfomi che per l'iperplasia reattiva, in accordo con i dati riferiti in letteratura (20).

Negli stessi casi, la PCR eseguita secondo il protocollo BIOMED-2 ha evidenziato monoclonalità dell'infiltrato in cinque casi, mentre in uno è risultata policlonale e in un altro tecnicamente non soddisfacente: questi ultimi due risultati possono essere ben giustificati con i noti svantaggi della metodica. Risultati falsi-negativi possono aversi in caso di concentrazioni estremamente basse delle sequenze bersaglio, inoltre molto dipende dalla qualità del DNA bersaglio a suo volta correlato al tipo di tessuto, ai metodi di fissazione utilizzati, alle condizioni di esecuzione della metodica, alla specificità dei primers utilizzati, etc. (22).

Per quanto riguarda i casi diagnosticati come "iperplasia linfoide atipica" la sonda IGH FISH DNA segnale di split ha mostrato un segnale di split in sei casi su 12: di questi, per i casi 1 e 6 è disponibile il follow-up da cui si evince la progressione in franco linfoma: viene quindi confermata l'attendibilità della metodica anche per la concordanza con la PCR che, negli stessi campioni, ha evidenziato una banda monoclonale.

Tuttavia in tre casi, a fronte di una morfologia suggestiva ma non diagnostica per linfoma (presenza di multipli aggregati linfoidi nel derma e nell' ipoderma anche con arrangiamento follicolare nel caso 8; infiltrato linfoide con atipie nucleari, dissecante il collagene nel caso 12 e destruyente gli annessi e il collagene nel caso 16), si è osservata assenza del segnale di split confermata anche dalla policlonalità evidenziata dalla PCR.

In altri due casi (casi 14 e 17) ha mostrato assenza del segnale di split in accordo con i risultati della PCR e con gli aspetti morfologici che suggerivano come verosimile una forma reattiva.

Solo in un caso (caso 7) il materiale non ha permesso né l'esecuzione della FISH né della PCR.

Per quanto i nostri dati siano riferiti ad una piccola casistica con un follow-up limitato, i risultati evidenziando il segnale di split nei casi diagnosticati come franco linfoma (casi 2,3,4,11,18,19,20) e negli unici due ove, essendo disponibile il follow-up (casi 1 e 6), si evidenzia la progressione in linfoma, ci permettono di dire che la sonda IGH FISH DNA segnale di split ha mostrato una elevata sensibilità per il riconoscimento della clonalità nei disordini linfoproliferativi cutanei valutata su campioni di biopsie cutanee.

Questo risultato deve essere considerato “promettente” ed un buon punto di partenza per valutare l'applicabilità della sonda in rapporto alla PCR e, specificamente all'area grigia dell' iperplasia linfoide atipica B-cellulare, su una casistica certamente più ampia e con un buon follow-up.

BIBLIOGRAFIA

- 1) Shankland KR, Armitage JO, Hancock BW. Non-Hodgkin lymphoma. *Lancet*. 2012;380(9844):848-57.
- 2) Padhi S, Paul TR, Challa S, Prayaga AK, Rajappa S, D R, Sarangi R. Primary extra nodal non hodgkin lymphoma: a 5 year retrospective analysis. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2012;13(10):4889-95.
- 3) LeBoit PE, Burg G, Weedon D, Sarasain A. (Eds.): World Health Organization Classification of Tumours. Pathology and Genetics of Skin Tumours. IARC Press: Lyon 2006.
- 4) Salama S. Primary cutaneous B-cell lymphoma and lymphoproliferative disorders of skin. Current status of pathology and classification. *Am J Clin Pathol* 2000;114(Suppl 1):S104-S128.
- 5) Willemze R, Dreyling M. Primary cutaneous lymphoma: ESMO Clinical Recommendations for diagnosis, treatment and follow-up. *Annals of Oncology* 2009;20 (Suppl 4): iv115–iv118.
- 6) Pandolfino TL, Siegel RS, Kuzel TM, Rosen ST, Guitart J. Primary cutaneous B-cell lymphoma: review and current concepts. *J Clin Oncol*. 2000;18(10):2152-68.
- 7) Sokol L, Naghashpour M, Glass FL. Primary Cutaneous B-Cell Lymphomas: Recent Advances in Diagnosis and Management. *Cancer Control* 2012;19(3):236-244.
- 8) Deonizio J, Guitart J. The Role of Molecular Analysis in Cutaneous Lymphomas. *Semin Cutan Med Surg* 2012;31:234-240.
- 9) Wu JM, Vonderheid E, Gocke CD, Moresi JM, Liegeois N, Borowitz MJ. Flow cytometry of lesional skin enhances the evaluation of cutaneous B-cell lymphomas. *J Cutan Pathol* 2012;39: 918–928.

