

**Maestría en Biología Molecular Médica**

**Universidad de Buenos Aires**

**Facultad de Farmacia y Bioquímica**

**Tesis de Maestría**

**Estudios genéticos en  
linfomas cutáneos de células T**

**Méd. Fuad Huamán Garaicoa**

**Directora: Dra. Irma Slavutsky**

**Laboratorio de Genética de las Neoplasias Linfoides**

**Instituto de Medicina Experimental (IMEX)**

**CONICET-Academia Nacional de Medicina de Buenos Aires**

**Buenos Aires, Argentina**

**2015**

## **AGRADECIMIENTOS**

Resulta difícil detallar personas para agradecer, pues ha sido un proceso largo que no sólo involucra este trabajo práctico sino que abarca desde el mismo aprendizaje en las aulas durante la cursada de la Maestría, incluyendo el equipo humano académico, el personal administrativo, los conocidos, los compañeros, los amigos, la familia, en fin todo un grupo de personas que de una u otra manera colaboraron profesional y humanamente en la realización de este trabajo. A todos ellos, un profundo agradecimiento.

A la Dra. Irma Slavutsky, quien me aceptó para trabajar con ella en su Laboratorio aún sin conocerme y me sumó como uno más en su excelente equipo de becarios. Ella supo ser en todo momento una excelente guía, ayudándome incondicionalmente, y con su sapiencia y tolerancia ha sido un soporte fundamental durante el desarrollo del presente estudio. No me alcanzan las palabras para agradecerle tanto.

A la Dra. Marina Narbaitz, por ser como es, por brindarse sinceramente conmigo y estar siempre dispuesta a colaborar en todo lo que me proponía, por darme sus enseñanzas, su confianza y amistad.

A todos los maestros, compañeros y amigos de Fundaleu, del Hospital Argerich y de las diferentes áreas de la Academia Nacional de Medicina, en particular del Laboratorio de Genética de las Neoplasias Linfoides. Gracias por su conocimiento, tiempo y camaradería volcados en mí.

A mis familiares, que a pesar de la distancia, me han dado todo el ánimo que se necesita sobre todo en momentos grises.

Finalmente a mi amada esposa Karla, quien me tiene gran paciencia y es mi sol.

## RESUMEN

La micosis fungoide (MF) es un tipo de desorden linfoproliferativo clonal que preferentemente involucra la piel, cuya etiología y patogénesis son inciertas. Las características clínicas y morfológicas no siempre resultan suficientes para predecir el pronóstico de esta enfermedad. Las técnicas de hibridación genómica comparada y microarrays han mostrado desbalances de los genes *CDKN2A* (9p21) y *C-MYC* (8q24), con un probable valor pronóstico en esta patología. Además la sobreexpresión de miR-155 fue observada en diferentes tumores sólidos y hematológicos, promoviendo la inestabilidad genómica, proliferación y supervivencia de las células malignas. En el presente estudio, evaluamos los desbalances genómicos de *CDKN2A* y *C-MYC*, así como su asociación con la expresión de miR-155 en pacientes con diagnóstico de MF. Los resultados fueron correlacionados con las características clínico-patológicas de los pacientes. El estudio fue realizado en biopsias fijadas en formol y embebidas en parafina de 36 pacientes con MF (26 varones; edad media 62,5 años, rango: 31-82 años): 16 casos correspondieron a MF estadio tumoral (MF-T), 13 a MF con transformación histológica a un linfoma T de células grandes (MF-TR), y 7 casos a la variante MF foliculotrópica (MF-F). El análisis de FISH se realizó usando las sondas OTS9P21.3 (*CDKN2A*) y OTS8Q24 (*C-MYC*) (LiVE-Lexel, Argentina). Se cuantificó la expresión de miR-155 mediante PCR en tiempo real usando metodología TaqMan. Se evaluaron además diez muestras de enfermedades inflamatorias cutáneas, usadas como controles. El estudio fue aprobado por el Comité de Ética local. Todos los individuos proveyeron consentimiento informado para su participación. El estudio de FISH fue realizado en 34 pacientes, 20 (59%) mostraron alteraciones genómicas (AG): 8 (40%) casos tuvieron delección de *CDKN2A*, 7 (35%) mostraron ganancias de *C-MYC* y 5 (25%) exhibieron ambos desbalances. La delección de *CDKN2A* fue observada en 7/13 (54%) MF-TR, 4/7 (57%) MF-F y 2/16 (12,5%) MF-T ( $p=0,03$ ); mientras que la ganancia de *C-MYC* fue detectada en 7/13 (54%) MF-TR y en 5/7 (71,4%) MF-F. De esta forma, la frecuencia de AG fue de 14,3% MF-T frente a 92,3% MF-TR y 85,7% MF-F ( $p=0,001$  y  $p=0,004$ , respectivamente). Estas aberraciones fueron más frecuentes en las lesiones ubicadas en cabeza, cuello y extremidades inferiores (77,8%) en contraste con las halladas en el tronco y miembros superiores (40%) ( $p=0,03$ ). Por inmunohistoquímica, la mayoría de los casos con < 25% células CD30+ no presentaban AG (91% vs 9%) ( $p=0,01$ ), mientras que los pacientes con alteraciones mostraron una mayor media del índice de proliferación (Ki-67) (49,5%) que los casos sin alteraciones (SA) (5%) ( $p=0,003$ ). Adicionalmente, las MF-TR de origen foliculotropo tenían más frecuentemente delección 9p21 (80%) que ganancia de 8q24 (40%) respecto a las de origen clásico (42,8% y 71,4%, respectivamente). La respuesta clínica al tratamiento fue ausente en 11/20 (55%) de los casos con AG respecto a 2/14 (14,3%) pacientes SA ( $p=0,02$ ). Aunque no se alcanzaron diferencias significativas, los niveles de LDH y Beta 2 microglobulina, y la recaída extracutánea fueron mayores en relación al grupo SA. Además, el grupo con AG mostró la sobrevida más corta (92 meses) comparado con los casos SA, que no alcanzaron la media de supervivencia (Log-rank  $p=0,04$ ), indicando su asociación con un pronóstico desfavorable. El análisis de la expresión génica ( $n=36$ ) mostró sobreexpresión de miR-155 en el 25% de las MF-TR y en el 28,6% de las MF-F, mientras que sólo se observó en el

7,7% de las MF-T. No se detectó sobreexpresión de miR-155 en los controles. La correlación con los resultados de FISH mostró incremento de la expresión de miR-155 en el 26,3% de los pacientes con AG respecto de 8,3% de los casos SA. Nuestros resultados muestran una alta proporción de pérdidas de 9p21 y 8q24 en pacientes con MF. La MF-TR exhibió la mayor frecuencia de AG, apoyando un rol de éstas alteraciones en el proceso de transformación neoplásica. Aún cuando el número de MF-F es reducido en nuestra serie, esta variante morfológica podría estar asociada a una mayor frecuencia de AG. Finalmente, nuestros hallazgos en la expresión de miR-155 apoyan su relación con la inestabilidad genómica y el desarrollo tumoral, pudiendo constituir un aporte para la profundización de la caracterización biológica de esta patología.

## ABSTRACT

Mycosis fungoides (MF) is a clonally derived lymphoproliferative disorder that preferentially involves the skin, which etiology and pathogenesis remains elusive. Morphological and clinical features are not always accurate enough to predict the disease outcome. Comparative genomic hybridization and microarrays have shown imbalances of *CDKN2A* (9p21) and *C-MYC* (8q24), with probable prognostic value in this pathology. In addition, miR-155 overexpression was observed in several hematological and solid tumors, promoting genomic instability, proliferation, and survival of malignant cells. In this study, we have evaluated *CDKN2A* losses and *C-MYC* gains and their association with miR-155 expression, in patients with diagnosis of MF. Results were correlated with clinicopathological features of patients. The study was performed on formalin-fixed and paraffin-embedded biopsies from 36 patients with MF (26 males; median age 62.5 years, range: 31-82 years): 16 cases were tumor stage MF (T-MF), 13 were MF with histological transformation to a large T-cell lymphoma (TR-MF) and 7 were folliculotropic MF (F-MF) variant. FISH analysis using OTS9P21.3 (*CDKN2A*) and OTS8Q24 (*C-MYC*) probes (LiVE-Lexel, Argentina), was performed. Gene expression was quantified by real time PCR using TaqMan methodology. Ten control samples from benign skin diseases were also evaluated. The study was approved by the local Ethics Committee. All individuals provided their informed written consent. FISH study was performed in 34 patients, 20 (59%) showed genomic alterations (GA): 8 (40%) cases had *CDKN2A* deletion, 7 (35%) showed *C-MYC* gains and 5 (25%) exhibited both anomalies. *CDKN2A* deletion was observed in 7/13 (54%) TR-MF, 4/7 (57%) F-MF and 2/16 (12.5%) T-MF ( $p=0.03$ ); meanwhile *C-MYC* gain was detected in 7/13 (54%) TR-MF and 5/7 (71.4%) F-MF. Thus, GA rate was lower in T-MF 14.3% with respect to TR-MF 92.3% and F-MF 85.7% ( $p=0.001$  and  $p=0.004$ , respectively). These aberrations were more frequent in head, neck and lower limbs (77.8%) in contrast with trunk and upper limbs (40%) ( $p=0.03$ ). By immunohistochemistry, majority of cases with  $<25\%$  CD30+ cells did not show GA (91% vs 9%) ( $p=0.01$ ); meanwhile patients of GA group had more high median proliferation index (Ki-67) (49.5%) in comparison to cases with no genomic aberrations (NA) (5%) ( $p=0.003$ ). Interestingly, TR-MF with follicular origin had more frequently 9p21 deletion (80%) and less 8q24 gain (40%) respect to classic origin (42.8% and 71.4%, respectively). Clinical response to

treatment was absent in 11/20 (55%) of cases with GA vs. 2/14 (14.3%) patients with NA ( $p=0.02$ ). Although no significant differences were reached, mean LDH and Beta 2 microglobulin levels and extracutaneous relapse were higher with respect to those with NA. In addition, the group with GA showed shorter overall survival (92 months) compared to cases with NA, that not reached the median survival (Log-rank  $p=0.04$ ), indicating their association with poor outcome. Gene expression analysis ( $n=36$ ) showed miR-155 upregulation in 25% TR-MF and 28.6% F-MF and in only 7.7% T-MF. No miR-155 expression was observed in controls. The correlation with FISH results found miR-155 overexpression in 26.3% of patients with GA and 8.3% of cases with NA. Our results showed high proportion of 9p21 losses and 8q24 gains in MF patients. TR-MF exhibited the highest frequency of GA, supporting a role in the process of neoplastic transformation. Although the number of F-MF is reduced in our series, this morphological variant would seem to be associated to an increased frequency of genomic imbalances. Moreover, our findings on miR-155 expression support its relation with genomic instability and tumor development, contributing a better biological characterization of this pathology.

## ABREVIATURAS

ADN: ácido desoxirribonucleico	COMMD1: <i>Copper metabolism (Murr1) Domain containing 1</i>
ADNc: copia de ácido desoxirribonucleico	CTG: citogenética convencional
AG: anomalías genómicas	CYLD: <i>cylindromatosis turban tumor syndrome</i>
AGO: proteínas argonautas	DAB: diaminobenzidina
Akt2: <i>v-akt murine thymoma viral oncogene homolog 2</i>	DAPI: <i>4',6-diamidino- 2-phenylindole fluorescent</i>
AMPc: monofosfato de adenosina, cíclico	DGCR8/Pasha: <i>DiGeorge syndrome critical region gene 8/ Partner of Drosha in Drosophila</i>
ARF: <i>alternative open reading frame</i>	DKC1: <i>dyskeratosis congenita 1</i>
ARN: ácido ribonucleico	dNTPs: desoxirribonucleótidos
ARNm: ácido ribonucleico mensajero	DUSP5/6: <i>dual-specificity protein phosphatase 5/6</i>
B2M: beta-2 microglobulina	E2F: factor de elongación 2
BCL6: <i>B-cell CLL/Lymphoma 6</i>	EORTC: <i>European Organization for Research and Treatment of Cancer</i>
bHLHZip: <i>basic Helix-Loop-Helix Leucine Zipper</i>	ETS-1: <i>v-ets avian erythroblastosis virus E26 oncogene homolog 1</i>
BIC: <i>B-cell integration cluster</i>	FBXW7: F-box/WD repeat-containing protein 7
Bim: <i>Bcl-2-interacting mediator of cell death</i>	FISH: hibridación in situ por fluorescencia
Blimp-1: <i>B lymphocyte-induced maturation protein-1</i>	FoxP3: <i>forkhead box P3</i>
BTLA: <i>B and T-lymphocyte associated</i>	GW182: <i>gawky 182-protein family</i>
CCR4: <i>chemokine receptor 4</i>	H&E: hematoxilina & eosina
CCR7: <i>chemokine receptor 7</i>	HTLV-1: <i>human T lymphotropic virus</i>
CDK: <i>cyclin-dependent kinases</i>	IFN- $\gamma$ : interferón gamma
CDKN2A: <i>cyclin-dependent kinase 2a</i>	IL-2: interleucina 2
CGH: hibridación genómica comparada	
CLA: <i>cutaneous lymphocyte antigen</i>	
c-MAF: <i>macrophage-activating factor</i>	
c-MYC: <i>v-myc myelocytomatosis viral oncogene homolog</i>	

ISCL: *International Society of Cutaneous Lymphomas*  
kb: kilobases  
kDa: kiloDalton  
LCCT: linfomas cutáneos primarios a células T  
LCP: linfomas cutáneos primarios  
LDH: enzima lactato deshidrogenasa  
LLA: leucemia/linfoma linfoblástica aguda  
LTA: leucemia de células T del adulto  
MAX: *MYC-associated Factor X*  
Mb: megabases  
MDM2: *MDM2 proto-oncogene, E3 ubiquitin protein ligase*  
MF: micosis fungoide  
MF-F/ F-MF: micosis fungoide foliculotropa  
MF-T/ T-MF: micosis fungoide en estadio tumoral  
MF-TR/ TR-MF: micosis fungoide transformada a linfoma T de células grandes  
MIR155HG: *miR-155 host gene*  
MiRNA: microRNA  
M-MLV: *Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase*  
MUM1: *melanoma associated antigen (mutated) 1*  
NPM1/B23: *nucleophosmin (nucleolar phosphoprotein B23, numatrin)*  
OMS: Organización Mundial de la Salud

PBS: *Phosphate-buffered saline*  
PCR: reacción en cadena de la polimerasa  
PD-1: *programmed cell death protein-1*  
PDCD4: *programmed cell death 4 (neoplastic transformation inhibitor)*  
PKA: proteína kinasa A  
PTEN: *phosphatase and tensin homolog*  
PTPN22: *Protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 22*  
qRT-PCR: PCR en tiempo real  
Rb: proteína retinoblastoma 1  
RISC: *RNA-induced silencing complex*  
SA/NA: sin alteraciones genómicas  
SHIP1: *Src homology-2 domain-containing inositol 5-phosphatase 1*  
SHP2: *SH2-domain-containing protein tyrosine phosphatase 2*  
SOCS1: *suppressor of cytokine signaling 1*  
SS: Síndrome de Sézary  
STAT5: *signal transducer and activator of transcription 5*  
STMN1: *Stathmin 1/oncoprotein 18*  
TCR: receptor de células T  
TFH: *T follicular helper cell*  
Th1: *T helper type 1*  
Th2: *T helper type 2*  
TOPOI: topoisomerasa I  
TARBP2: *TAR (HIV-1) RNA binding protein 2*  
Treg: célula T regulatoria  
TLR: *Toll-like receptor*

## ÍNDICE

<b>1. INTRODUCCIÓN</b>	1
1.1. Linfomas cutáneos primarios	2
1.1.1. Micosis fungoide	3
1.1.1.2. Variantes de micosis fungoide	9
1.1.2. Síndrome de Sézary	10
1.2. Estudios citogenéticos y citomoleculares en neoplasias linfoides	11
1.2.1. Estudios citogenéticos y citomoleculares en linfomas cutáneos primarios a células T	11
1.2.2. Genes involucrados en linfomas cutáneos primarios a células T	16
1.2.2.1. Gen <i>CDKN2A</i>	16
1.2.2.2. Gen <i>MYC</i>	18
1.3. Estudios moleculares en linfomas cutáneos primarios a células T	20
1.3.1. MicroRNAs: características generales	20
1.3.2. Los miRNAs y el desarrollo de los linfocitos T	22
1.3.3. Los miRNAs y el cáncer	23
1.3.3.1. Los microRNAs en las neoplasias linfoides a células T	24
1.3.4. MicroRNA-155	26
<b>2. OBJETIVOS</b>	28
<b>3. MATERIALES Y METODOS</b>	30
3.1. Población estudiada	31
3.2. Metodología	32
3.2.1. Fijación de la muestra e inclusión en parafina	32
3.3. Técnicas de tinción	33
3.3.1. Hematoxilina & Eosina	33
3.3.2. Inmunohistoquímica	34
3.3.3. Hibridación in situ con fluorescencia	36
3.4. Extracción de ARN de muestras incluidas en parafina	39



3.4.1. Cuantificación espectrofotométrica del ARN.....	42
3.5. PCR en tiempo real.....	42
3.6. Análisis estadístico.....	47
<b>4. RESULTADOS.....</b>	<b>48</b>
4.1. Análisis citomolecular.....	49
4.1.1. Distribución de las AG según las características clínicas e histopatológicas de los pacientes.....	51
4.1.1.1. Análisis en función de la edad y el género de los pacientes.....	51
4.1.1.2. Análisis de las AG acorde a la extensión y localización anatómica de las lesiones.....	53
4.1.1.3. Asociación de las AG con las características morfológicas e inmunofenotípicas.....	54
4.1.1.4. Correlación con las características clínico-terapéuticas y de supervivencia de los pacientes.....	56
4.2. Evaluación de la expresión del miR-155 en pacientes con MF y controles.....	59
<b>5. DISCUSIÓN.....</b>	<b>64</b>
<b>6. CONCLUSIONES.....</b>	<b>73</b>
<b>7. BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>76</b>

# ***Introducción***

## 1. INTRODUCCIÓN

### 1.1. Linfomas cutáneos primarios

Los linfomas cutáneos primarios (LCP) representan aproximadamente el 30% de todos los linfomas y constituyen el segundo grupo más frecuente de linfomas no Hodgkin extraganglionares, después de los linfomas gastrointestinales. Entre ellos, los linfomas cutáneos primarios a células T (LCCT) constituyen la gran mayoría (75%), encontrándose caracterizados por la expansión clonal de linfocitos T malignos que involucran primariamente la piel. Los mismos se caracterizan por una alta heterogeneidad clínica e histológica que dificulta el diagnóstico y condiciona pronósticos muy variables (Willemze et al, 2005). A nivel epidemiológico, datos de los Estados Unidos de América (EEUU) estiman una incidencia de LCP de 0,4-1/100.000 habitantes, que se ha ido incrementando en los últimos años (Bradford et al, 2009). En cuanto a nuestro país, contamos con la información de la Red de Linfomas Cutáneos, que muestra una tasa de 0,5- 0,8/100.000 habitantes, correspondiendo el 91,2% a los LCCT; en este registro la micosis fungoides (MF)/Síndrome de Sézary (SS) representa el 72,3% del total de los LCP reportados (Andrade et al, 2014), más alta que la tasa de EEUU (LCCT: 71,3%; MF/SS: 39,1%) (Bradford et al, 2009).

