

Valor de la reacción en cadena de la polimerasa en el estudio de los síndromes linfoproliferativos

Value of the polymerase chain reaction in the study of lymphoproliferative syndromes

A. López Cousillas¹, A. Valiente², I. Ezpeleta³, F. García-Bragado¹

INTRODUCCIÓN

Durante los últimos 15 años hemos sido testigos de un tremendo avance en la comprensión de las bases moleculares del cáncer. Este progreso se ha debido en gran medida al uso de técnicas de genética molecular para estudiar los cambios citogenéticos que tienen lugar en los tumores humanos. Estos estudios están mejorando la comprensión de las neoplasias de diversas formas. Los conocimientos moleculares contribuyen fundamentalmente a conocer sus mecanismos patogenéticos pero también proporcionan claves útiles en la interpretación diagnóstica y parámetros pronósticos de los tumores, siendo previsible que en un futuro permitan plantear abordajes terapéuticos más acordes con estas alteraciones.

En el caso concreto de las neoplasias linfoides, el diagnóstico se ha realizado tradicionalmente en base al reconocimiento de alteraciones morfológicas de la estructura de los tejidos afectos y de las peculiaridades citológicas del proceso

neoplásico, planteándose en muchos casos dificultades no sólo a la hora de distinguir entre procesos reactivos y tumoriales, sino también para su clasificación. El avance en los conocimientos inmunológicos con la aparición de los anticuerpos monoclonales en la década de los 70 y el perfeccionamiento de las técnicas inmunohistoquímicas permitió el estudio rutinario del inmunofenotipo de estas neoplasias. El análisis inmunofenotípico ha sido una piedra angular que ha permitido reinterpretar los aspectos morfológicos y establecer una mejor relación con los aspectos biológicos de las neoplasias y la conducta clínica y evolutiva de los pacientes¹.

Las neoplasias linfoides (linfomas y leucemias linfoides), son proliferaciones clonales originadas a partir de una única célula B o T, que frecuentemente refleja un determinado estadio de maduración. En contraste, los procesos reactivos benignos, presentan generalmente una mezcla de células B y T surgidas a partir de múltiples clones, sin predominancia de una con-

ANALES Sis San Navarra 1999, 22 (Supl. 3): 33-40.

1. Servicio de Anatomía Pagológica. Hospital Virgen del Camino.
2. Servicio de Genética. Hospital Virgen del Camino.
3. Servicio de Hematología. Hospital Virgen del Camino.

Correspondencia:

Federico García-Bragado
Servicio de Anatomía Pagológica
Hospital Virgen del Camino
Irúnlarrea, 4
31008 Pamplona
Tfno. 948 429952
Fax 948 429978

creta. La discriminación entre un proceso reactivo y neoplásico, así como la determinación de la estirpe celular B o T en los procesos linfoproliferativos, son relevantes desde un punto de vista clínico. Los criterios morfológicos clásicos generalmente pueden distinguir entre procesos reactivos y neoplásicos, pero existen situaciones en las que el examen morfológico exclusivamente no permite el diagnóstico.

En el estudio de clonalidad de los procesos linfoproliferativos se pueden utilizar diversas técnicas moleculares. La primera técnica molecular utilizada en el estudio de traslocaciones y reordenamientos cloniales de las neoplasias linfoides fue el método de Southern Blot. Sin embargo, este método presenta una serie de limitaciones técnicas, que condicionan su uso en diagnóstico rutinario. El largo tiempo requerido para obtener resultados (7-10 días), el uso de material radiactivo y el elevado costo, son desventajas que le hacen poco útil en diagnóstico rutinario. Además, requerimientos como la elevada cantidad de ADN de alto peso molecular, ha limitado su uso a tejidos frescos o congelados.