- 10) Cerroni L. Lymphoproliferative lesions of the skin. *J Clin Pathol* 2006;59:813–826.
- 11) Böer A, Tirumalae R, Bresch M, Falk TM. Pseudoclonality in cutaneous pseudolymphomas: a pitfall in interpretation of rearrangement studies. *Br J Dermatol* 2008;159:394–402.
- 12) Calonje JE, Brenn T, Lazar AJ, McKee PH. *McKee's Pathology of the Skin: Expert Consult - Online and Print 2 Vol Set, IV ed.* 2011.
- 13) Weedon D. *Weedon's Skin Pathology, 2-Volume Set: Expert Consult - Online and Print, III ed.* 2009.
- 14) Holm N, Flaig MJ, Yazdi AS, Sander CA. The value of molecular analysis by PCR in the diagnosis of cutaneous lymphocytic infiltrates. *J Cutan Pathol* 2002;29:447–452.
- 15) Berget E, Helgeland L, Molven A, Vintermyr OK. Detection of clonality in follicular lymphoma using formalin-fixed, paraffin-embedded tissue samples and BIOMED-2 immunoglobulin primers. *J Clin Pathol.* 2011;64:37-41.
- 16) van Dongen JJ, Langerak AW, Brüggemann M, Evans PA, Hummel M, Lavender FL, Delabesse E, Davi F, Schuurin E, García-Sanz R, van Krieken JH, Droese J, González D, Bastard C, White HE, Spaargaren M, González M, Parreira A, Smith JL, Morgan GJ, Kneba M, Macintyre EA. 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.
- 17) Morales AV, Arber DA, Seo K, Kohler S, Kim YH, Sundram UN. Evaluation of B-cell clonality using the BIOMED-2 PCR method effectively distinguishes cutaneous B-cell lymphoma from benign lymphoid infiltrates. *Am J Dermatopathol.* 2008;30:425-430.

- 18) Lukowsky A, Marchwat M, Sterry W, Gellrich 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;47:487-493.
- 19) Melotti CZ, Amary MF, Sotto MN, Diss T, Sanches JA. Polymerase chain reaction-based clonality analysis of cutaneous B-cell lymphoproliferative processes. *Clinics*. 2010;65:53-60.
- 20) Zeppa P, Sosa Fernandez LV, Cozzolino I, Ronga V, Genesio R, Salatiello M, Picardi M, Malapelle U, Troncone G, Vigliar E. Immunoglobulin heavy-chain fluorescence in situ hybridization-chromogenic in situ hybridization DNA probe split signal in the clonality assessment of lymphoproliferative processes on cytological samples. *Cancer Cytopathol*.2012;120:390-400.
- 21) Belaud-Rotureau MA, Parrens M, Carrere N, Turmo M, Ferrer J, de Mascarel A, Dubus P, Merlio JP. Interphase fluorescence in situ hybridization is more sensitive than BIOMED-2 polymerase chain reaction protocol in detecting IGH-BCL2 rearrangement in both fixed and frozen lymph node with follicular lymphoma. *Hum Pathol* 2007;38: 365-372.
- 22) Braun-Falco M, Schempp W, Weyers W. Molecular diagnosis in dermatopathology: what makes sense, and what doesn't. *Exp Dermatol*. 2009;18:12-23.