La caracterización clínico-patológica de este tipo de linfomas es compleja y las clasificaciones al respecto han sufrido frecuentes modificaciones con inclusión de nuevas entidades y cambio de denominación de otras existentes, encontrándose en vigencia actualmente la última revisión de la Organización Mundial de la Salud (OMS) (Ralfkiaer et al, 2008a), que se detalla en la Tabla 1.

**Tabla 1. Clasificación de la OMS (Ralfkiaer et al, 2008a).**

Subtipo histológico
Micosis fungoide
Síndrome de Sézary
Trastornos linfoproliferativos primarios cutáneos CD30 positivos: <ul style="list-style-type: none"> <li>• Linfoma primario cutáneo anaplásico de células grandes</li> <li>• Papulosis linfomatoide</li> </ul>
Linfoma/Leucemia de células T del adulto
Linfoma subcutáneo de células T, tipo paniculítico
Linfoma de células T/NK extraganglionar, tipo nasal
Linfoma de células T periférico (no especificado)
Linfoma cutáneo primario agresivo de células T citotóxico epidermotropo CD8+ (provisional)
Linfoma cutáneo primario de células T de células pequeñas/medianas CD4+ (provisional)
Linfoma cutáneo primario de células T gamma-delta
Linfoma tipo hidroa vacciniforme

### 1.1.1. Micosis fungoide

En la práctica clínica los LCCT se dividen en dos grupos principales: linfomas de tipo MF/SS y linfomas de tipo no MF/SS. La forma más frecuente es la MF, que representa más del 50% de estos linfomas (Willemze et al, 2005), seguida por los trastornos linfoproliferativos cutáneos primarios CD30 positivos. Ambas entidades se caracterizan por un curso relativamente indolente en comparación con la mayor parte del resto de linfomas de células T que tienen un curso más agresivo (Ralfkiaer et al, 2008a).

El diagnóstico histológico resulta difícil, especialmente de las formas iniciales de MF y de las entidades provisionales o recientemente incluidas (Pimpinelli et al, 2005). No obstante, la disponibilidad de mayor número de marcadores inmunohistoquímicos y el análisis molecular del tejido, han contribuido a una mejor caracterización de esta patología (Willemze et al, 2005). En la mayoría de los casos es necesaria una adecuada correlación clínico-histológica para establecer el diagnóstico definitivo.

Al igual que la clasificación clínico-histológica, la **estadificación** se ha visto modificada en diversas ocasiones, tendiente a poder definir con mayor precisión el pronóstico de la enfermedad. En la última revisión (Olsen et al, 2007) se incluyen el tipo y

grado de afectación cutánea (T), el nivel de compromiso ganglionar (N), la afectación visceral (M) y la expresión en sangre periférica (B) (Tabla 2).

**Tabla 2.** Clasificación TNMB revisada de la International Society of Cutaneous Lymphomas/European Organization for Research and Treatment of Cancer (ISCL/EORTC) (Olsen et al, 2007).

TNMB	Estadios clínicos
<b>T</b>	<p>T1: Placas, pápulas o manchas limitadas, que afectan a menos del 10% de la superficie corporal</p> <p>T1a: solo manchas</p> <p>T1b: mancha +/- placa</p> <p>T2: Placas, pápulas o manchas, que afectan a más del 10% de la superficie corporal</p> <p>T2a: solo manchas</p> <p>T2b: mancha +/- placa</p> <p>T3: Uno o más tumores (<math>\geq 1</math> cm)</p> <p>T4: Eritema confluyente que afecta <math>\geq 80\%</math> de la superficie corporal</p>
<b>N</b>	<p>N0: Ganglios linfáticos periféricos sin anomalías clínicas, no se requiere biopsia.</p> <p>N1: Ganglios linfáticos periféricos con anomalías clínicas, histología Dutch grado 1 o NCI LN 0-2.</p> <p>N1a: Clon negativo</p> <p>N1b: Clon positivo</p> <p>N2: Ganglios linfáticos con anomalías clínicas, histología Dutch grado 2 o NCI LN 3.</p> <p>N2a: Clon negativo</p> <p>N2b: Clon positivo</p> <p>N3: Ganglios linfáticos periféricos con anomalías clínicas, histología Dutch grado 3-4 o NCI LN 3, clon positivo o negativo.</p> <p>Nx: Ganglios linfáticos periféricos con anomalías clínicas sin confirmación histológica.</p>
<b>M</b>	<p>M0: Sin afectación visceral</p> <p>M1: Afectación visceral (se requiere confirmación histológica y especificación del órgano afectado).</p>
<b>B</b>	<p>B0: Ausencia de afectación significativa de sangre periférica: <math>\leq 5\%</math> de los linfocitos periféricos son atípicos (células de Sézary)</p> <p>B0a: clon negativo</p> <p>B0b: clon positivo</p> <p>B1: Baja carga tumoral en sangre periférica: <math>&gt; 5\%</math> de linfocitos en sangre periférica son atípicos (células de Sézary) pero no cumple criterios de B2.</p> <p>B1a: clon negativo</p> <p>B1b: clon positivo</p> <p>B2: Elevada carga tumoral en sangre periférica: <math>\geq 1000</math> células de Sézary/<math>\mu</math>L con clon positivo.</p>

T: tipo y grado de afectación cutánea; N: grado de compromiso ganglionar; M: afectación visceral; B: compromiso en sangre periférica.

En base a esta estadificación TNMB de la ISCL/EORTC se establecen los estadios clínicos que definen a la enfermedad inicial (IA-IIA) y avanzada (IIB-IV) (Tabla 3). De esta forma, la correcta estadificación de estos pacientes requiere una completa exploración física e incluye: a) análisis de sangre; b) pruebas de imágenes; c) biopsia de ganglio linfático; d) citometría de flujo; e) análisis del reordenamiento del gen del receptor de células T (TCR); f) biopsia de médula ósea en caso de una alteración de las series en sangre periférica que no esté justificada por una causa conocida o un estadio B2 (Willemze et al, 2005).

**Tabla 3.** Estadificación revisada de la ISCL/EORTC (Olsen et al, 2007).

<b>Estadio clínico</b>	<b>T</b>	<b>N</b>	<b>M</b>	<b>B</b>
IA	1	0	0	0-1
IB	2	0	0	0-1
IIA	1-2	1-2	0	0-1
IIB	3	0-2	0	0-1
IIIA	4	0-2	0	0
IIIB	4	0-2	0	1
IVA1	1-4	0-2	0	2
IVA2	1-4	3	0	0-2
IVB	1-4	0-3	1	0-2

T: tipo y grado de afectación cutánea; N: grado de compromiso ganglionar; M: afectación visceral; B: compromiso en sangre periférica.

La OMS define a la MF como un linfoma de células T cutáneo primario, epidermotropo, caracterizado por infiltrados de linfocitos T pequeños a medianos con núcleos cerebriformes. Es una enfermedad típica de personas mayores de 50 años, que afecta fundamentalmente al género masculino con una proporción varón:mujer de 2:1 (van Doorn et al, 2000). Un trabajo reciente (Wilson et al, 2012) observa menor edad al diagnóstico en las personas no caucásicas (51-53 años) respecto de los caucásicos (59 años). Al presente se desconocen los factores etiológicos que intervienen en el desarrollo de esta patología, habiéndose postulado la participación de distintos agentes infecciosos, factores ambientales/ocupacionales, alteraciones inmunológicas y genéticas, sin haberse podido demostrar de forma definitiva su relación (Dereure et al, 2002).

A nivel **clínico-dermatológico** (Figura 1), la MF suele tener un curso indolente con lenta progresión (hasta décadas) desde la aparición de máculas (lesión no sobreelevada ni indurada) y placas (lesión elevada o indurada) de predominio en zonas no fotoexpuestas hasta eventualmente tumores (lesión sólida, nodular mayor a 1 cm) (Ralfkiaer et al, 2008a). En fases avanzadas de la enfermedad puede haber afectación ganglionar y visceral así como expresión en sangre periférica (Van Doorn et al, 2000; Wilcox, 2011).

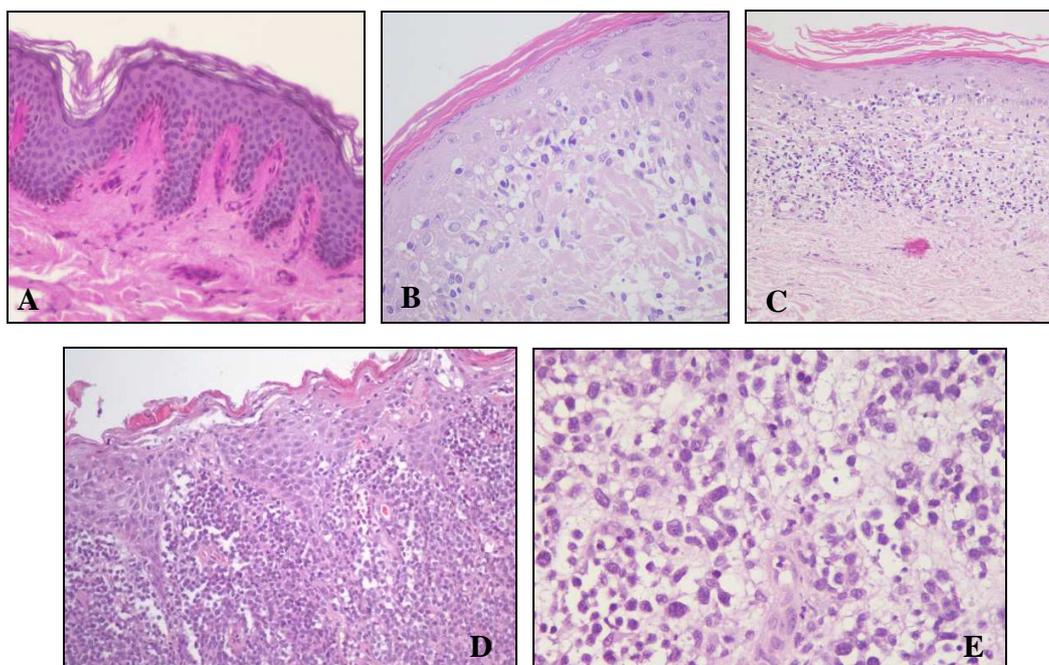


**Figura 1.** Estadios clínico-dermatológicos de MF: A) mácula; B) placa; C) tumor.

A nivel histopatológico se distinguen los siguientes **estadios** (Figura 2):

- a) **Mácula:** Lesión inicial, con características histológicas incipientes: infiltrado liquenoide focal o en banda en la dermis papilar constituido por linfocitos, con discreto epidermotropismo por aislados linfocitos pequeños y halo citoplasmático claro, distribuidos a lo largo de la capa basal de la epidermis. La atipia suele ser mínima o ausente. La epidermis puede presentar una hiperplasia psoriasiforme y la dermis una discreta fibrosis.
- b) **Placa:** Denso infiltrado en banda formado por elementos linfoides de tamaño pequeño a intermedio con núcleo hiper cromático cerebriforme, con ausencia de espongiosis y pronunciado epidermotropismo de células individuales o pequeños agregados (microabscesos de Pautrier).
- c) **Tumor:** El infiltrado linfoide monomorfo suele ser difuso y ocupar toda la dermis, perdiendo el epidermotropismo característico. Los linfocitos neoplásicos son pequeños a medianos, con atipia y figuras mitóticas. Pueden hallarse abundantes

células grandes de aspecto blástico, con núcleos prominentes que, de acuerdo a su porcentaje, pueden corresponder a una MF transformada (MF-TR) (Magro et al, 2007; Cerroni et al, 2009).

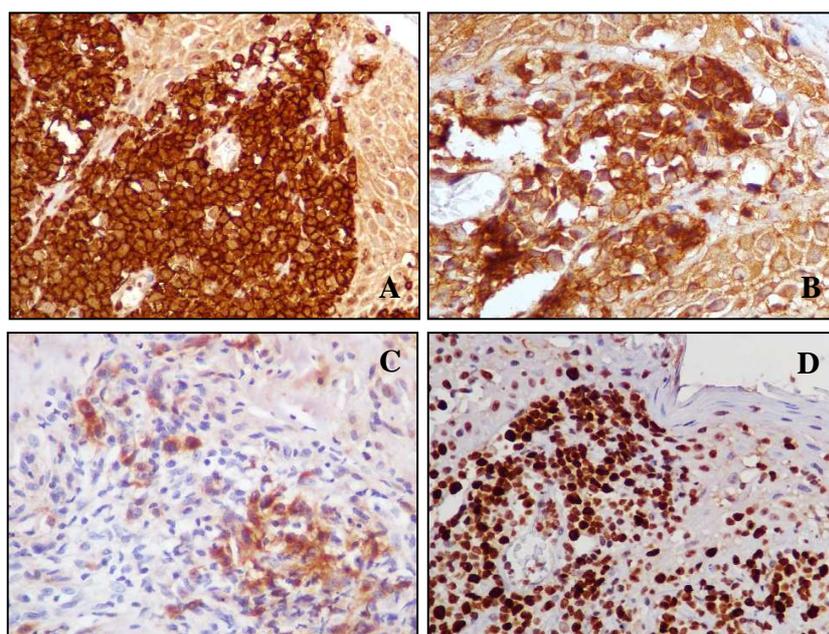


**Figura 2.** Imágenes histológicas: A) Piel normal. Estadios de MF según sus características clínicas: B) estadio macular. C) estadio placa. D) estadio tumoral. E) MF en transformación a linfoma T de células grandes.

El desarrollo de nódulos grandes y frecuentemente ulcerados en un paciente con lesiones de MF en placa puede deberse a la evolución hacia una MF tumoral (MF-T) o hacia una MF-TR, motivo por el cual se requiere siempre un estudio histológico para diferenciarlas. La transformación de la MF suele ocurrir en fases avanzadas de la enfermedad (estadio IIB o superior), y se define como la presencia de células grandes pleomórficas que representan más del 25% de la población linfoide patológica (Diamandidou et al, 1998; Arulogun et al, 2008). La misma está usualmente asociada con un curso clínico agresivo y pobre supervivencia, requiriendo terapéutica agresiva (Kempf et al, 2014). En casos avanzados puede observarse compromiso de ganglios linfáticos y diferentes órganos (Ralfkiaer et al, 2008a; Herrmann and Hughey, 2012).



Las células neoplásicas en MF presentan un **perfil inmunofenotípico** de célula linfoide madura Th de memoria (CD2+, CD3+, BetaF1+, CD5+, CD4+, CD8-, CD28+, TCR Beta+, CD45RO+) con alguna aberración fenotípica por la ausencia de marcadores de célula T madura como pueden ser CD7, CD2 o CD5 (Figura 3) (Ralfkiaer et al, 2008a). En las lesiones avanzadas, un porcentaje de estas células puede presentar positividad para las proteínas asociadas a los gránulos citotóxicos (Ralfkiaer et al, 2008a). Asimismo, se han descrito fenotipos raros, pero sin impacto pronóstico (Massone et al, 2008). En ocasiones los linfocitos neoplásicos pueden expresar el antígeno CD30, estando demostrado que tanto su expresión como el alto índice de proliferación (Ki-67) en estadios tempranos están asociados a progresión y transformación (Edinger et al, 2009).



**Figura 3.** Perfil inmunohistoquímico de micosis fungoide (MF). Linfocitos neoplásicos expresando: A) CD3+; B) CD4+. C) Biopsias de MF mostrando células atípicas CD30+ con D) índice de proliferación (Ki-67) incrementado.

Los **estudios moleculares** han permitido detectar el reordenamiento monoclonal del TCR en un 50-70% de las MF en estadios macular y de placa, y en más del 80% de las MF-T y SS (Cordel et al, 2005; Goedel et al, 2010).

En cuanto a la **evolución clínica**, el pronóstico de los pacientes con MF está condicionado por la edad y principalmente, por el grado de afectación cutánea al diagnóstico y la presencia de enfermedad extracutánea (Ralfkiaer et al, 2008a). La supervivencia específica de enfermedad a los 10 años es del 98% para los pacientes con enfermedad localizada en máculas o placas, 83% para aquellos con enfermedad generalizada, 42% con MF-T y 20% para aquellos con afectación ganglionar confirmada histológicamente (Ralfkiaer et al, 2008a).