Un gran hallazgo a mediados de los 80 fue la técnica de la "reacción en cadena de la polimerasa (PCR)", siendo proclamada por la revista *Science* el mayor hallazgo científico del año en 1989³, y que ha revolucionado la aplicación de la genética molecular al diagnóstico médico. El fundamento teórico de esta técnica es la amplificación exponencial de un segmento de ADN definido, mediante el uso de secuencias cortas de nucleótidos sintéticos (oligonucleótidos) o cebadores ("primers") que se hibridan de forma específica con cada una de las dos hebras complementarias de ADN. La amplificación se consigue al realizar una serie de ciclos repetitivos que consisten en la desnaturalización del DNA molde o templado, la hibridación de los "primers" con el templado y la síntesis del ADN complementario mediante la acción de la enzima denominada polimerasa del ADN. Si se realizan 20-30 ciclos del proceso de PCR se pueden obtener varios millones de copias de la secuencia de ADN de interés. Actualmente la enzima más universalmente empleada es la ADN polimera-

sa del microorganismo *Thermus Aquaticus* (DNA polimerasa Taq), que permite la síntesis de ADN a temperaturas por encima de los 70°C y resiste perfectamente los 94-95°C necesarios para separar las dos hebras de ADN.

Este método presenta una serie de ventajas técnicas sobre el convencional análisis de SB:

– La rapidez en obtener resultados (2-3 días).

– Menor costo.

– La no necesidad de utilizar material radiactivo.

– Requerimiento de menor cantidad de ADN, y como consecuencia menor cantidad de tejido disponible.

– Posibilidad de obtener resultados satisfactorios a partir de ADN parcialmente degradado.

En un principio, el análisis de clonalidad en procesos hematológicos mediante PCR parecía un tanto inconcebible, debido al gran repertorio de regiones V y J, que pueden intervenir en los distintos reordenamientos, la dificultad en la localización de secuencias consenso en estas regiones y sobre todo a la simultánea amplificación de todos los reordenamientos presentes en la muestra (cloniales y policlonales). La primera adaptación de la PCR para el análisis de clonalidad en procesos B ha sido relativamente reciente. Los fundamentos de esta estrategia descrita por estos autores fueron los siguientes:

– El uso de cebadores consensus de las secuencias más conservadas de las regiones V y J del gen IgH.

– Los cebadores deben flanquear los sitios de unión V-(D)-J, donde se genera gran diversidad debido a las regiones N.

– Los reordenamientos V-D-J presentes en la población clonal pueden discriminarse de los presentes en una población policlonal, gracias a la gran heterogeneidad de tamaños originada en la amplificación de estos últimos⁵.

Para la detección de traslocaciones la técnica de PCR convencional puede ser utilizada únicamente si los puntos de rotura se localizan en una región definida y

relativamente pequeña (menos de 2 kb). Este es el caso de las traslocaciones t(14;18) y t(11;14). En los casos en que la región a estudiar es mucho mayor, si la traslocación produce un gen de fusión con ARNm específico, como ocurre en la t(2;5), hay que recurrir a una variante de la técnica, denominada RT-PCR ("reverse transcription-PCR") o transcripción inversa seguida de PCR, lo que aumenta la complejidad al tener realizar previamente la síntesis de DNA a partir de ARN mediante una transcripción inversa.

Con estos antecedentes nos fijamos como objetivos del trabajo:

- Realizar un estudio morfológico e inmunofenotípico minucioso de los casos a estudio, determinación en la muestra de reordenamiento clonal B o T
- Determinar los reordenamientos específicos bcl-2 y bcl-1
- Comparar los resultados obtenidos en función del tipo de muestra de la que se extrae el ADN (parafina o congelado)
- Valorar los distintos protocolos de extracción de ADN para comprobar la validez de aquellos métodos más simplificados, que faciliten la aplicación rutinaria de estas técnicas.

MATERIAL Y MÉTODOS

En este trabajo se han estudiado 150 procesos linfoproliferativos, 100 de los cuales corresponden a casos estudiados consecutivamente en el Servicio de Anatomía Patológica del Hospital Virgen del Camino entre los años 1992 y 1995. En estos 100 casos contábamos con tejido fresco que era congelado en el momento de recibir la muestra, y que se conservaba en nitrógeno líquido a -70°C hasta que de él se extraía ADN. Los 50 casos restantes se seleccionaron del archivo con el fin de completar dentro de lo posible aquellas categorías diagnósticas que se encontraban menos representadas. En estos casos no se contaba con material congelado y se utilizó tejido que había sido fijado en formalína durante 24 horas e incluido en parafina según los procedimientos habituales en los laboratorios de Anatomía Patológica.

Para la clasificación de los casos se siguieron los criterios establecidos en la recientemente publicada Clasificación de Linfomas Revisada Europea-Americana (REAL)^{5,6}. En los procesos cutáneos consideramos más apropiada la Clasificación para Linfomas Primarios Cutáneos de la EORTC⁷. Para ello utilizamos los siguientes marcadores fenotípicos: CD45RB, CD20, k, l, CD3, TDT, CD5, CD43, CD15, CD30, CD34, CD79, CD68, ciclina D1, bcl-2.

Para la extracción de ADN se utilizó tejido congelado o incluido en parafina y que fue tratado según el mismo protocolo.

Se cortaron secciones de 5mm (5-10 cortes, dependiendo del tamaño del tejido y se ponían en un tubo Eppendorf de 1,5 ml. Solamente en el incluido en parafina se añadía 1ml de xilol. Se agitaba y centrifugaba a 12.000 rpm durante 5 minutos. Se decantaba el xilol y se repetía el lavado. Despues se lavaba el tejido con etanol 99° (a temperatura ambiente), se centrifugaba a 12.000 rpm durante 5 minutos y se decantaba el sobrenadante (se realizaban dos lavados). Posteriormente se dejaban secar los tubos a temperatura ambiente durante cinco minutos para permitir que se evaporase el etanol. Luego se añadía tampón de digestión de proteínas (100 ml) y proteinasa K (20 ml por cada 100 ml de tampón de digestión). Se dejaba toda la noche en un baño a 37°C. Al día siguiente se purificaba con fenol (200 ml) y clorofórmico (200 ml) y se centrifugaba durante diez minutos a 14.000 rpm, tras lo cual se recuperaba la fase superior. La purificación se repetía dos veces y si era necesario una tercera. La precipitación se realizaba con ClNa y etanol frío (-20°C). El ADN se resuspendía en TE 1: 0,1

Todas las reacciones se llevaron a cabo con el método "hot-start", añadiendo la Taq polimerasa y la mitad del volumen del buffer una vez que se han sobrepasado los 80°C, evitando así que la hibridación inespecífica del molde y el "primer" que se produce entre los 30° y los 60° de lugar a la síntesis de un producto no deseado en el primer ciclo de la reacción. Conseguimos con ello un aumento de la especificidad de cada reacción. En todas las reacciones, un tubo conteniendo todos los componentes

de la reacción salvo la muestra, se mantenía abierto durante todo el proceso de aliquotado de los tubos, siendo procesado como una muestra más. De este modo se controla el riesgo de contaminación entre las distintas muestras.

Para detectar reordenamientos del gen de la cadena pesada de las Ig, se realizaron dos reacciones independientes utilizando un "primer" consenso (J_H) CACCTGAGGAGACGGTGACC, para la región J, común a las dos reacciones, y el segundo "primer" (también consenso) era en un caso para la región FR3 ACACGGC(CT)(GC)TGAT-TACTGT y en el otro para la FR2 TGG(AG)TCCG(C/A)CAG(GC)C(CTC)(TC)C(ATCG)NGG, de modo que la región amplificada en la reacción con el "primer" FR3 es de menor tamaño y se encuentra dentro de la amplificada con el "primer" para FR2.

Los dos "primers" consenso utilizados para amplificar los genes del TCR γ , fueron respectivamente complementarios a una secuencia situada cerca del extremo 3' de los segmentos $V\gamma$ AGGGTTGTGTTGGAAT-CAGG, y a la región $J\gamma$ CGTCGACAACAGTGTGTTCCAC. Estos "primers" pueden

amplificar prácticamente todos los reordenamientos del gen TCR γ que se producen en las células linfoides⁹. El método descrito por Benhattar¹⁰, consiste en realizar una primera amplificación de 25 ciclos con un sólo "primer" (TJ γ) tras lo cual se añaden reactantes frescos que incluyen los dos "primers", y se amplifican otros 25 ciclos.

Para el reordenamiento bcl-2 se utilizó la técnica de PCR standar ampliamente difundida, con reacción única y dos únicos "primers", específicos para la región mbr del cromosoma 18 GAGAGTTGCTTACGTGGCCTG, y para la región J_H del cromosoma 14. Este último idéntico al utilizado para cdr2 y cdr3.