#### **1.1.1.2. Variantes de MF**

Si bien la MF exhibe un amplio espectro de variantes clínicas, histológicas e inmunofenotípicas, la clasificación de la OMS sólo considera las variantes foliculotropa (MF-F), reticulosis pagetoide y granulomatosa/piel laxa granulomatosa, por su comportamiento clínico y sus características clínico-histológicas diferenciadas (Willemze et al, 2005; Ralfkiaer et al, 2008a). Particularmente, la MF-F se presenta como máculas y placas, y ocasionalmente como pápulas acneiformes, que predominan en cabeza y cuello, con frecuencia pruriginosas y asociadas con alopecia (Figura 4) (Kempf et al, 2014). También pueden aparecer placas infiltradas y tumores (Gerami et al, 2008; Lehman et al, 2010; Muniesa et al, 2010). Histológicamente el 40-60% de esta variante no presenta el epidermotropismo interfolicular típico de la MF clásica, observándose mucinosis folicular en alrededor del 70% de estos casos (Lehman et al, 2010) (Figura 4). En contraste con la MF clásica, la tasa de supervivencia a 5 años en la MF-F es mucho más baja, llegando al 41% (van Doorn et al, 2002; Kempf et al, 2008).



**Figura 4.** MF-F con alopecia. A) Visión macroscópica. B) Visión microscópica.

### 1.1.2. Síndrome de Sézary (SS)

El SS es definido por la OMS por la triada: a) eritrodermia (confluencia de lesiones eritematosas que cubren al menos el 80% de la superficie corporal total), b) linfadenopatías generalizadas, y c) la presencia de células T neoplásicas clonalmente relacionadas de núcleos cerebriformes (células de Sézary), distribuidas en la piel, ganglios linfáticos y sangre periférica. Esta entidad representa el 3% de todos los LCP (Willemze et al, 2005); afecta principalmente a varones adultos por encima de los 60 años, encontrándose asociada a un incremento de neoplasias secundarias, cutáneas y sistémicas (Kempf et al, 2014). Su **inmunofenotipo** típico es: CD2+, CD3+, CD5+, CD4+, TCR Beta+, y la mayor parte expresan PD-1 (*Programmed cell death protein-1*) (Cetinozman et al, 2012). La expresión de CD8 es rara, y característicamente carecen de CD7 y CD26 (Narducci et al, 2006).

Los **estudios moleculares** han mostrado rearrreglo clonal de los TCRs. Actualmente se considera que el SS y la MF son dos entidades diferentes, originadas a partir de distintos subgrupos de linfocitos T (van Doorn et al, 2009). Las células T en SS expresan las moléculas CCR7, L-selectina y CD27, fenotipo que corresponde a linfocitos T de memoria central. En cambio las de MF carecen de estos marcadores pero expresan fuertemente CCR4 y CLA, fenotipo sugestivo de linfocitos T de memoria efectora, residentes en la piel (Campbell et al, 2010). A diferencia de la MF, el SS conlleva un pronóstico desfavorable

con una media de supervivencia menor a 3 años (Caudron et al, 2012). La principal causa de fallecimiento son las infecciones oportunistas relacionadas a la inmunosupresión (Russell-Jones and Whittaker, 2000). Los factores pronósticos incluyen el grado de afectación de los ganglios linfáticos y de la sangre periférica (Ralfkiaer et al, 2008b).

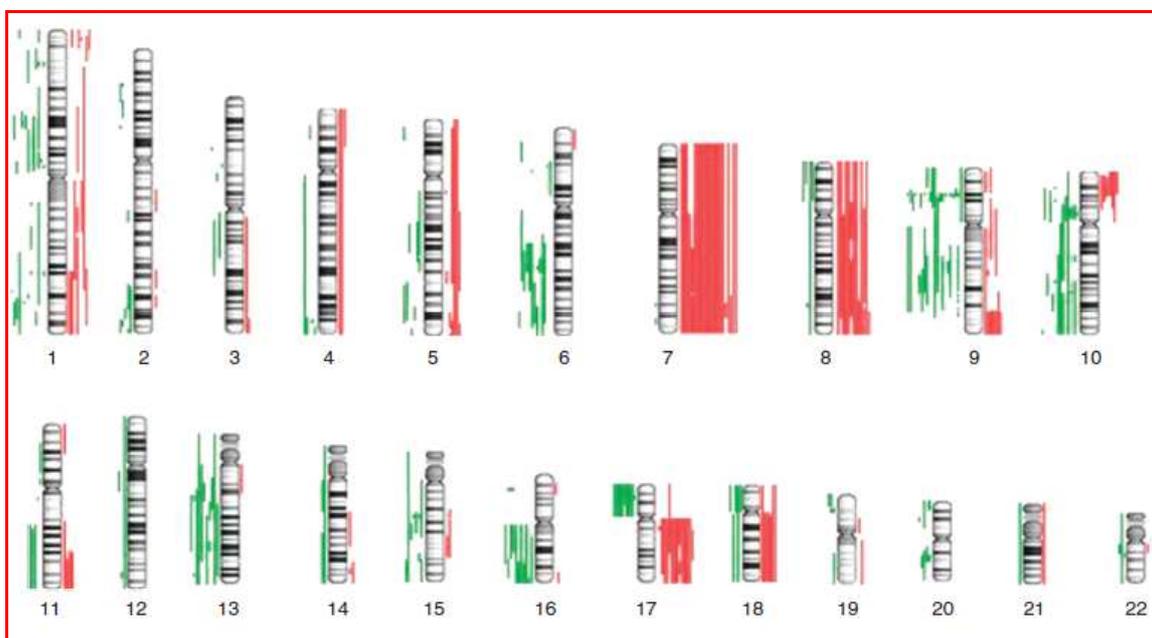
## **1.2. Estudios citogenéticos y citomoleculares en neoplasias linfoides**

El análisis de las alteraciones genéticas (AG) en las neoplasias linfoides ha contribuido a la identificación de genes involucrados en la iniciación y progresión de estas entidades y constituye una de las herramientas más útiles para su caracterización biológica. Estas alteraciones pueden subdividirse en primarias y secundarias. Las **anomalías primarias** se encuentran frecuentemente como cambios cariotípicos únicos asociados a tumores específicos, y su denominación se refiere no sólo al hecho de ser la primera aberración observada en estas células, sino que también reflejan un rol causal en la tumorigénesis y el establecimiento de la patología. En cambio, las **alteraciones secundarias**, como su nombre lo indica, no se encuentran solas y se desarrollan en células que poseen una alteración primaria previa. Aunque son menos específicas, no se producen al azar, presentan un perfil de especificidad relativa para cada tipo de tumor y se considera que otorgan ventajas selectivas y proliferativas a las células neoplásicas. El espectro de estas alteraciones es complejo e incluye una amplia variedad de ganancias, pérdidas y rearrreglos cromosómicos que involucran diferentes regiones del genoma y que implican la expresión diferencial de genes con probable significado clínico, cuyo análisis podría contribuir a definir formas estables o progresivas de estas entidades, fundamentalmente en estadios tempranos de las mismas (Beá and Campo, 2008). Asimismo, en la mayoría de los subtipos histológicos de las neoplasias linfoides, el aumento en el número de alteraciones secundarias se encuentra asociado al pronóstico de la enfermedad, sustentando el valor de las mismas en la evolución tumoral (Salaverría et al, 2007).

### **1.2.1. Estudios citogenéticos y citomoleculares en LCCT**

Los estudios citogenéticos en LCCT, se han visto limitados por el bajo índice de replicación de las células neoplásicas *in vitro*, así como por la dificultad de generar líneas

celulares, situación que ha determinado la escasa información al respecto. No obstante, en MF el empleo de las técnicas de citogenética convencional ha permitido identificar cromosomas y puntos de ruptura involucrados en esta patología, aunque sin observarse ninguna alteración específica (Mao et al, 2002; Fischer et al, 2004; Prochazkova et al, 2007) (Figura 5). Esta amplia variación de anomalías ha sido relacionada a inestabilidad genética, asociada a progresión y transformación tumoral.



**Figura 5.** Idiograma de la técnica de CGH indicando pérdidas (líneas verdes) y ganancias (líneas rojas) en una serie de pacientes con MF. Se detectaron con mayor frecuencia las pérdidas en los cromosomas 6, 9, 10, 13 y 16 así como las ganancias en 7, 8, 17 y 18 (Salgado et al, 2010).

La mayor parte de los estudios citogenéticos se basaron en el análisis de cultivos de linfocitos de sangre periférica de pacientes con SS o MF en estadios avanzados (Thangavelu et al, 1997; Karenko et al, 1999). Los estudios realizados en material de biopsia cutánea por lo general presentan escaso desarrollo, pudiendo estar contaminados con queratinocitos, fibroblastos o linfocitos reactivos, siendo difícil conseguir metafases de buena calidad (Scarbrick et al, 2001). La información de la literatura muestra como más frecuentemente implicados los cromosomas: 13 (48%), 14q y 9p (38%), 2p y 8 (32%), 1p y

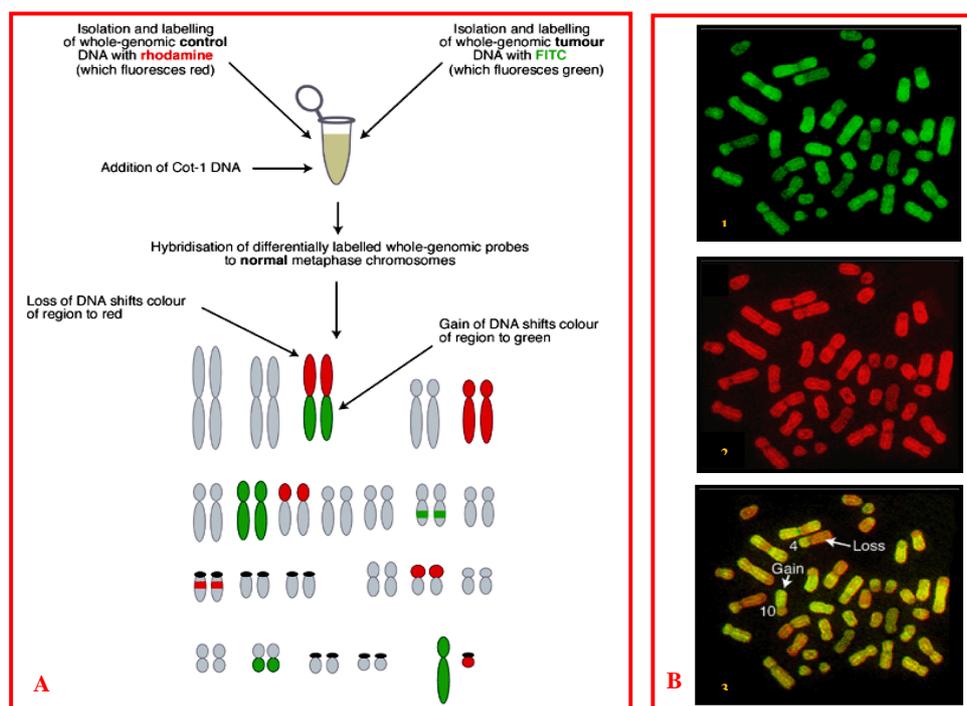
6q (30%), 10q y 17p (28%), 11 (25%), 7 (22%), y 4 (20%), siendo más comunes las ganancias de material genético (Nowell et al, 1982; Whang-Peng et al, 1982; Limon et al, 1995; Thangavelu et al, 1997; Karenko et al, 1997; Mao et al, 2003). En la Tabla 4 se detallan los cromosomas más involucrados en las diferentes series publicadas.

**Tabla 4.** Frecuencia de aberraciones citogenéticas en pacientes con MF/SS.

Referencia	No. de casos	Patología estudiada	% de AC	Cromosomas No. (%)								
				1	2	6	8	9	10	13	14	17
Nowell et al (1982)	15	MF/SS	67	-	-	-	-	60	-	-	-	-
Whang-Peng et al (1982)	41	MF/SS	62	24	-	22	-	20	-	-	-	-
Limon et al (1995)	56	SS	100	43	43	38	-	20	32	21	27	34
Karenko et al (1997)	12	MF/SS	100	-	-	-	-	50	-	75	50	-
Thangavelu et al (1997)	19	MF/SS	53	32	21	-	32	-	26	-	-	26
Mao et al (2003)	28	SS	43	25	-	-	-	-	-	-	-	25

AC: Anomalías cromosómicas; MF: Micosis fungoide; SS: Síndrome de Sézary.

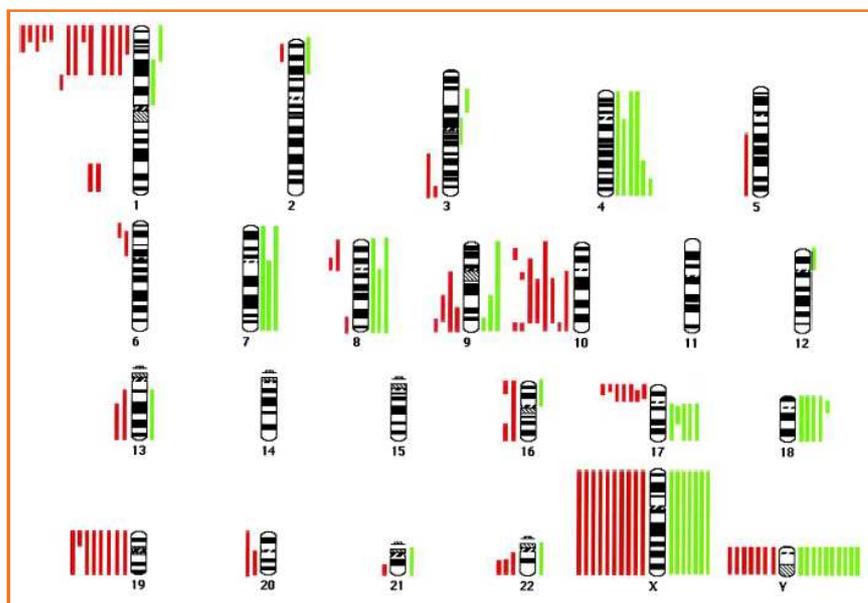
Dadas las dificultades de los estudios citogenéticos, en años recientes se incorporó la técnica de CGH (*Comparative Genomic Hybridization*) al análisis de estas entidades (Mao et al, 2002, 2003; Fischer et al, 2004; Salgado et al, 2010). Esta metodología prescinde del uso de metafases del paciente y se basa en el empleo de ADN tumoral y normal marcados con diferentes fluorocromos en cantidades equimoleculares hibridadas sobre metafases normales, evaluándose las diferencias en intensidad de fluorescencia (Redon et al, 2009). En la Figura 6 se muestran los detalles de la técnica de CGH.



**Figura 6.** A) Bases de la detección del estudio de Hibridación Genómica Comparada, mostrando la pérdida o ganancia de material genético; B) Captura de metafases al microscopio de fluorescencia con los fluorocromos: 1) FITC, y 2) Rodamina. 3) Imagen producida por el software mostrando ganancias y pérdidas de material genético (McNeil et al, 2000).

El empleo de esta metodología que presenta una resolución de 10-20 Mb permitió confirmar como cromosomas más afectados en MF aquellos que ya se habían vislumbrado por citogenética convencional, agregándose algunos más y, fundamentalmente, hizo factible identificar las regiones cromosómicas más comúnmente involucradas. De esta forma, se observaron como más frecuentes las pérdidas de: 1p22, 1p36, 2q36qter, 5q13, 6q, 7p22, 7q11, 9p21, 10p, 10q26qter, 12q24.31, 13q14, 14q32, 16q22, 17p y 18p, y las ganancias de 1q, 3p25, 7q21, 7q36, 8p11, 8p22, 8q24, 9q34qter, 17q, 18, 19p13, 21q22) (Mao et al, 2002, 2006; Karenko et al, 2003; Fischer et al, 2004; Prochazkova et al, 2007; van Doorn et al, 2009; Wong et al, 2011). En cuanto al SS se encontraron como alteraciones más comunes las ganancias de 1p34, 3p25, 3q26, 8p22, 8p11, 8q24, 11q13, 12q13, 15q26, 17q22, 20q13, 20q13, 20q13 y 22q11, y las pérdidas de 8q11, 10q25, 11q13, 11q23, y 17p13 (Mao et al, 2003; Vermeer et al, 2008; van Doorn et al, 2009; Laharanne et

al, 2010b). En la Figura 7 se muestra el idiograma de CGH de una serie de pacientes con MF.



**Figura 7.** Idiograma de la técnica de CGH indicando pérdidas (líneas rojas) y ganancias (líneas verdes) en un paciente con MF. Se detectaron con mayor frecuencia las pérdidas de los cromosomas 1, 9, 10, 17, y 19, así como las ganancias de 4, 7, 8, 17 y 18 (Mao et al, 2002).

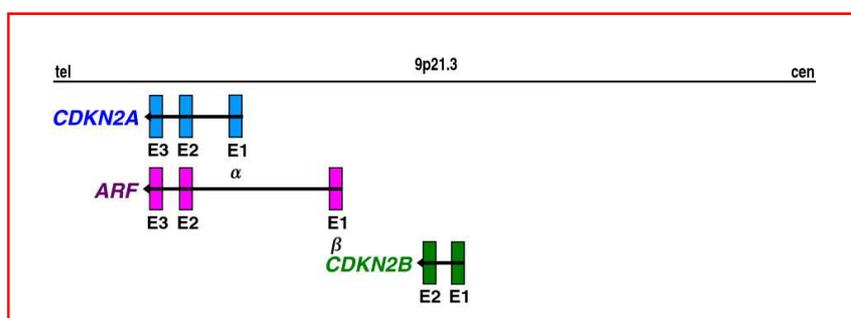
Más recientemente, el empleo de CGH-array permitió aumentar el nivel de resolución, llegando a 1,4 Mb, con lo cual se logró identificar genes con expresión diferencial en esta patología, confirmados por FISH. Entre ellas cabe destacar la delección de 9p21, lugar donde mapea el gen *CDKN2A* (*Cyclin-Dependent Kinase Inhibitor 2a*), así como la ganancia de 8q24 donde se localiza *MYC* (*V-Myc Avian Myelocytomatosis Viral Oncogene Homolog*), la delección de 10q26 y la ganancia de 1q21q22, todas ellas relacionadas a una peor evolución clínica (Mao et al, 2006; Vermeer et al, 2008; Salgado et al, 2010).