Para el reordenamiento bcl-1 se utilizó un método de PCR "nested" consistente en una primera amplificación con un "primer" para el cromosoma 11 y otro para el 14 (MTC1: CTACTGAAGGACTTGTGGGTTGCT y LJH: TGAGGAGACGGTGACC). Del producto de esta reacción realizamos una dilución 1/1000 de la cual utilizamos 1 μ l para realizar una segunda reacción con dos "primers" internos a los utilizados en la primera reacción (P3:ATAAGGCTGCTG-

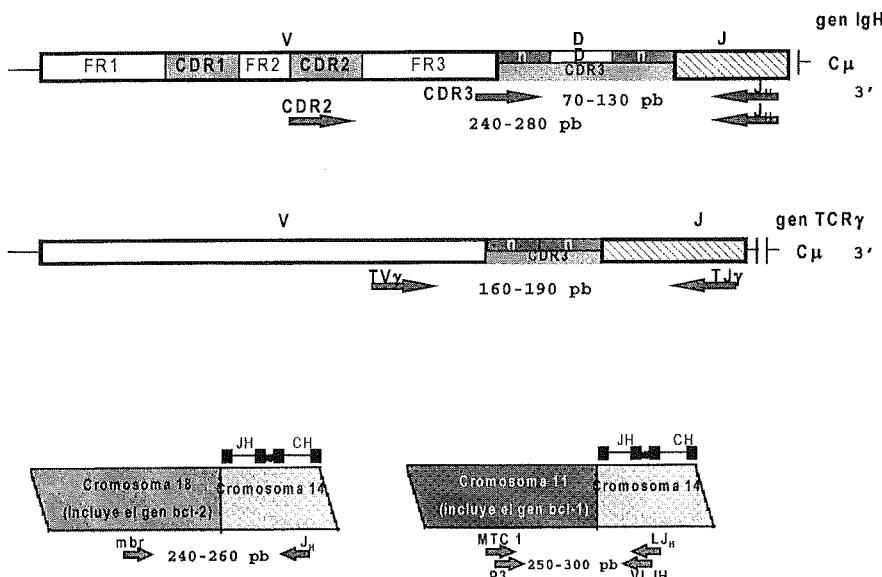


Figura 1. Estructura de los genes IgH y TCR γ después de producirse su reordenamiento y de las traslocaciones (14;18) y (11;14). También se representa la situación de los cebadores utilizados en cada caso.

VALOR DE LA REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA EN EL ESTUDIO...

Tabla 1. Resultados de los reordenamientos IgH y TCRγ por categorías diagnósticas.

Fenotipo	Tipo	Nº casos	CDR2+	CDR3+	2 o 3 +	TCR+
B	B-SLL	10	6	6	9	0
B	MCL	9	5	7	9	0
B	FL	15	7	11	13	0
B	MALT	6	1	4	5	0
B	SMZL	1	1	1	1	0
B	DLBCL	33	11	15	24	0
B	BURKITT	4	2	2	3	0
B	BURKITT-LIKE	1	0	0	0	0
B	PFCL	5	0	3	3	0
B	LPHD	5	2	1	3	0
B	HIPERPLASIA/LINFOMA	2	0	2	2	0
	NSHD	6	3	1	3	0
	MCHD	4	1	1	1	0
	LDHD	1	0	0	0	0
T	PRECURSOR T	1	0	0	0	0
T	PERIF T LINF	6	2	0	2	5
T	LINF T INTESTINAL	1	0	0	0	1
T	ALCL	1	0	0	0	1
T	MF	3	0	0	0	2
T	CTCLP	1	0	0	0	1
R	CLH	17	0	0	0	0
R	FH	7	0	0	0	0
R	INFLAMATORIOS	9	0	0	0	0

Las iniciales corresponden a los nombres en inglés de las siguientes entidades: B-SLL= linfoma de célula pequeña B (LLC-B); MCL= linfoma del manto; FL= linfoma folicular; MALT= linfoma asociado a mucosas; SMZL; linfoma de la zona marginal de bazo; DLBCL= linfoma difuso B de célula grande; PFCL= linfoma centrofolícular cutáneo; LPHD= enfermedad de Hodgkin tipo predominio linfocítico; NSHD= enfermedad de Hodgkin tipo esclerosis nodular; MCHD= enfermedad de Hodgkin tipo celularidad mixta; ALCL= linfoma anaplásico de células grandes; MF= micosis fungoideas; CTCLP= linfoma T cutáneo de células grandes; CLH= hiperplasia linfoides cutánea; FH: hiperplasia folicular

TACACATCGGTG y VLJH: GTGAC-CAGGGT(AGCT)CCTTGGCCCCAG).

RESULTADOS

En la tabla 1 se puede apreciar los distintos tipos de linfomas estudiados, su fenotipo y la demostración de reordenamientos y por tanto de clonalidad B o T. El porcentaje más alto de reordenamiento se obtiene, con esta técnica, en los linfomas B de bajo grado ya sean nodales o extranodales (87%), mientras que en los de alto grado este porcentaje se reduce al 71%. Tres de los 5 casos de enfermedad de Hodgkin de predominio linfocítico mostraron reordenamiento clonal en el gen de la

IgH, así como 4 de 11 de los casos de enfermedad de Hodgkin clásico.

Con respecto a los linfomas T los resultados obtenidos son de positividad en el 69,2% de los casos estudiados y había discrepancia geno/fenotípica en dos casos de linfoma T periférico. No hubo falsos positivos con esta técnica.

En cuanto al estudio de traslocaciones, la tabla 2 nos muestra que tan sólo en la mitad de los casos de linfoma folicular y del manto hemos podido demostrar reordenamiento de bcl-2 y bcl-1 respectivamente. Un solo caso de linfoma de linfocitos pequeños/LLC mostró reordenamiento con bcl-1. Dos de los 33 casos de linfomas difusos de células grandes (6%) reordenan-

Tabla 2. Resultados de los reordenamientos bcl-2/JH y bcl-1/JH por categorías diagnósticas.

Fenotipo	Tipo	Nº casos	bcl-1+	bcl-2+	IgH+ o bcl-1+ o bcl-2+
B	B-SLL	10	1 (10%)	0	9(90%)
B	MCL	9	5 (55%)	0	9 (100%)
B	FL	15	0	7 (46%)	14 (93%)
B	MALT	6	0	0	5
B	SMZL	1	0	0	1
B	DLBCL	33	0	2 (6%)	26 (78%)
B	BURKITT	4	0	0	3
B	BURKITT-LIKE	1	0	1	1(100%)
B	PFCL	5	0	0	3
B	LPHD	5	0	0	3
B	HIPERPLASIA/ LINFOMA	2	0	0	2
	TOTAL LINFOMAS B	91			83%
	NSHD	6	0	0	0
	MCHD	4	0	0	0
	LDHD	1	0	0	0
T	PRECURSOR T	1	0	0	0
T	PERIF T LINF	6	0	0	0
T	LINF T INTESTINAL	1	0	0	0
T	ALCL	1	0	0	0
T	MF	3	0	0	0
T	CTCLP	1	0	0	0
R	CLH	17	0	0	0
R	FH	7	0	0	0
R	INFLAMATORIOS	9	0	0	0

ron con bcl-2. Tampoco con esta técnica se obtuvieron falsos positivos.

DISCUSIÓN

Actualmente podemos realizar una buena aproximación a la caracterización molecular de las neoplasias linfoides con estrategias basadas en una amplificación simple del ADN y posterior electroforesis en geles de agarosa de media y alta resolución, con la suficiente especificidad que no resulta necesario recurrir a geles de acrilamida con medio desnaturizante ni a hibridaciones posteriores con sondas. Con este bajo nivel de complejidad podemos actualmente estudiar reordenamientos de los genes IgH, TCRg, bcl-1 y bcl-2, abarcando un amplio espectro de la patología linfoides.