## 1.2.2. Genes involucrados en LCCT

### 1.2.2.1. Gen *CDKN2A*

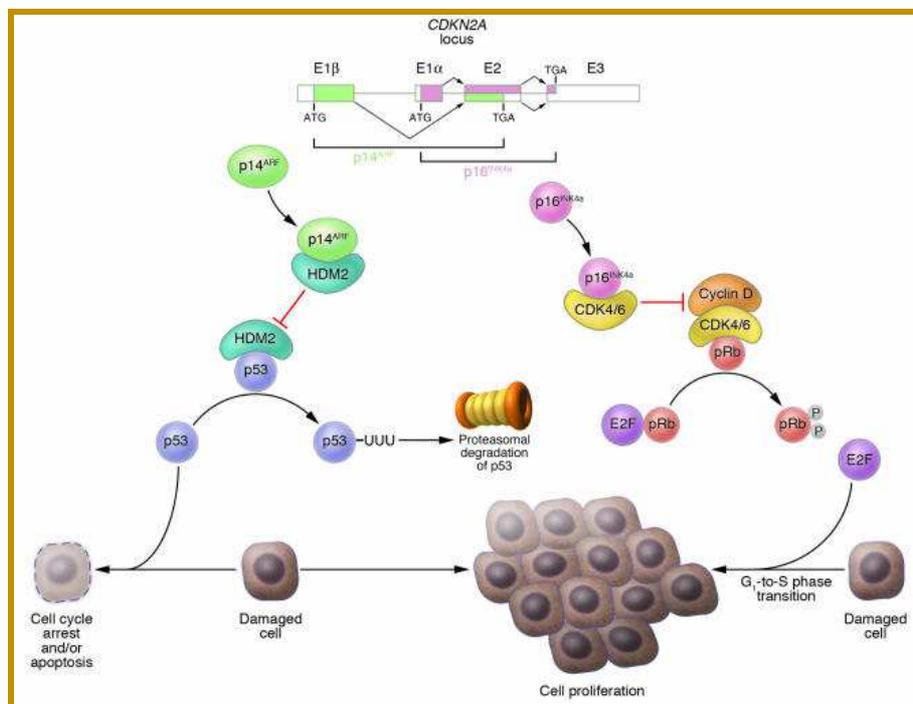
Entre los genes con probable participación en la evolución clínica de los pacientes con MF encontramos *CDKN2A* y *C-MYC*. *CDKN2A* consta de 4 exones, generando diversas variantes de transcritos por *splicing* alternativo que difieren en sus primeros exones (Figura 8). Se han descrito al menos tres variantes que codifican proteínas distintas, dos de las cuales corresponden a isoformas estructuralmente relacionadas que inhiben a la kinasa CDK4. El transcripto remanente incluye un primer exón alterno de 20 kb localizado corriente arriba del gen; el mismo contiene un ARF (*alternative open reading frame*) que codifica una proteína no relacionada estructuralmente a los productos de las otras variantes. Este ARF actúa como un estabilizador de la proteína supresora de tumores p53 interactuando y secuestrando a MDM2, responsable de la degradación de p53. Las isoformas del inhibidor CDK y el producto de ARF comparten funciones comunes en el control del ciclo celular (Ref. Seq. Sep 2012).



**Figura 8.** Diagrama de la estructura del locus *CDKN2A-CDKN2B*. El gen *CDKN2A* codifica las proteínas p16INK4A y p14ARF a través de un marco de lectura alternativo con los exones 1 $\alpha$  y 1 $\beta$  respectivamente; mientras que *CDKN2B* traduce para la proteína p15INK4B (Duro et al, 1995; Laharanne et al, 2010a).

En cuanto a las funciones de *CDKN2A*, cabe destacar su capacidad para inducir el arresto del ciclo celular en sus fases G1 y G2, actuando como un supresor tumoral. El ciclo celular y en especial su progresión G1-S está controlado por las vías p14ARF-mdm2-p53 y las proteínas p16INK4A/p15INK4B-Rb1 (Sharpless y DePinho et al, 1999). Ambas son capaces de inducir el arresto del ciclo celular en la fase G1 al inhibir la actividad catalítica

del complejo kinasas dependientes de ciclinas CDK4-CDK6 y ciclina D, complejo que normalmente interviene en la fosforilación de la proteína Rb (Laharanne et al, 2010a). Adicionalmente participan miembros de la familia de factores de transcripción E2F, que resultan esenciales para la progresión del ciclo celular, siendo su actividad transcripcional inhibida a través de su unión específica con la proteína Rb. La fosforilación de Rb libera a E2F del complejo Rb/E2F, promoviendo de esta forma la progresión del ciclo celular (Chudnovsky et al, 2005). En la Figura 9 se muestra la función de esta región, cuya pérdida determinarí­a la ausencia de inhibición de CDK4-6, produciendo una proliferación celular indefinida o continua.



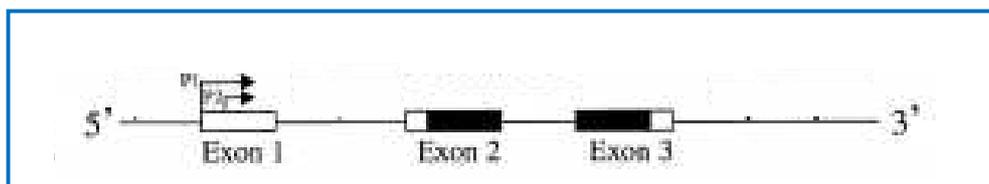
**Figura 9.** Diagrama de las vías involucradas por el locus *CDKN2A* en el ciclo celular (Chudnovsky et al, 2005).

Entre sus otras funciones podemos mencionar la disminución de la represión transcripcional al unirse a BCL6, el bloqueo de la función activadora de la transcripción al ligarse a E2F1 y MYC aunque sin efecto en la represión transcripcional de este último. Asimismo estimula la actividad de TOP1/TOPOI, asociándose a los promotores de los

genes de ARN ribosomal, permitiendo su transcripción y maduración, e interactúa con NPM1/B23 y COMMD1, promoviendo su poliubiquitinación y posterior degradación. También actúa como un regulador negativo de la proliferación de las células normales al ligarse covalentemente con CDK4 y CDK6, lo cual ocasiona una inhibición de su habilidad para interactuar con ciclinas D y fosforilar a la proteína Rb (Chudnovsky et al, 2005).

### 1.2.2.2 Gen *C-MYC*

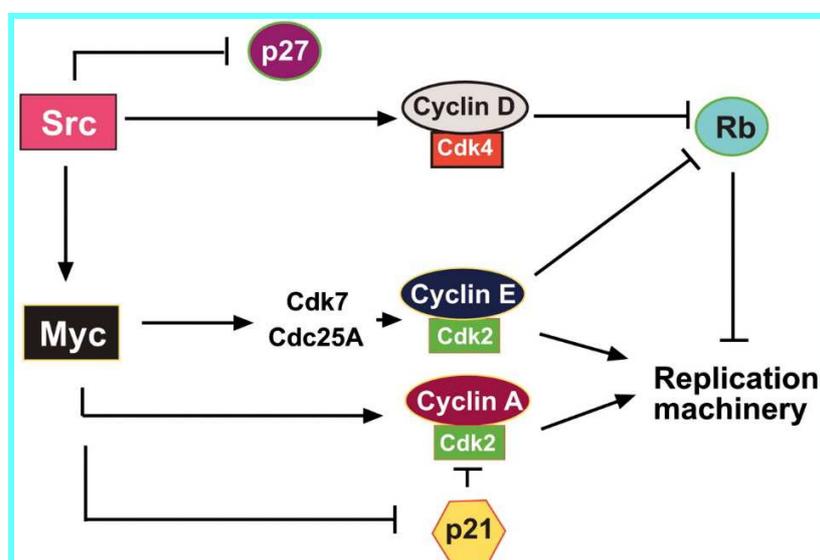
En cuanto al oncogén *MYC*, es un gen pequeño que consta de tres exones (Ref Seq, 2008) de los cuales sólo la región distal del exón 2 y la proximal del exón 3 son transcriptoras (Figura 10). Interviene como un gen pivote tanto en el control del crecimiento, proliferación, replicación, síntesis proteica, diferenciación celular, metabolismo y apoptosis. Su expresión proteica anormal se encuentra asociada con una amplia variedad de tumores (Hoffman et al, 2008), particularmente linfomas no-Hodgkin en los que se encuentra involucrado en translocaciones específicas de valor diagnóstico y/o pronóstico (Ott et al, 2013).



**Figura 10.** Diagrama de la estructura del gen *C-MYC*. Se observan los tres exones que lo constituyen, detallándose en negro las regiones transcriptoras de los exones 2 y 3.

La oncoproteína c-MYC funciona como un factor de transcripción que puede activar o reprimir genes blanco usando diferentes mecanismos que incluyen reclutamiento de acetilasas de histonas, proteínas moduladoras de cromatina, factores de transcripción basales y metiltransferasas de ADN, pudiendo activar la apoptosis por una vía dependiente o no de la proteína p53 (Dang et al, 2006). Además, a nivel estructural esta proteína presenta en su conformación tridimensional el motivo bHLHZip (*basic Helix-Loop-Helix Leucine Zipper*) que forma heterodímeros con otra proteína de estructura semejante,

denominada MAX. La dimerización de MAX provee a MYC de la secuencia específica de unión al ADN, preferentemente a sitios que contengan la secuencia CACGTG, pudiendo unirse a regiones promotoras de ciertos genes para modular su expresión, y así regular el metabolismo energético de la célula (Ott et al, 2013). En la Figura 11 se detalla la participación de la proteína MYC en el ciclo celular, estimulando a los complejos CDK2/Ciclinas A/E para la inhibición de la proteína Rb, la cual normalmente inhibe a su vez la maquinaria replicativa celular, llevando a una estimulación continua de la proliferación celular.



**Figura 11.** Diagrama de algunas de las vías involucradas por el oncogén C-MYC en el ciclo celular. El producto proteico MYC estimula a la ciclina A-Cdk2 y a la ciclina E-Cdk2, que a su vez inducen la replicación celular directamente y a través de la inhibición de la proteína Rb (Prathapam et al, 2006).

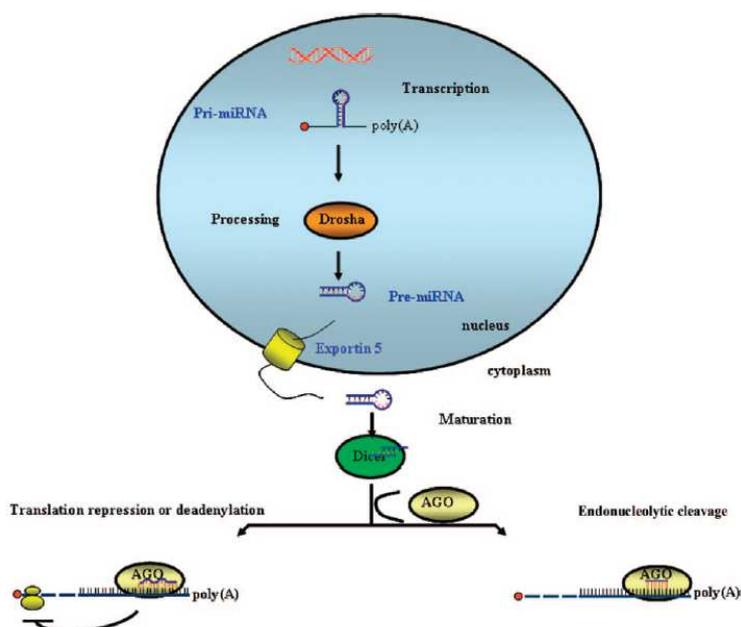
En este contexto, y debido a que ambos genes, *CDKN2A* y *C-MYC*, han sido sugeridos como posibles marcadores pronóstico y predictores de tratamiento (Scarlsbrick et al, 2002; Vermeer et al, 2008; van Doorn et al, 2009; Laharanne et al, 2010a) surge nuestro interés en estudiar sus desbalances en una serie de pacientes con MF en estadios avanzados.

### 1.3. Estudios moleculares en LCCT

#### 1.3.1. MicroRNAs (miRNAs): características generales

Los miRNAs o miRs son pequeñas moléculas de ARN no codificante constituidas por 19-23 nucleótidos que actúan regulando la expresión génica. Los mismos están altamente conservados a lo largo de la evolución, y se encuentran involucrados en una variedad de procesos biológicos incluyendo diferenciación, proliferación, apoptosis y respuesta al estrés (Iorio and Croce, 2009). En humanos, hasta un 30% de los genes son regulados por miRNAs, y al presente se han descrito más de 1000 miRNAs (Calin et al, 2004; Munker and Calin, 2011). Si bien se encuentran localizados a lo largo de todo el genoma, alrededor del 50% se ubica en regiones cromosómicas asociadas al desarrollo neoplásico (Zhang et al, 2007).

En cuanto a su biogénesis (Figura 12), este proceso se inicia con la síntesis a través de la ARN polimerasa II de los transcritos microRNA primarios (pri-miRNAs), estructuras que tienen más de 1 kb de longitud y que se pliegan con forma de horquilla para su interacción con las endonucleasas. Estos transcritos se originan tanto en genes independientes como en intrones de genes codificantes, y se procesan de manera similar a los ARNs que codifican proteínas. Una vez plegados los pri-miRNAs son separados por un complejo proteico de 500-650 kDa que consiste en *Drosha*, una endonucleasa ARNasa tipo III, junto con un cofactor esencial DGCR8/Pasha (proteína que contiene 2 dominios de unión ARN de doble cadena) creando estructuras similares a horquillas de 60-70 nucleótidos llamados pre-miRNAs (Visone and Croce, 2009).



**Figura 12.** Biogénesis de miRNAs y ensamblaje en complejos proteicos (Visone and Croce, 2009).

Los pre-miRNAs son luego transportados al citoplasma por la Exportina-5 (Exp5). Allí, son procesados a un dúplex miRNA de doble hebra/miRNA (miRNA\*/miRNA) por intermedio de la proteína Dicer (una endonucleasa ARNasa III) y por TARBP (proteína TAR ligadora de ARN de HIV-1) (Davidson-Moncada et al, 2010). Finalmente el dúplex es desenrollado por una helicasa, una de sus hebras se vuelve activa y actúa como miRNA maduro, mientras que la otra (miRNA\*) es por lo general liberada y degradada. Estos miRNAs maduros son asimétricamente incorporados en el complejo RISC (*RNA-induced silencing complex*) y llevados por éste hacia la porción 3'-UTR del ARNm blanco donde regulan la expresión génica (Zhang et al, 2007; Carissimi et al, 2009; Munker and Calin, 2011). Asimismo, proteínas argonautas (de la familia AGO) interactúan directamente con los miRNAs, y las proteínas GW182, que actúan como factores claves en esta represión, y participan en el ensamblaje y funcionamiento de los RISCs (Munker and Calin, 2011). La eficiencia de la unión requiere un apareamiento continuo de 2-8 nucleótidos de miRNA (Krol et al, 2010).

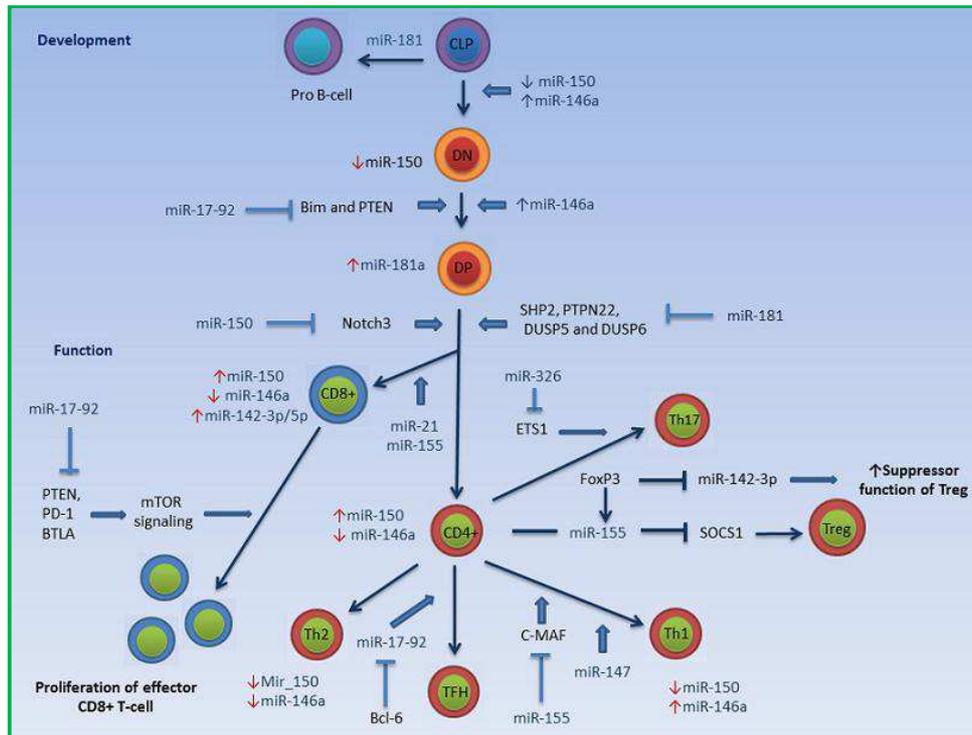
En cuanto a su funcionamiento, los miRNAs controlan la expresión génica al desestabilizar la transcripción e inhibir la degradación del ARNm y su traducción a través

---

del apareamiento de las secuencias de base del miRNA (generalmente en el extremo 5') con sitios en el ARNm parcial o totalmente complementarios, generalmente dentro del extremo 3' (Zhang et al, 2007; Munker and Calin, 2011).