Uno de los problemas primordiales cuando abordamos estas técnicas es el problema de los falsos positivos. Existe en

la actualidad una gran controversia sobre el significado clínico que hay que dar a la demostración de clonalidad en procesos linfoides por medio de reordenamientos genéticos¹¹, especialmente cuando se trata de procesos no nodales. Ello es debido a que diferentes autores han demostrado clonalidad en procesos linfoproliferativos extranodales considerados clínicamente^{12,13}. De acuerdo con estos resultados la identificación de clonalidad con malignidad no podría hacerse de forma directa, sin otra interpretación previa. Sin embargo, otros autores sí han demostrado una correlación entre clonalidad y linfoma¹⁴, lo que nos hace suponer que la elección de la estrategia de PCR a utilizar, los métodos de separación y visualización utilizados, y la interpretación de la lectura de los geles resultan determinantes en los resultados obtenidos.

Planteando como objetivo la aplicación diagnóstica, parece evidente que intentar evitar en lo posible los falsos positivos resultará de gran aplicación práctica. Consiguiendo esto, un resultado positivo será realmente útil aunque un resultado negativo no descarte malignidad^{15,16}. Con ese fin elegimos de entre las variadas estrategias publicadas para cada uno de los reordenamientos estudiados, aquellas en las que no se buscaba un incremento de sensibilidad sobre las técnicas estándar, de este modo conseguimos no obtener resultados positivos en ninguno de los 33 casos diagnosticados como procesos reactivos o hiperplásicos, manteniendo un más que aceptable porcentaje de demostración de clonalidad en linfomas B (83%) y T (77%).

En cuanto a la correlación entre inmunofenotipo e inmunogenotipo sabemos que teóricamente, todos los procesos linfoproliferativos deben mostrar reordenamiento clonal de los genes de las Ig o de los genes de TCR, dependiendo de su estirpe celular B o T, respectivamente. Sin embargo, en algunos casos, los resultados moleculares no se corresponden con los criterios inmunofenotípicos. En general se acepta que este tipo de discrepancias es frecuentemente el resultado de limitaciones técnicas o metodológicas.

Además en muchos estudios se ha comprobado que la especificidad de estirpe genética en los reordenamientos de los genes IgH y TCRg no es absoluta, puesto que entre el 4 y el 10% de las neoplasias linfoides pueden mostrar reordenamientos de ambos genes¹⁵.

Con respecto a los reordenamientos del gen IgH observados en los casos de enfermedad de Hodgkin, nuestros resultados sugieren que éstos son bastante frecuentes. Similares resultados han sido publicados por otros autores que con la misma combinación de "primers" han detectado estos reordenamientos en el 18,7% de la EH predominio linfocítico y hasta en el 32,2% de la forma clásica^{17,18}.

Del presente trabajo se puede concluir que:

– La caracterización molecular de los procesos linfoides aporta una información valiosa y en algunos casos determinante

sobre el origen clonal de estas neoplasias y sobre otras características genéticas relevantes que presentan algunos tipos de linfoma.

– Actualmente por técnicas de PCR se puede acceder, a estudiar reordenamientos de los genes IgH, TCRg, bcl-2/JH y bcl-1/JH, cubriendo con ellos un amplio espectro de la patología linfoide.

– La sensibilidad y especificidad varían según las estrategias aplicadas pero si se seleccionan adecuadamente, puede alcanzarse una especificidad del 100% (ausencia de falsos positivos) sin sacrificar en exceso la sensibilidad que en nuestro trabajo alcanzó el 83% y 75% en linfomas B y T respectivamente.

– La utilización de muestras procesadas rutinariamente en los laboratorios de patología (fijación en formol e inclusión en parafina) no han supuesto en nuestro caso una limitación para los estudios que hemos realizado, utilizando un método de extracción adecuado. Es conveniente en todo caso testar el ADN extraído de este tipo de muestras con un par de cebadores que amplifiquen una región conocida de un gen estructural de un tamaño que nos garantize una integridad suficiente para los estudios a realizar.

– La utilización de protocolos simplificados de extracción de ADN solamente resulta efectivo si limitamos el estudio a la región CDR III del gen IgH gracias al pequeño tamaño del producto a amplificar. Para el resto de los estudios la calidad del ADN extraído por estos métodos no resulta suficiente.

BIBLIOGRAFÍA

1. CAMPO E, MIQUEL R. Alteraciones moleculares y morfológicas de los síndromes linfoproliferativos. En: Alvaro T, Bosch R, Martínez S y Salvadó MT editores. 3º Curso de Hematopatología 1996. Institut Català de la Salut. Hospital de Tortosa, 1996: 192-203.
2. MULLIS KB, FALOONA FA. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction chain reaction. *Methods Enzymol* 1987; 155: 335-350.
3. GUYER RL, KOSHLAND DE JR. The molecule of the year. *Science* 1989; 4937: 1543-1546.

4. ALGARA P, PIRIS A. Aplicación de la genética molecular en el diagnóstico de los tumores linfoides. En: Alvaro T, Bosch R, Martínez S y Salvadó MT editores. 2º Curso de Hematopatología 1995. Institut Catalá de la Salut. Hospital de Tortosa, 1995:109-153.
5. HARRIS NL, JAFFE ES, STEIN H, BANKS PM, CHAN KC, CLEARY ML et al. A Revised European-American Classification of lymphoid neoplasms: A proposal from the international Lymphoma Study Group. *Blood* 1994; 84: 1361-1392.
6. CHAN WC, GREINER TC. Diagnosis of lymphomas by the polymerase chain reaction. *Am J Clin Pathol* 1994; 101: 273-274.
7. WILLEMEZ R, KERL H, STERRY W, BERTI L, CERRONI L, CHIMENTI S et al. EORTC classification for primary cutaneous lymphoma: A proposal from the cutaneous lymphoma study group of the European organization for research and treatment of cancer. *Blood* 1997; 1: 354-371.
8. COATES PJ, D'ARDENNE AJ, KHAN G, KANGRO HO, SLAVIN G. Simplified procedures for applying the polymerase chain reaction to routinely fixed paraffin wax sections. *J Clin Pathol* 1991; 44: 115-118.
9. BOURGUIN A, TUNG R, GALILI N, SKLAR J. Rapid, nonradioactive detection of clonal T-cell receptor gene rearrangements in lymphoid neoplasms. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; 87: 8536-8540.
10. BENHATTAR J, DELACRETAZ F, MARTIN P, CHAUBERT P, COSTA J. Improved polymerase chain reaction detection of clonal T-cell lymphoid neoplasms. *Diagn Mol Pathol* 1995; 4: 108-112.
11. COLLINS RD. Is clonality equivalent to malignancy: specifically, is immunoglobulin gene rearrangement diagnostic of malignant lymphoma? *Hum Pathol* 1997; 28: 757-759.
12. QUINTANA PG, KAPADIA SB, BAHLER DW, JOHNSON JT, SWERDLOW SHREED TJ et al. Salivary gland lymphoid infiltrates associated with lymphoepithelial lesions: a clinicopathologic, immunophenotypic, and genotypic study. *Hum Pathol* 1997; 28: 850-861.
13. KNOWLES DM, ATHAN E, UBRIACO A, MC NALLY L, INGHIRAMI G, WIECZOREK R et al. Extranodal noncutaneous lymphoid hyperplasias represent a continuous spectrum of B-cell neoplasia: demonstration by molecular genetic analysis. *Blood* 1989; 73: 1635-1645.
14. TORLAKOVIC E, CHERWITZ DL, JESSURUN J, SCHOLES J, MC GLENNEEN TSUJIMOTO Y et al. B-cell gene rearrangement in benign and malignant lymphoid proliferations of mucosa-associated lymphoid tissue and lymph nodes. *Hum Pathol* 1997; 28: 166-173.
15. ROCKMAN SP. Determination of clonality in patients who present with diagnostic dilemmas: a laboratory experience and review of the literature. *Leukemia* 1997; 11: 852-862.
16. 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: 60-68.
17. MANZANAL AI, SANTON A, ACEVEDO A, AGUILERA B, OLIVA H, BELLAS C. Molecular analysis of the IgH gene in 212 cases of Hodgkin's disease: correlation of IgH clonality with the histologic and the immunocytochemical features. *Mod Pathol* 1997; 10: 679-685.
18. MANZANAL A, SANTON A, OLIVA H, BELLAS C. Evaluation of clonal immunoglobulin heavy chain rearrangements in Hodgkin's disease using the polymerase chain reaction (PCR). *Histopathology* 1995; 27:21-25.