### **1.3.2. Los miRNAs y el desarrollo de los linfocitos T**

Uno de los roles importantes de algunos miRNAs es su participación en la regulación del desarrollo y diferenciación de los linfocitos T, observándose que cada población de linfocitos CD4+ o CD8+ tiene un perfil de miRNA específico (Ghisi et al, 2011; Saki et al, 2015). En la Figura 13 se destaca el mecanismo de acción de los miRNAs en la regulación de la diferenciación de las células T. En el timo este desarrollo está influenciado por el cluster miR-17-92 y miR-181. Este cluster participa en la transición de timocitos doble-negativos a doble-positivos mediante la inhibición de la expresión de PTEN y Bim; mientras que miR-181 juega un rol en la transición de doble-positivos a linfocitos CD4+ o CD8+ inhibiendo la expresión de PTPN22, SHP2 y DUSP5/6. La expresión de miR-146a se incrementa en las células Th1 y disminuye en las Th2, debido a la diferenciación de las células T naïve CD4+. Es interesante destacar la expresión de miR-150, la cual aumenta en la etapa final de la formación de las células T CD8+ y CD4+, reduciéndose después de la diferenciación de las células T naïve CD4+ a los subtipos Th1 y Th2. La proteína Bcl-6 participa en la diferenciación de las células CD4+ a TFH mediante la inhibición de la expresión de miR-17-92. Por otro lado, el miR-155 inhibe a SOCS1 y c-MAF provocando la diferenciación de células naïve CD4+ a linfocitos T reguladores (Treg) y Th1, respectivamente. El cluster miR-17-92 incrementa su expresión al entrar en contacto con su antígeno mediado por las células T naïve CD8+, lo que lleva a la proliferación de las células efectoras CD8+ a través de la inhibición de la expresión de PTEN, PD-1 y BTLA (Saki et al, 2015).



**Figura 13.** Participación de los microRNAs en la regulación del desarrollo y diferenciación de los linfocitos T (Saki et al, 2015).

### 1.3.3. Los miRNAs y el cáncer

La mayoría de las neoplasias humanas presentan desregulación de miRNAs (Visone and Croce, 2009; Maj et al, 2012), habiéndose observado que los mismos se encuentran frecuentemente localizados a nivel de sitios frágiles, en regiones de pérdida de la heterocigosidad y de amplificación (mínimos amplicones), o en puntos de ruptura asociados a cáncer (Calin et al, 2004). En este contexto, el análisis de sus perfiles de expresión podría predecir el estado de la enfermedad y la evolución clínica, así como la progresión tumoral y respuesta terapéutica (Garzon et al, 2009).

Diferentes mecanismos pueden alterar la expresión de miRNA en el cáncer humano, incluyendo anomalías cromosómicas, cambios epigenéticos, mutaciones y polimorfismos, así como defectos en la maquinaria de su biogénesis, siendo capaces de afectar la



---

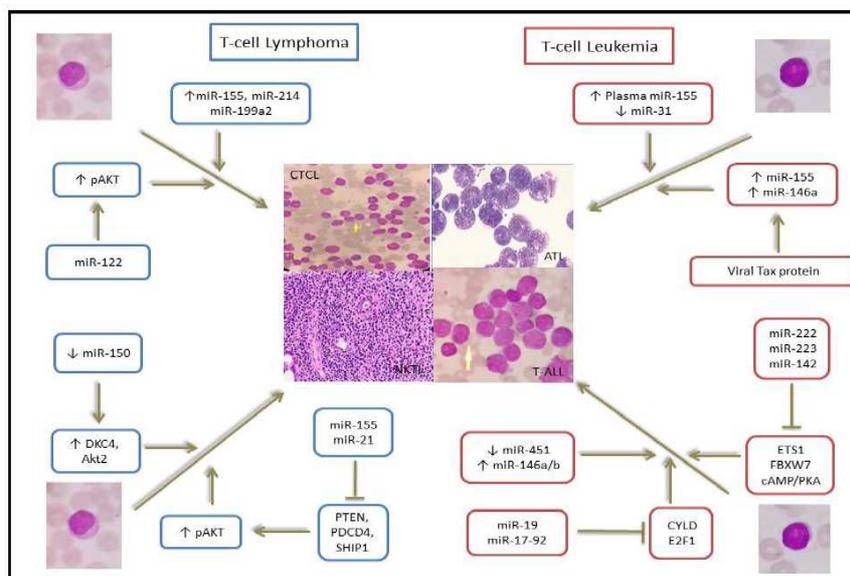
expresión de genes y las vías oncogénicas desde su inicio hasta la metástasis (Visone and Croce, 2009).

### 1.3.3.1. Los microRNAs en las neoplasias linfoides a células T

Diferentes trabajos analizan el valor de los perfiles de expresión génica en los distintos tipos de leucemias y linfomas (Lenz et al, 2008; Iqbal et al, 2009; Saki et al, 2015). Al presente, se han identificado perfiles de miRNA en leucemia linfoblástica aguda (LLA), leucemia linfocítica crónica, LLA de células B precursoras en la infancia, linfomas de Hodgkin y no-Hodgkin (Malumbres et al, 2009; Navarro et al, 2008, 2009; Robertus et al, 2010).

En LLA, se ha reportado que la disminución de la expresión de los miRNAs -151, -451 y el aumento de miR-424, -148 y -146a/b están relacionadas al fenotipo T (Fulci et al, 2009). Los miR-222, -223 y -142 actuarían como supresores tumorales, participando en la génesis de esta leucemia mediante la represión de la ligasa de ubiquitina FBXW7 (*F-box/WD repeat-containing protein 7*), ETS1 y cAMP/PKA, en tanto que miR-19 y miR-17-92 actuarían inhibiendo a CYLD y al factor de elongación E2F1 (Mansour et al, 2013).

Por otro lado se ha visto que en la leucemia de células T del adulto (LTA) hay una disminución de la expresión de miR-31 sumado a una sobreexpresión de miR-155 y miR-146a, estas últimas debido al estímulo de la proteína viral transactivadora Tax (origen HTLV-1), que resultaría en la activación de la vía NF- $\kappa$ B con el aumento de la proliferación celular y reducción de la apoptosis (Tomita et al, 2012). En otros trabajos (Bellon et al, 2009) se detectó una disminución de miR-181a, -132, -125a y -146b, y una sobreexpresión de los niveles de miR-150, -155, -223, -142-3p, y -142-5p, en células de LTA infectadas por HTLV-1, sugiriéndose que cumplirían un rol en su desarrollo (Saki et al, 2015) (Figura 14).



**Figura 14.** Participación de los microRNAs en las leucemias y linfomas de células T (Saki et al, 2015).

Por otra parte, en los linfomas T/NK se detectó relación entre la activación de *MYC* y la disminución de los niveles de miR-30b, -101, -26a/-b y -363, con incremento de sus proteínas blanco MUM1, Blimp-1 y STMN1 (Ng et al, 2011). De igual manera, se ha reportado que la expresión de miR-21 y miR-155 estarían aumentadas y la de miR-150 disminuida en líneas celulares de linfomas NK con respecto a las células NK normales. El incremento de las primeras inhibe la vía de PTEN, PDCD4 y SHIP1, en tanto que la disminución de los niveles de miR-150 aumenta las de DKC4 y Akt2 (Watanabe et al, 2011; Saki et al, 2015).

En el caso de las patologías cutáneas a células T, se han detectado perfiles de expresión de miRNAs capaces de distinguir dermatosis inflamatorias de neoplasias linfoides cutáneas (Lujambio et al, 2012; Ceribelli et al, 2012). Particularmente se observaron alteraciones del miR-150, cuya sobreexpresión se encontró asociada a estadios avanzados con extenso compromiso ganglionar y visceral (Mishra and Garzon, 2014). Otros miRNAs descriptos son miR-122, -199a2, -214, -326, -663b y -711 con expresión incrementada, y miR-203 y -205 con niveles disminuidos (Ralfkiaer et al, 2011; van Kester

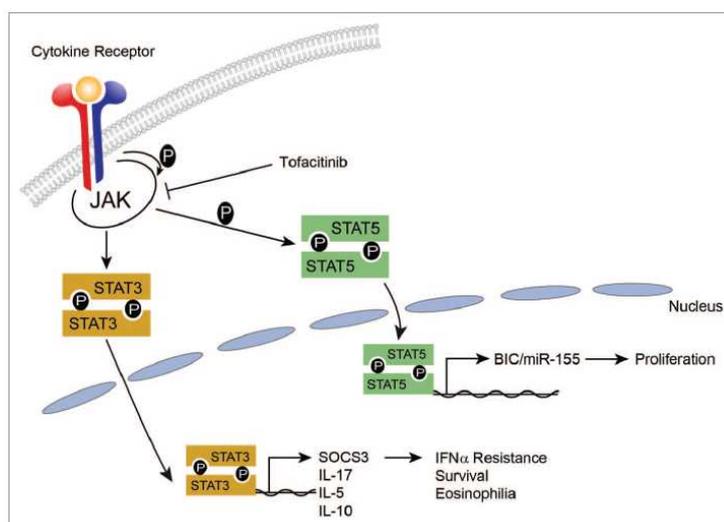
et al, 2011; Manfè et al, 2012). Con respecto a MF, se detectó sobreexpresión de miR-122, que regula la apoptosis a través del incremento de pAKT, y se relaciona a un peor pronóstico en enfermedad avanzada (Manfè et al, 2012). En tanto que en SS, se observó desregulación de los miR-21, -199a2, -214, -342, -486, asociados a supervivencia celular y resistencia a apoptosis (Ballabio et al, 2010; Qin et al, 2012; Narducci et al, 2011).

#### 1.3.4. MicroRNA-155

El primer ejemplo directo de un miRNA que cumple un rol oncogénico (oncomir) es el miR-155, codificado en el gen *MIR155HG* (también conocido como *BIC –B cell integration cluster-*), localizado en la región cromosómica 21q21.2, y cuya sobreexpresión ha sido vinculada a varios tipos de tumores sólidos y hematológicos como linfomas de Hodgkin y Burkitt (Eis et al, 2005; Narducci et al, 2011). Estudios en ratones transgénicos con sobreexpresión de miR-155 en los linfocitos B, demostraron el desarrollo de una enfermedad linfoproliferativa preleucémica que progresó a leucemia de células B y a linfoma de alto grado, sugiriendo que la desregulación de este gen puede ser un evento temprano en la oncogénesis, promoviendo la inestabilidad genómica, la proliferación y la supervivencia de las células malignas (Persson, 2013).

Como se mencionó previamente, el miRNA-155 está involucrado en la regulación del desarrollo del linaje de células T a través de *C-MAF*, y causa diferenciación de las células T a células Th1 al inhibir la vía de IFN-  $\gamma$  (Baltimore et al, 2008; Banerjee et al, 2010). También se ha reportado su participación en la diferenciación y respuesta antiviral de los linfocitos T CD8+ (Salaun et al, 2011; Gracias et al, 2013). Actualmente está siendo considerada como una molécula puente entre los procesos inflamatorios y el cáncer (Persson. 2013). No obstante, poco se conoce acerca de la modulación de miR-155 en respuesta a citoquinas, habiéndose reportado que *MIR155HG* es un blanco transcripcional de STAT5, factor de transcripción relacionado con la carcinogénesis (Kopp et al, 2013). La expresión de miR-155 es constitutiva en condiciones normales en un gran número de Tregs, pero sus niveles llamativamente se incrementan en respuesta a estímulos inflamatorios tales como TLR-ligando y citoquinas proinflamatorias (Baltimore et al, 2008; Lu et al, 2010).

Una de las proteínas involucradas que inducen su sobreexpresión es FoxP3, quien a través de la vía IL-2, STAT5 e IFN- $\gamma$  causan un incremento de la proliferación de los Tregs, resultando esencial en la diferenciación, homeostasis y función de este tipo de linfocitos (Tsitsiou and Lindsay, 2009; Lu et al, 2010; Kopp et al, 2013). Particularmente STAT5 regula la sobreexpresión del complejo BIC/miR-155 que promovería la proliferación de las células T neoplásicas así como la de los linfocitos reactivos (Kopp et al, 2013) (Figura 15).



**Figura 15.** Vía de señalización miR-155/JAK/STAT5 (Kopp et al, 2013).

La evidencia al momento muestra que miR-155 actúa como un oncogén que se sobreexpresa en varios tumores sólidos y en linfomas B (Eis et al, 2005; Kluiver et al, 2005; Fulci et al, 2007; O'Connell et al, 2008; Garzon et al, 2009; Lujambio and Lowe, 2012), siendo escasa la información en linfomas de células T y en particular en MF (Ballabio et al, 2010; Van Kester et al, 2011; Ralfkiaer et al, 2011; Maj et al, 2012).

En este contexto, nuestro interés es evaluar la presencia de desbalances genómicos, así como las modificaciones en la expresión de miR-155 y su nivel de interacción en pacientes con MF.

## ***Objetivos***

## 2. OBJETIVOS

Teniendo en cuenta lo anteriormente detallado, el **objetivo general** del presente trabajo se encuentra orientado a la identificación de marcadores genéticos asociados al desarrollo y progresión de la MF, siendo sus **objetivos específicos**:

- Efectuar la caracterización histopatológica de las muestras de pacientes con MF.
- Evaluar la presencia de desbalances genómicos a nivel de 9p21 y 8q24 en esta patología mediante FISH, tendiente a determinar su rol en la progresión de la enfermedad.
- Cuantificar la expresión diferencial del miR-155 en pacientes con diferentes estadios de MF mediante PCR cuantitativa, y establecer su asociación con los rearrreglos genómicos.
- Correlacionar estos hallazgos con los parámetros clínicos, morfológicos y evolutivos de los pacientes, a fin de definir su valor predictivo y significado clínico, contribuyendo a una mejor caracterización biológica de la patología.

# ***Materiales y Métodos***

### 3. MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.1. Población estudiada

En el presente estudio se evaluó un total de 36 muestras de pacientes con MF: 16 MF-T, 13 MF-TR, y 7 MF-F. Simultáneamente, se estudiaron 5 ganglios reactivos y 10 dermatitis inflamatorias de tipo eczema y/o con patrón liquenoide como población control. La mediana de seguimiento fue de 72 meses (rango: 12-156 meses); 7 pacientes fallecieron debido a la enfermedad, uno murió por causa no relacionada, y 28 pacientes continúan vivos. Trece casos con MF-T (48%) presentaron transformación histológica. En la Tabla 5 se detalla la distribución por edad, sexo y estadios clínicos de la población estudiada.

*Tabla 5. Características de los pacientes con MF estudiados*

Nº de pacientes	Edad media (años) (rango)	Género		MF-T	MF-F	MF-TR	Estadio clínico (%)			
		M	F				IIB	IIIA	IVA	IVB
36	62.5 (31-82)	26	10	16	7	13	30 (83,3)	1 (2,7)	2 (5,5)	3 (8,3)

M: masculino; F: femenino; MF: micosis fungoide; MF-T: MF estadio tumoral; MF-F: MF foliculotrópica; MF-TR: MF en transformación.

Las muestras cutáneas tanto frescas como provenientes de tacos de parafina fueron remitidas por los Servicios de Patología del Instituto de Investigaciones Hematológicas (IIHEMA) e Instituto de Estudios Oncológicos (IEO), Academia Nacional de Medicina; del Hospital General de Agudos “Dr. Cosme Argerich”, y de FUNDALEU. El estudio fue aprobado por el Comité de Docencia e Investigación del Instituto de Medicina Experimental, CONICET-Academia Nacional de Medicina, y el Comité de Ética de los Institutos de la Academia Nacional de Medicina. Las muestras fueron obtenidas por el médico dermatólogo previa conformidad y consentimiento informado de los pacientes. De las muestras fijadas en formol e incluidas en parafina se realizaron cortes sobre vidrios comunes y silanizados para técnicas tintoriales de rutina, inmunohistoquímica y FISH; además se cortaron secciones (10 µm) para el estudio molecular.



Para la definición de las variables se tomaron en cuenta los siguientes criterios: la **extensión o focalidad** de las lesiones se clasificó en tres categorías: a) Solitaria (compromiso cutáneo unilesional); b) Localizada (lesiones múltiples pero limitadas a una región corporal o 2 contiguas); c) Multifocal (lesiones múltiples que involucran al menos 2 regiones corporales no contiguas). La **respuesta al tratamiento** fue considerada completa cuando se observó la desaparición clínica e histológica de las lesiones; parcial, a una disminución  $\geq 50\%$  en el número y tamaño de las mismas; y falta de respuesta/enfermedad progresiva, a la aparición de nuevas lesiones que representaban al menos el 25% de las preexistentes y/o al no cumplimiento con las definiciones de las otras categorías. La **recaída** fue dividida en dos categorías: cutánea, sólo compromiso de piel, o sistémica, con compromiso de otros órganos como ganglios linfáticos, sangre, etc.

### **3.2. Metodología**

#### **3.2.1. Fijación de la muestra e inclusión en parafina:**

##### **Materiales, reactivos y soluciones empleadas:**

- Formol 40% (Patho-Lab, Argentina)
- Fosfato de Sodio dibásico (Anhidro) (Biopack, Argentina)
- Fosfato de Sodio monobásico (Anhidro) (Biopack, Argentina)
- Alcohol 100% (Cicarelli, Argentina)
- Alcohol 96% (Sanicol, Argentina)
- Xileno (Cicarelli, Argentina)
- Parafina PF 56-58°C Pellets (Biopack, Argentina)
- (3-Aminopropyl) Triethoxysilane (Sigma-Aldrich, St Louis USA)
- Acetona (Cicarelli, Argentina)
- Portaobjetos esmerilados (Patho-glass)

**Formol 10% buffer:** Se coloca 1 parte de Formol 40% junto con 9 partes de agua destilada; luego, para llevar a pH se adicionan 4 g de Fosfato de Sodio Monobásico y 6,5 g de Fosfato de Sodio Dibásico.

**Procedimiento:**

Las muestras de tejido fresco son introducidas en cápsulas plásticas y fijadas en formol tamponado 10% dejando un tiempo de acción de 8 a 24 horas. Posteriormente se procesan en el sistema automático “Histoquinette” (Shandon, Citadel 2000- Thermo Scientific), el cual sigue los siguientes pasos:

Formol- 1 hora

Alcohol 96% - 1 hora (2 veces)

Alcohol 100% - 1 hora (3 veces)

Xileno - 1,5 horas (2 veces)

Parafina - 2 horas (2 veces)

Luego se colocan en estufa de cultivo (FAC, Argentina) a 60°C por 15 minutos, procediéndose a incluirlas en parafina caliente (60°C). Finalmente se dejan en freezer de -20°C por 30 minutos para que la parafina endurezca y se formen los tacos. Los mismos son cortados en micrótopo (Modelo RM2125 RTS, Leica), fijando las secciones histológicas (3 micras de espesor) sobre portaobjetos, previo pasaje por agua caliente para extender el corte, y por agua fría para su adhesión. Se dejan reposar en estufa de cultivo a 60°C mínimo 30 minutos antes de proceder a su coloración.

**3.3. Técnicas de tinción**

**3.3.1. Hematoxilina & Eosina (H&E):**

**Materiales, reactivos y soluciones empleados:**

- Hematoxilina activada (Biopur, Argentina)
- Eosina solución acuosa al 0,5% P/V (Biopur, Argentina)
- Bálsamo de Canadá sintético (Biopack, Argentina).
- Cubreobjetos 24 x 40 mm (Patho glass, Argentina).

**Procedimiento:**

Acorde al protocolo asistencial para diagnóstico, se colocan los portaobjetos durante 10 minutos en xileno (2 pasajes), seguido de pasajes por alcoholes descendentes 100% y 96% (2 veces cada uno). Se lavan con agua corriente y se sumergen en Hematoxilina por 2 minutos; se deja virar con agua corriente unos 30 segundos y se sumerge luego en Eosina durante 30 segundos a 1 minuto. Se realizan pasajes por alcoholes crecientes 96% (3 veces) y 100% (2 veces) hasta llegar al xileno (2 pasajes), luego se coloca el cubreobjetos con Bálsamo de Canadá.

**3.3.2. Inmunohistoquímica:**

**Materiales, reactivos y soluciones empleadas:**

- Anticuerpos primarios: CD45RO, CD20, CD3, CD7, CD8, CD30 y Ki-67 (Dako, St Louis, USA); CD56 y Granzima B (BioSB, California, USA); CD2, CD5, CD4 y TIA-1 (CellMarque, California, USA).
- Anticuerpo secundario: Anti-Mouse/Anti-rabbit IgG2a (CytoScan Biotinylated link, Cell Marque)
- Anticuerpo terciario: Peroxidase conjugated streptavidin (CytoScan HRP Label, Cell Marque)
- Carbonato de Litio (Biopack, Argentina)
- Peróxido de Hidrógeno puro 30% p/v (Biopack, Argentina)
- Solución de desenmascaramiento del antígeno pH bajo (6) (Vector, Alemania)
- Solución de desenmascaramiento del antígeno pH alto (8-9) (Vector, Alemania)
- DAB (diaminobenzidina) (Dako, USA)
- Suero Normal (Gibco, Life Technologies)
- Phosphate-Buffered Saline (PBS) 1X (BD FacsFlow, USA)
- Agua oxigenada (Anedra, Argentina)
- (3-Aminopropyl) Triethoxysilane (Sigma Aldrich, China)
- Acetona (Merck, Argentina)

**Soluciones:**

**Suero normal:** Suero fetal bovino 400 µl + PBS 30 mL.

**Solución de DAB:** Se prepara colocando 1 gota del cromógeno DAB (Cell Marque, USA) en 1 cm<sup>3</sup> de DAB buffer (Cell Marque, USA).

**Agua oxigenada 30%:** 30 mL de peróxido de hidrogeno puro y 70 mL de agua destilada (H<sub>2</sub>O<sub>d</sub>).

**Solución de “silane”:** 25 cm<sup>3</sup> de (3-Aminopropyl) Triethoxysilane y 475 cm<sup>3</sup> de Acetona.

Para la realización de la inmunomarcación se utilizan portaobjetos esmerilados silanizados, comprados o silanizados en el Laboratorio, colocando solución de “silane” por 5 minutos, pasajes en acetona y lavado en agua corriente por 5 minutos. Las muestras parafinadas fijadas son sometidas a un proceso de desparafinación e hidratación con los siguientes pasos:

Xileno: 10 minutos (2 pasajes)

Alcohol 96%: 2 pasajes

Alcohol 100%: 2 pasajes

Agua destilada

Posteriormente, se inhibe la peroxidasa endógena dejando los vidrios en solución de agua oxigenada al 30% por 25 minutos, y se lava con agua destilada. Se preparan los sistemas de recuperación antigénica, según sea pH bajo (citrato: pH 6) o alto (Tris Tris HCl: pH 8 y 9), agregando 190 mL de agua destilada y 10 mL de solución de desenmascaramiento del antígeno al pH que corresponda. Se separan los vidrios de acuerdo al pH necesario para el anticuerpo primario que será aplicado, dejándolos por 20-25 minutos en solución recuperadora a los de pH alto y por 45 minutos a los de pH bajo (ambas soluciones deben estar en baño termostático a 100°C). Se deja enfriar a temperatura ambiente durante 15 minutos; se lava con agua destilada y luego con PBS 10X. Se incuba con suero normal (1/100) por 20 minutos, se descarta el sobrante y se incuba con el anticuerpo primario correspondiente (100 µL) a la dilución sugerida por el fabricante, dejando actuar *overnight*.

Al otro día se realizan 2 lavados con PBS 10X, se aplica el anticuerpo secundario dejándolo actuar durante 30 minutos, se lava nuevamente con PBS 10X, y se aplica el anticuerpo terciario durante 30 minutos más. Se efectúa un nuevo lavado en PBS 10X y se procede al revelado con solución de DAB, dejando actuar entre 1 y 5 minutos, dependiendo del anticuerpo aplicado, y controlando la marcación al microscopio óptico. Posteriormente, se lava con agua destilada y se procede a contrastar con H&E por 1 minuto, virando con agua corriente. Luego de ello se sumergen los portaobjetos en carbonato de Litio por 5 minutos, se lavan con agua y se pasan por alcoholes crecientes (96% y 100%) y xileno, 2 pasajes con cada uno de ellos. Finalmente, se procede al montaje de los cubreobjetos con Bálsamo de Canadá, quedando los vidrios listos para su análisis al microscopio óptico.

### **3.3.3 Hibridación in situ con fluorescencia (FISH):**

#### **Materiales, reactivos y soluciones empleadas:**

- Alcohol etílico 100% (Cicarelli, Argentina): diluciones con H<sub>2</sub>O<sub>d</sub> para obtener 70% y 90%.
- Xileno 100% (Biopack, Argentina)
- Citrato de sodio (C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>NA<sub>3</sub>O<sub>7</sub>) (Biopack, Argentina)
- Ácido clorhídrico 1N (HCl) (Cicarelli, Argentina)
- Formamida (Emsure, Merck. Alemania)
- Buffer de hibridación (LiVE-Lexel, Argentina)
- DAPI – ANTIFADE (LiVE-Lexel, Argentina)
- Tween 20 (Biopack, Argentina)
- 20X SSC: se realizan diluciones de 2XSSC.
- PBS 1X (BD FACSFlow).

**Solución de formamida:** 35 mL de formamida 100% más 15 mL de 2X SSC.

**Solución stock de Pepsina 10%:** 0,1 g pepsina/ 1 mL H<sub>2</sub>O<sub>d</sub>; se separa en alícuotas de 35 µL y se mantiene a -20°C hasta el momento de su uso.

**Solución de Lavado 1:** 10mL 2xSSC + 150 µL Tween 20 + 40 mL de agua destilada

**Solución de Lavado 2:** 50mL 2xSSC + 50 µL Tween 20

**Solución de Pepsina:** 75 mL de agua destilada + 700 µL de HCl 1N y 35 µL de Pepsina

## **Procedimiento:**

### **Selección de la muestra**

Se revisaron preparados histológicos teñidos con H&E de pacientes con diagnóstico de MF, seleccionándose los tacos de aquellos casos que presentaban estadios avanzados, con al menos 70% de elementos linfoides neoplásicos.

### **Preparación del corte histológico**

Se realizaron cortes histológicos de 3-4  $\mu\text{m}$  de dichos tacos de parafina y se montaron sobre portaobjetos silanizados (cargados positivamente) para lograr una firme adherencia de la muestra al vidrio.

### **Desparafinación e hidratación del preparado**

Se colocan los portaobjetos en estufa a 60°C entre 1 a 6 horas para deshacer la parafina, seguido de dos pasajes por xilol 100% durante 10 a 15 minutos, para eliminar los restos de parafina. A continuación se hidrata el tejido sumergiendo los vidrios en una serie decreciente de etanoles (100%, 90%, 70%) por 5 minutos cada uno; finalmente se lavan en PBS 1X por 5 minutos, 2 pasajes.

### **Tratamiento con Citrato**

Se introducen los portaobjetos en un coplin con buffer citrato (pH: 6,2) a 95°C (la temperatura debe ser constante), por 25 a 30 minutos, seguido de 30 minutos a temperatura ambiente para que se enfríe paulatinamente, con posterior lavado en PBS 1X durante 5 minutos.

### **Digestión del tejido**

Se sumergen los preparados en un coplin con la solución de pepsina a 37°C durante 10 minutos, controlando el proceso de digestión enzimática al microscopio por contraste de fase hasta lograr la separación celular, dejando distinguible cada núcleo en forma individual. Si no se evidencia progresión, se repite el proceso controlando cada 5 minutos, con un tiempo máximo de 45 minutos, teniendo siempre la precaución de que no se desprendan grupos celulares de la muestra. La digestión se detiene introduciendo los

vidrios en PBS 1X durante 5 minutos a temperatura ambiente. Se realizan dos lavados sucesivos, seguido de 2 a 3 lavados en 2XSSC a temperatura ambiente. Posteriormente se deshidratan los portaobjetos en etanoles crecientes (70%, 90%, 100%) durante 3 minutos cada uno y se dejan secar al aire.

### **Desnaturalización e hibridación**

Se efectúa la desnaturalización de los preparados sumergiéndolos en solución de formamida a 85°C por 5 minutos, seguido de deshidratación en una serie creciente de etanoles fríos (70%, 90%, 100%) durante 2 minutos cada uno y se dejan secar al aire.

### **Preparación de la sonda**

Se mezcla en un tubo Eppendorf a temperatura ambiente:

3,5  $\mu$ L de buffer de hibridación

0,5  $\mu$ L de sonda

1,0  $\mu$ L de agua destilada

---

5  $\mu$ L totales de la mezcla

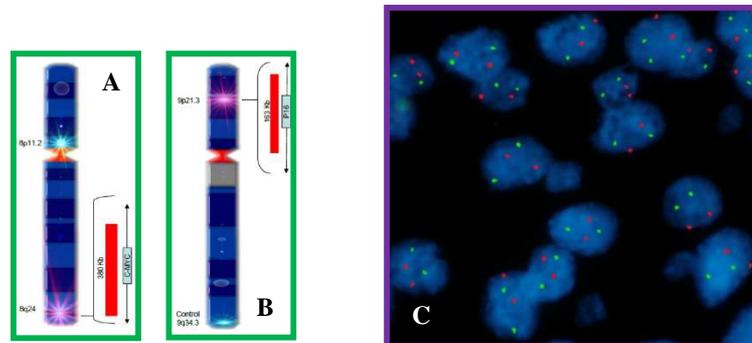
Se desnaturaliza la sonda por calor en baño María a 78°C durante 10 minutos. Se aplican 5  $\mu$ L de sonda en cada muestra, se coloca el cubreobjetos (18 x 18 mm), se sellan los bordes con pegamento y se incuban los vidrios en cámara húmeda a 37°C durante toda la noche.

### **Lavados-Astringencia**

Al día siguiente se remueve el cubreobjetos sumergiéndolo en 2XSSC a temperatura ambiente, se lavan los vidrios en 0,4XSSC/0,3% Tween 20 a 72°C por 2 minutos, y luego en 2XSSC/0,1% Tween 20 a temperatura ambiente por 1 minuto. Se dejan secar en oscuridad y se agregan 10  $\mu$ L del contracolorante DAPI (250 ng/ $\mu$ L) en el área hibridada; se coloca el cubreobjetos definitivo (22 x 22 mm), se sella con esmalte y se guardan en oscuridad en el freezer a -20°C hasta su análisis.

### Lectura e interpretación

El análisis de los preparados con FISH fue realizado con microscopio de epifluorescencia Olympus BX51 con los filtros apropiados, contabilizando al menos 100 núcleos para cada sonda, analizándose el tejido tumoral y el normal de cada muestra por separado. En el presente estudio se utilizaron sondas locus específicas OTS9P21.3 (CDKN2A) y OTS8Q24 (c-MYC) para muestras tisulares fijadas en formol e incluidas en parafina (LiVE- Loxel, Argentina) (Figura 16). Para cada una de ellas se evaluó la frecuencia de núcleos con 0, I, II, III y IV marcas, siendo los valores de corte (media de controles + 3 desvíos estándar): 3.5% y 12%, para ganancia de 8q24 y delección de 9p21, respectivamente.



**Figura 16.** Diagramas mostrando la ubicación de los genes: a) *c-MYC* en 8q24 y b) *CDKN2A* en 9p21; c) Núcleos interfásicos normales hibridados con la sonda OTS8Q24 (*c-MYC*) mostrando el gen de interés en rojo y el de referencia en verde (LiVE- Loxel, Argentina).

### 3.4. Extracción de ARN de muestras incluidas en parafina:

#### Materiales, reactivos y soluciones empleadas:

- Plancha térmica
- Centrífuga
- Minicentrífuga
- Vórtex
- Xileno 100% (Biopack, Argentina)
- Alcohol etílico (Cicarelli, Argentina)
- Agua de ampolla (Klonal, Argentina)
- Kit RecoverAll™ (Ambion, Life technologies)



- ARNasa Zap (Ambion, Life technologies)
- Kit de extracción (Ambion, Life technologies)

**Procedimiento:**

**Desparafinación**

Se emplean cortes de 5-7  $\mu\text{m}$  de biopsias incluidas en parafina. Se utiliza el Kit RecoverAll™ (Ambion) acorde a las indicaciones del fabricante. Para el desparafinado, las muestras se colocan en 1 ml de xileno al 100%, se mezclan y centrifugan para homogeneizar el tejido. Luego se incuban durante 3 minutos a 50°C en plancha térmica, se centrifuga a máxima velocidad (13 000 rpm) por 2 min a temperatura ambiente para precipitar el tejido, y se descarta el xileno. Se agrega 1 mL de etanol 100% a temperatura ambiente, se mezcla y centrifuga por 2 minutos a temperatura ambiente a 13000 rpm y se descarta el etanol preservando el pellet. Se efectúa un segundo lavado con etanol 100% y se deja secar el pellet por 15-45 minutos a temperatura ambiente.

**Digestión con proteasa**

Se agregan 100-200  $\mu\text{L}$  de buffer de digestión a cada muestra según el tamaño de la misma; se homogeniza la solución y se adicionan 4  $\mu\text{L}$  de proteasa. Se resuspende y se incuban en plancha térmica a 50°C durante toda la noche.

**Aislamiento del ARN**

Al día siguiente se trasladan las muestras a otra plancha térmica calibrada a 80°C durante 15 minutos, se prepara una mezcla de etanol/aditivo de aislamiento según lo indicado en la Tabla 6, se agrega el volumen apropiado de la mezcla, de acuerdo al volumen de buffer de digestión y luego se homogeneiza la solución.

**Tabla 6. Aislamiento**

<b>Pasos</b>	<b>Volumen</b>		
<b>Buffer de Digestión</b>	<b>100 µL</b>	<b>150 µL</b>	<b>200 µL</b>
<b>Aditivo de Aislamiento</b>	120 µL	180 µL	240 µL
<b>Etanol 100%</b>	275 µL	413 µL	550 µL
<b>Total</b>	395 µL	593 µL	790 µL

**Primer lavado**

Las muestras se pasan por un filtro Cartridge utilizando las soluciones de lavado provistas por el Kit, se agregan 700 µL de solución WASH 1, se centrifuga a 10000 rpm durante 30 segundos, se descarta el fluido residual, y se adicionan 500 µL de solución WASH 2/3 al filtro Cartridge, se centrifuga nuevamente a 10000 rpm durante 30 segundos, se reinserta el filtro en el mismo tubo colector y se realiza un último spin por 30 segundos para remover el fluido residual.

**Digestión con nucleasas**

Se prepara la mix de ADNasa según lo indicado en la Tabla 7:

**Tabla 7. Mezcla de ADNasa**

<b>Reactivo</b>	<b>Cantidad (por reacción)</b>
<i>10X DNase Buffer</i>	6 µL
<i>DNase</i>	4 µL
<i>Nuclease-free Water</i>	50 µL

Se agregan los 60 µL de la mezcla de ADNasa a cada filtro Cartridge, se tapa el tubo y se incuba por 30 min a temperatura ambiente (22-25°C).

### **Segundo lavado**

Se agregan 700  $\mu\text{L}$  de solución WASH 1 al filtro Cartridge, se centrifuga por 30 segundos a 10000 rpm, se descarta nuevamente el fluido residual, y se introduce el filtro en el mismo tubo colector. Se agregan 500  $\mu\text{L}$  de WASH 2/3 al filtro Cartridge, se vuelve a centrifugar por 30 segundos a 10000 rpm, se descarta el fluido residual y se reinserta el filtro en el tubo colector. Se repite el paso previo para efectuar un segundo lavado con WASH 2/3, se centrifuga durante 1 minuto a 10000 rpm para eliminar el fluido residual y se deja 1 minuto en reposo a temperatura ambiente.

### **Elución**

Se descarta el fluido residual y se transfiere el filtro Cartridge a un nuevo tubo colector, se adicionan 60  $\mu\text{L}$  de solución de elución provista por el kit a temperatura ambiente mínimo por 1 minuto. Se centrifuga durante 1 minuto a máxima velocidad (13000 rpm) para pasar la mezcla por el tubo. Se almacena el ARN obtenido en freezer a  $-80^{\circ}\text{C}$  hasta su uso.

#### **3.4.1 Cuantificación espectrofotométrica del ARN:**

El ARN aislado se cuantifica en el espectrofotómetro para valorar la pureza de la muestra, considerando las absorbancias a longitudes de onda de 260, 280 y 230 nm. Una relación  $\text{DO}_{260}/\text{DO}_{230}$  mayor que 1 indica que la muestra contiene restos de fenol en tanto que si la relación  $\text{DO}_{260}/\text{DO}_{280}$  es menor que 1.9, la muestra se halla contaminada con proteínas, en ambos casos la cuantificación no será exacta. Finalmente, si relación  $\text{DO}_{260}/\text{DO}_{280}$  es mayor o igual que 1.9, la muestra es pura y se puede calcular la concentración de manera exacta. Para esto se utiliza la relación: 1 unidad de  $\text{DO}_{260} = 40 \mu\text{g ARN}/\mu\text{L}$ .

#### **3.5. PCR en tiempo real (qRT-PCR):**

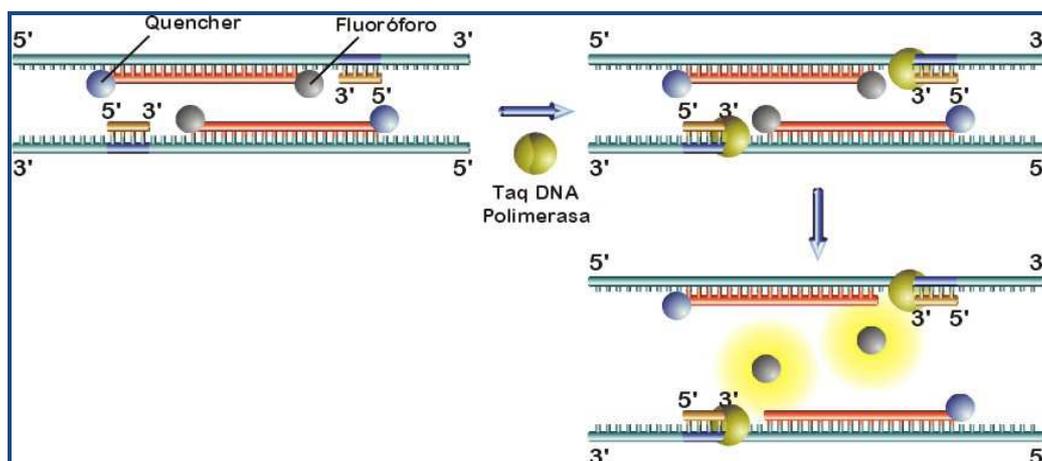
##### **Materiales, reactivos y soluciones empleados**

- Capilares de vidrio (Roche Diagnostics)
- Kit TaqMan (Roche Diagnostics)
- Primers específicos para cada gen

### Procedimiento:

La expresión del microRNA miR-155 se evaluó mediante la técnica de qRT-PCR a partir de los ADNc previamente obtenidos, empleando un termociclador LightCycler® 2.0 (Roche Diagnostics). Para la cuantificación se utilizó el protocolo de amplificación de TaqMan empleándose el kit de LightCycler (Roche Diagnostics), que suministra todos los componentes necesarios para la reacción.

Las sondas TaqMan son sondas de hidrólisis, que utilizan la actividad 5'→3' exonucleasa de la Taq polimerasa para detectar y cuantificar los productos de PCR específicos en la reacción de qRT-PCR. Estas sondas están marcadas con un fluorocromador (fluoróforo) en el extremo 5' que emite fluorescencia al ser excitado y un aceptor (*quencher*) en el extremo 3' que absorbe la fluorescencia liberada por el fluoróforo. Para que esto ocurra, las moléculas dadora y aceptora deben encontrarse próximas entre sí. Mientras la sonda está intacta, la fluorescencia emitida por el dador es absorbida por el aceptor. Sin embargo, cuando la secuencia de interés es amplificada, la sonda de hidrólisis hibridada con la secuencia de interés es desplazada durante la reacción de PCR por la actividad 5' exonucleasa de la Taq polimerasa que hidroliza el extremo libre 5' de la sonda y produce la liberación del fluorocromador. Como ambos, dador y aceptor, se encuentran separados espacialmente, la fluorescencia emitida por el primero puede ser detectada por el lector del termociclador (Figura 17).



**Figura 17.** Mecanismo de acción de las sondas de hidrólisis TaqMan (Holland et al, 1991).

**Reacción de retrotranscripción (RT-PCR):****Reactivos**

- Enzima *M-MLV Reverse Transcriptase* (Promega)
- *M-MLV RT Reaction Buffer 1X*
- dNTPs (Promega)
- *Random primers* (Promega)

Los ensayos se realizaron según metodología TaqMan para miR-155 (002623, Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) usando primers específicos para la transcripción reversa y la cuantificación del miRNA maduro. El gen *RNU6B*, de expresión constitutiva, fue utilizado como control interno de la PCR (Zhang et al, 2006) para normalizar con los primers respectivos (001093, Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) las diferencias muestra a muestra en la carga de ADNc, calidad de ARN y eficiencia en la RT. En la Tabla 8 se detallan las secuencias del miRNA maduro y del gen *RNU6B*.

**Tabla 8.** Secuencias para miR-155 y *RNU6B*.

miRNA	Secuencia	Región cromosómica
hsa-miR-155	UUA AUGCUAAUCGUGAUAGGGGU	21q21.2
<i>RNU6B</i>	CGCAAGGATGACACGCAAATTCGTGAAGCGTTCCATATTTTT	15q23

Disponibles en [www.thermofisher.com](http://www.thermofisher.com).

Se efectúa una dilución de la muestra acorde a la concentración obtenida en el espectrofotómetro, se completa con agua destilada hasta llegar a un volumen de 5 µL. Se prepara la mix para la RT, según la composición detallada en la Tabla 9.

**Tabla 9. RT Mix**

<b>Componentes</b>	<b>(x1) (μL)</b>
Agua	2,4
Buffer	3
dNTPs (100 mmol)	A: 0,15 C: 0,15 T: 0,15 G: 0,15
M-MLV	1
Primers o cebadores	3
Muestra	5

dNTPs: desoxirribonucleótidos; M-MLV: Moloney-murine leukemia virus enzyme.

La reacción de PCR se lleva a cabo con un volumen final de 20μl, empleando 2μL de producto de la RT de pacientes y controles, y 18 μL de mezcla de reacción cuyo contenido se describe en la Tabla 10.

**Tabla 10. qRT-PCR**

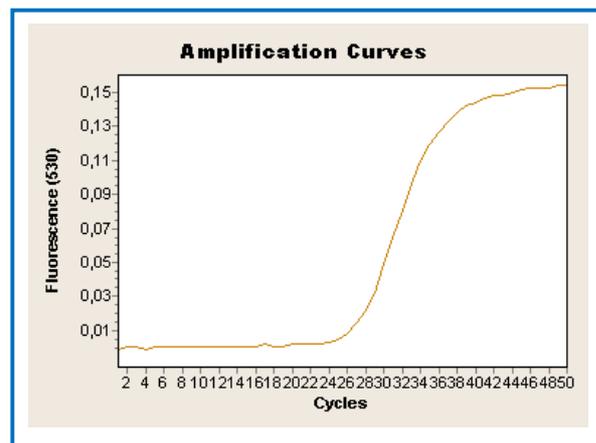
<b>Componentes</b>	<b>(x1) (μL)</b>
TaqMan miRNA	1
Mix	10
Agua	6,6
ROX	0,4
Producto RT	2

A continuación se cargan los capilares, se centrifugan a máxima velocidad por 6 segundos, y se leen en el LightCycler. Se estandarizaron las condiciones de qRT-PCR, arribándose a un ciclado de: 95°C durante 10 minutos, seguido de 50 ciclos de 95°C por 15 segundos, 62°C por 10 segundos y 72°C por 15 segundos.

### Curvas estándar de calibración

Al trabajar con qRT-PCR es necesario realizar curvas estándar durante cada ciclo o previamente al análisis de las muestras en estudio con diferentes concentraciones de los genes de interés para su correcta cuantificación (Figura 18). Estas curvas permiten:

- Calcular la eficiencia de amplificación de los *primers*, dato importante para la cuantificación relativa (intra-experimento).
- Estimar el valor absoluto (cuantificación absoluta) del número de copias de un determinado transcripto.
- Determinar el rango dinámico de sensibilidad de cada reacción.
- Calcular la variabilidad y normalizar los datos de diferentes experimentos (inter-experimento).



**Figura 18.** Imágenes del LightCycler que muestra la curva de amplificación del gen de interés (*miR-155*) de uno de nuestros pacientes con MF.

La razón entre el número de copias de *RNU6B* y *miR-155* se calculó tanto en las muestras de pacientes como de controles, utilizando el software del LightCycler y las curvas previamente mencionadas.

### **3.6. Análisis estadístico**

La asociación entre los datos obtenidos y las características clínicas de los pacientes se evaluó utilizando el test de Mann-Whitney. El análisis de las variables clínicas y genéticas entre grupos se llevó a cabo mediante el test t de Student (para variables cuantitativas) y la prueba de Chi cuadrado o el test exacto de Fisher (para variables categóricas). La sobrevida global se estimó por el método de Kaplan-Meier, efectuándose las comparaciones mediante el log-rank test. Para todas las evaluaciones se consideró como estadísticamente significativo un valor de p menor a 0,05. Los resultados fueron analizados empleando el programa GraphPad Prism 5.0.



## ***Resultados***

## 4. RESULTADOS

### 4.1. Análisis citomolecular

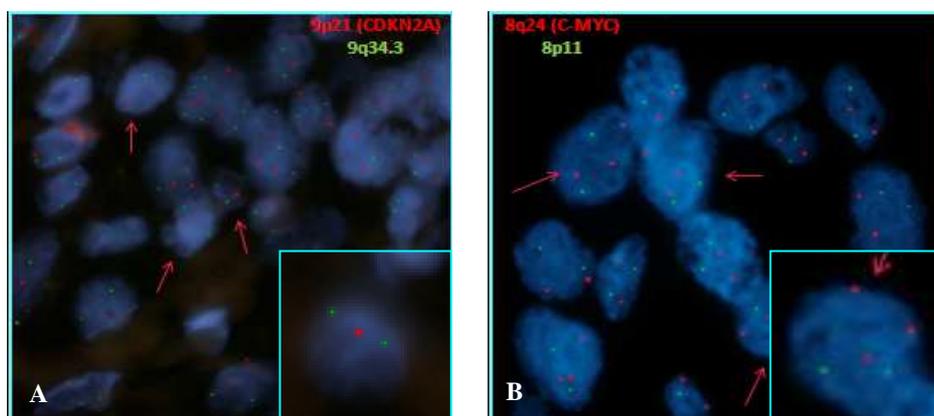
En el presente estudio se evaluó un total de 36 pacientes con diagnóstico de MF clásica en estadios avanzados y MF variante foliculotrópica. El estudio citomolecular fue realizado en 34 muestras de pacientes con MF (dos biopsias fueron excluidas por no resultar evaluables para el análisis): 14 MF-T, 13 MF-TR y 7 MF-F. Del total, 20 casos (59%) mostraron alteraciones genómicas (AG): 8 pacientes (40%) tuvieron delección de *CDKN2A* (9p21), 7 (35%) mostraron ganancia de *C-MYC* (8q24) y 5 (25%) exhibieron ambas alteraciones. Teniendo en cuenta el diagnóstico histopatológico, se observaron AG en 2/14 (14,3%) de las MF-T frente a 12/13 (92,3%) de las MF-TR y 6/7 (85,7%) de las MF-F, con diferencias significativas de estos dos últimos subtipos respecto de MF-T ( $p=0,0001$  y  $p=0,004$ , respectivamente) (Tabla 11).

**Tabla 11:** Distribución de las AG según el tipo de MF

Tipo de MF	AG (%)	SA (%)	Total
MF-T	2 (14,3)*	12 (85,7)	14
MF-F	6 (85,7)	1 (14,3)	7
MF-TR	12 (92,3)	1 (7,7)	13

AG: alteraciones genómicas; SA: sin alteraciones; MF: micosis fungoide; MF-T: MF estadio tumoral; MF-F: MF foliculotrópica; MF-TR: MF en transformación a linfoma de células grandes. \*Diferencias significativas respecto de MF-TR:  $p=0,0001$  y MF-F:  $p=0,004$

En la Figura 19 se muestra el análisis por FISH de dos muestras de nuestra serie con delección de 9p21 y ganancia de 8q24.



**Figura 19.** Núcleos interfásicos de biopsias incluidas en parafina de pacientes con MF mostrando: A) Delección de la región 9p21 (flechas) (en rojo: sonda del gen *CDKN2A*; en verde: señal control en 9q34.3); B) Amplificación de la región 8q24 (flechas) (en rojo: sonda del gen *MYC*; en verde: señal control en 8p11). Insertos mostrando núcleos con más detalle.

En forma específica, encontramos delección de *CDKN2A* en 4/7 (57%) MF-F, 7/13 (54%) MF-TR, y 2/16 (12,5%) MF-T, con diferencias significativas entre los grupos ( $p=0,03$ ), mientras que la ganancia de *C-MYC* fue detectada en 7/13 (54%) MF-TR y 5/7 (71.4%) MF-F ( $p<0,001$ ). No se detectó esta anomalía en los casos de MF-T. Como se detalla en la Tabla 12, la comparación entre las distintas variantes muestra diferencias significativas de delección de *CDKN2A* para el estadio tumoral respecto del tipo en transformación ( $p=0,047$ ); mientras que en relación a la ganancia de 8q24 se encontraron diferencias significativas entre el estadio tumoral en comparación con la MF-TR ( $p=0,003$ ) y la variante foliculotrópica ( $p=0,001$ ), no detectándose diferencias entre MF-F y MF-TR para ninguna de las dos AG.

**Tabla 12: Detección del tipo de AG en nuestra serie de pacientes con MF**

Tipo de MF	Alteraciones genómicas (%)		
	CDKN2A	C-MYC	AG Total
MF-T	2 (15,4) #	0 ‡	2 (10)
MF-F	4* (30,8)	5* (41,7)	6 (30)
MF-TR	7** (53,8)	7** (58,3)	12 (60)

AG: alteraciones genómicas; MF: micosis fungoide; MF-T: MF estadio tumoral; MF-F: MF foliculotrópica; MF-TR: Transformación a linfoma de células grandes. Presencia de ambas alteraciones en: \*tres casos, \*\*dos casos. ‡ Diferencias significativas respecto de MF-F:  $p=0,001$  y MF-TR:  $p=0,003$ ; # Diferencias significativas respecto de MF-TR:  $p=0,047$ .

#### 4.1.1. Distribución de las AG según las características clínicas e histopatológicas de los pacientes.

Efectuamos en este trabajo el análisis de las AG estudiadas en función de las características clínicas de los pacientes así como de las características morfológicas e inmunofenotípicas de las lesiones que fueron objeto de biopsia.

##### 4.1.1.1. Análisis en función de la edad y el género de los pacientes.

En primera instancia analizamos los grupos AG y SA (sin alteraciones) en función del género, siendo predominante el sexo masculino (85%) en el grupo con AG frente al SA (57%), observándose una tendencia a la significación estadística ( $p=0,07$ ) (Figura 20); asimismo analizamos la presencia de desbalances genómicos en función de la edad de los pacientes, obteniendo una media muy similar para ambos grupos: AG (62,7 años; rango: 35 a 82 años) y SA (62 años; rango: 31-80 años) (Figura 21).

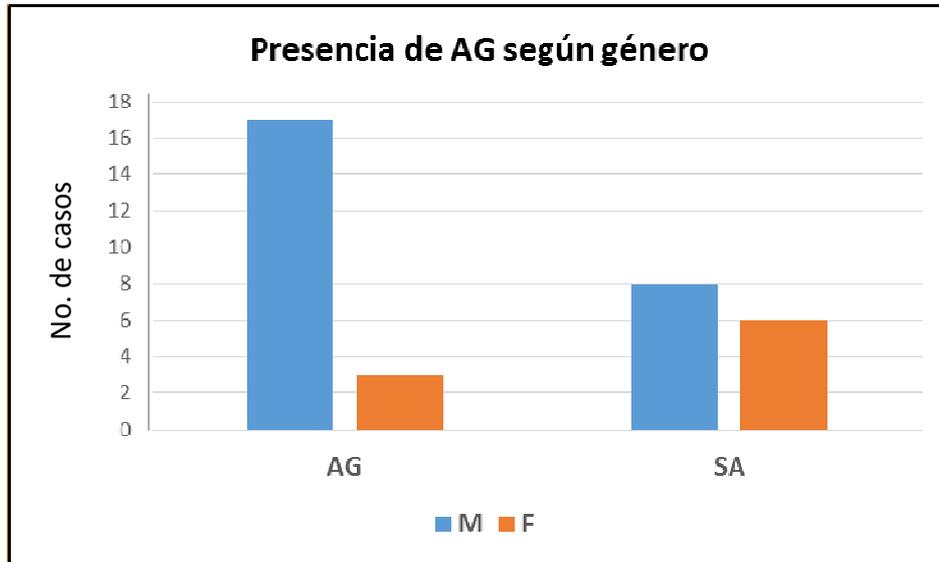


Figura 20. Distribución de las alteraciones genómicas según el género de los pacientes.

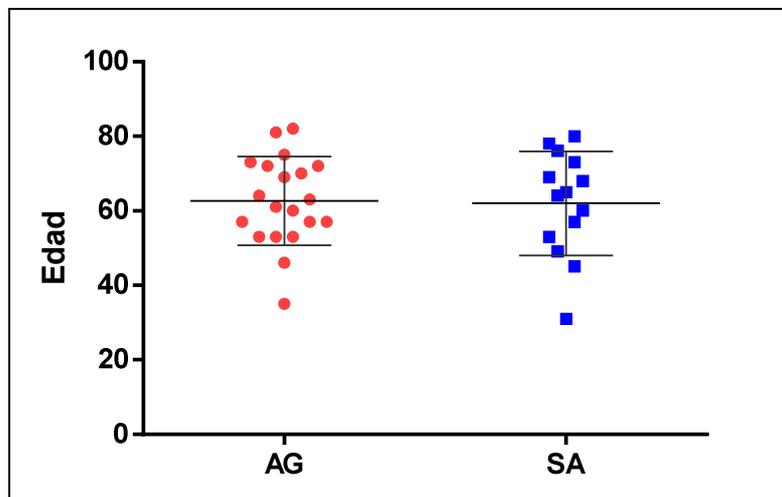
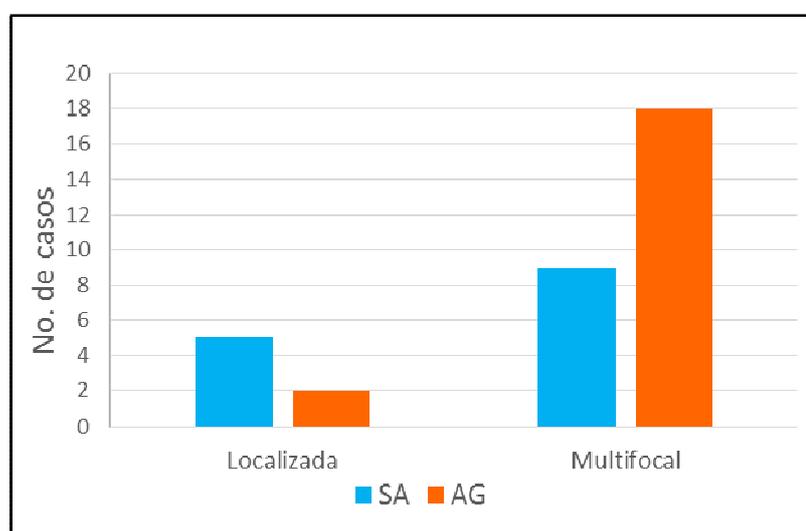


Figura 21. Distribución de las alteraciones genómicas según la edad de los pacientes. AG: anomalías genómicas; SA: sin alteraciones.

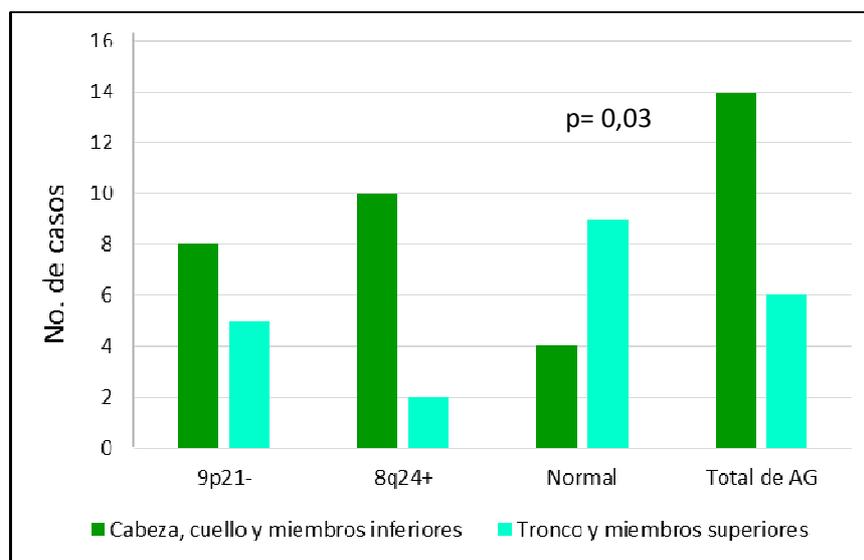
#### 4.1.1.2. Análisis de las AG acorde a la extensión y localización anatómica de las lesiones.

Dentro de las características clínico-dermatológicas de las lesiones, estudiamos particularmente su localización anatómica, extensión, tamaño, y la presencia de úlcera. En relación a la focalidad o extensión de las lesiones, detectamos una mayor frecuencia de AG en los casos con lesiones multifocales (18/27; 67%) respecto de aquellos con lesiones localizadas (2/7; 28,6%), aunque sin alcanzar diferencias significativas ( $p=0,163$ ) (Figura 22).



**Figura 22.** Distribución de las alteraciones genómicas según la extensión de superficie corporal afectada.

Asimismo, se encontró predominancia de AG en las lesiones ubicadas en cabeza, cuello y extremidades inferiores (14/18 casos; 77,8%) comparadas con las halladas en tronco y extremidades superiores (6/15 casos; 40%), con diferencias estadísticamente significativas ( $p=0,03$ ) (Figura 23).

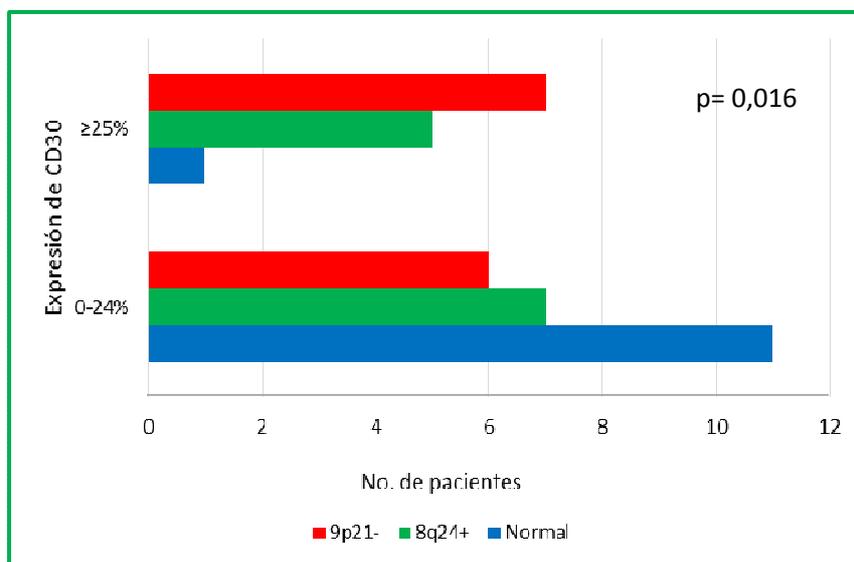


**Figura 23.** Distribución de las alteraciones genómicas según las regiones anatómicas involucradas.

Finalmente se analizó el tamaño medio de las lesiones cutáneas en ambos grupos AG y SA, siendo de 7,5 cm y 5,3 cm, respectivamente; así como la característica ulcerativa de la lesión que fue observada en 13 y 6 casos, respectivamente sin hallar diferencias significativas.

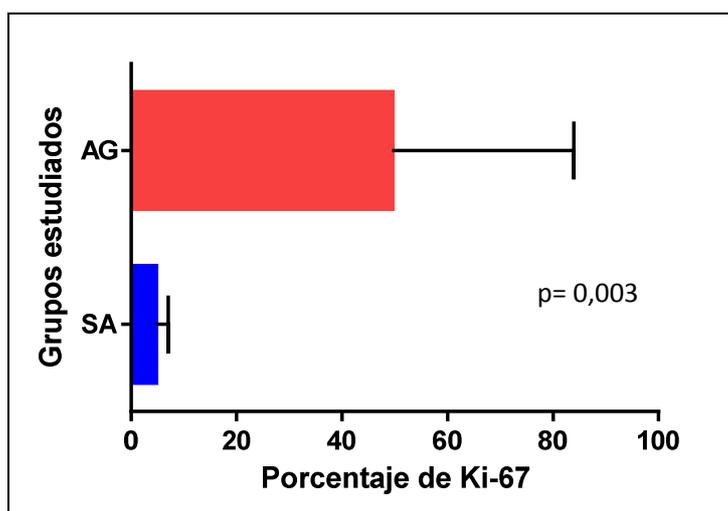
#### 4.1.1.3. Asociación de las AG con las características morfológicas e inmunofenotípicas:

En este aspecto, fue de interés evaluar el nivel de asociación entre las AG y el porcentaje de células CD30+ tomando como punto de corte  $\geq 25\%$ . Este análisis mostró que en el grupo con menos del 25% de positividad la mayoría de las biopsias (10/11; 91%) no presentaron AG a diferencia de aquellos casos con  $\geq 25\%$  en el que se encontró un único paciente SA (1/11; 9%) ( $p=0,016$ ) (Figura 24).



**Figura 24.** Distribución de las alteraciones genómicas según la frecuencia relativa de expresión de la proteína CD30 por inmunohistoquímica.

Simultáneamente, se evaluó el índice de proliferación con el anticuerpo Ki-67, detectándose mayor proliferación en el grupo AG (49,5%) con respecto al SA (5%), con diferencias estadísticamente significativas ( $p=0,003$ ) (Figura 25).



**Figura 25.** Distribución de las alteraciones genómicas según la expresión de Ki-67 nuclear por inmunohistoquímica.



De igual manera, se determinó la frecuencia de transformación histológica de las biopsias desde su diagnóstico, observándose que el 33% de las MF-T y el 41,6% de las MF-F sufrieron transformación a linfoma de grandes células. Revisando específicamente por tipo de AG, el 80% de las MF-TR de origen foliculotrofo tenían delección de 9p21 con respecto al 42,8% en las MF-TR de origen clásico/tumoral; mientras que en relación a la ganancia de 8q24 la mayor frecuencia fue encontrada en las MF-TR de origen tumoral (71,4%) frente al 40% de las de origen folicular, sugiriendo un rol diferente para estas alteraciones en la progresión de la patología, aunque sin diferencias significativas (Tabla 13). Vale destacar que 3/13 MF-TR estaban constituidas por células grandes que no expresaban la proteína CD30, originadas a partir de MF clásica estadio tumoral.

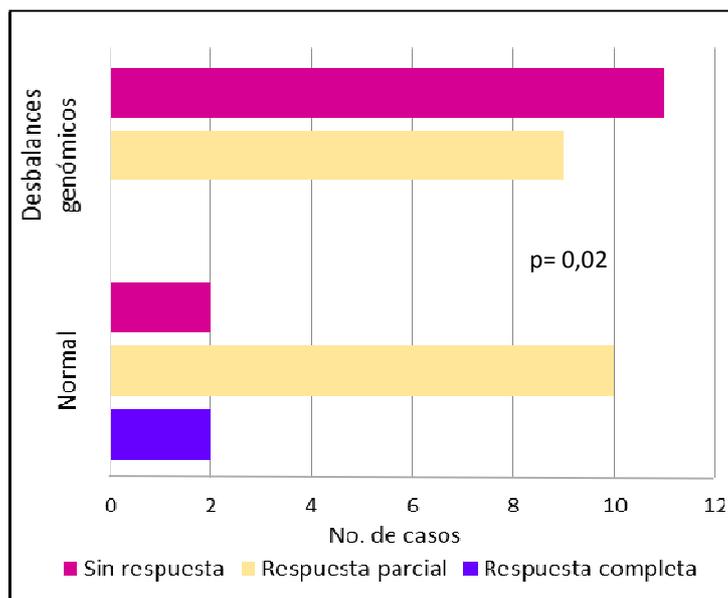
**Tabla 13:** Detección del tipo de AG en nuestra serie de pacientes con MF-TR según su diagnóstico inicial

Origen de MF-TR	Alteraciones genómicas (%)		
	CDKN2A	C-MYC	AG Total
MF-T	3* (42,8)	5 (71,4)	7/8 (87,5)
MF-F	4* (80)	2 (40)	5/5 (100)

AG: alteraciones genómicas; MF: micosis fungoide; MF-T: MF estadio tumoral; MF-F: MF foliculotrófica; MF-TR: Transformación a linfoma de células grandes. \*Presencia de ambas alteraciones en uno de los casos.

#### 4.1.1.4. Correlación con las características clínico-terapéuticas y de sobrevida de los pacientes:

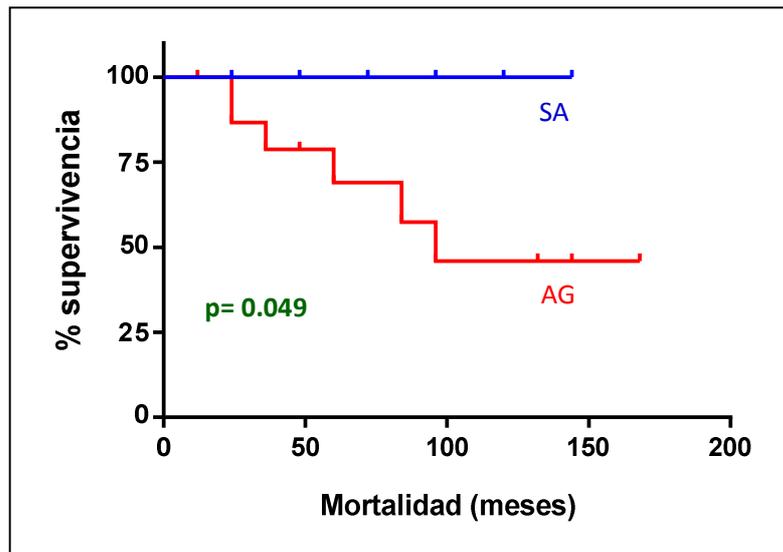
Si bien esta patología es crónica y recidivante, con frecuentes remisiones parciales o bien sin ninguna mejoría, en relación a este parámetro pudimos observar que la respuesta al tratamiento fue completa en 2/14 (14,3%) casos SA frente a ninguno del grupo con AG, parcial en 9/20 (45%) pacientes con AG comparado con 10/14 (71,4%) SA, siendo nula en 11/20 (55%) casos pertenecientes al grupo con desbalances genómicos respecto de 2/14 (14,3%) de los casos considerados normales para los loci estudiados ( $p=0,02$ ) (Figura 26).



**Figura 26.** Respuesta al tratamiento según presencia de desbalances genómicos.

Otro parámetro evaluado fue la localización de la recaída, encontrándose mayor número de recaídas extracutáneas o sistémicas en el grupo con AG (4; 20%) frente al grupo SA (1; 7,7%); en este rubro evaluamos además la presencia de adenopatías observando 12 (60%) en los pacientes con alteraciones respecto a 5 (35,7%) casos SA, pero sin alcanzar diferencias significativas ( $p=0,58$  para ambas características).

En relación a la mortalidad, siete pacientes fallecieron debido a complicaciones de la patología, todos ellos pertenecientes al grupo con AG. Simultáneamente, los pacientes con AG mostraron una sobrevida más corta (92 meses) comparada con los pacientes SA, que no alcanzaron la mediana de supervivencia (*Log-rank*  $p=0.04$ ), indicando su asociación con una peor evolución clínica (Figura 27).



**Figura 27.** Curvas de supervivencia de pacientes con anomalías genómicas (AG) y sin alteraciones (SA) ( $p=0,049$ ).

En la Tabla 14 podemos apreciar los resultados obtenidos con cada uno de las características clínico-patológicas de los casos estudiados.

**Tabla 14.** Características clínico-patológicas de los pacientes de acuerdo a la presencia o no de desbalances genómicos.

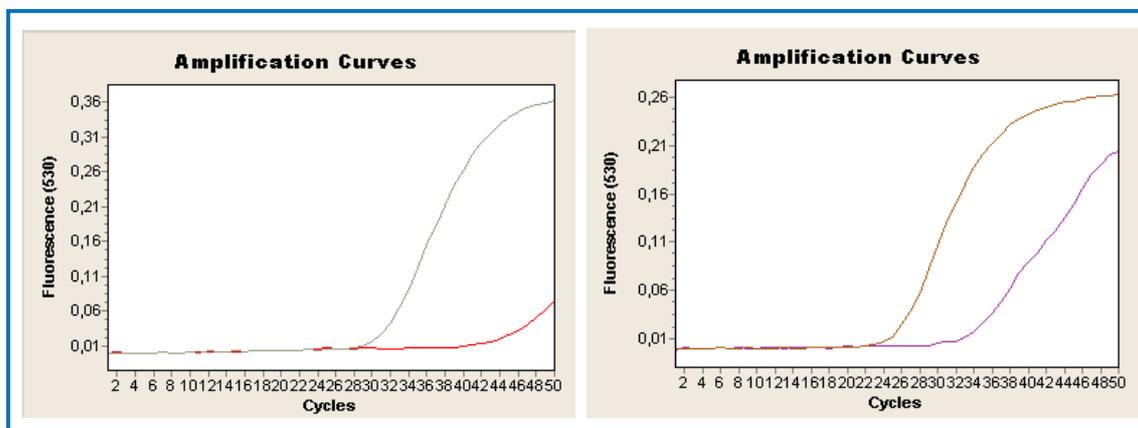
Características clínicas	Grupos estudiados		Valor p
	AG	SA	
Género (M/F)	17/3	8/6	<b>0,07</b>
Edad mediana en años (rango)	62,7 (35-82)	62 (31-80)	0,88
Multifocalidad (%)	18 (90)	9 (64)	0,163
Localización (cabeza, cuello y extremidades inferiores) (%)	14 (77,8)	4 (40)	<b>0,03</b>
Tamaño (cm); media (rango)	7,5 (1-15)	5,3 (1-10)	0,2
Lesión ulcerada (%)	13 (65)	6 (42,8)	0,3
Células CD30 $\geq$ 25% (%)	10 (50)	1 (8,3)	<b>0,01</b>
Ki-67 (%); media (rango)	50 (5-90)	5 (0-8)	<b>0,003</b>
$\beta$ 2M ( $\mu$ g/mL); media (rango)	3.35 (1,5-6,7)	3 (1,7-3,6)	0,66
LDH (UI/L); media (rango)	507 (200-1209)	439 (178-1060)	0,65
Refractario al tratamiento (%)	11 (55)	2 (14,3)	<b>0,02</b>
Recaída extracutánea (%)	4 (20)	1 (7,7)	0,58
Adenopatías (%)	12 (60)	5 (35,7)	0,6
Mortalidad relacionada (%)	7 (100%)	0	<b>0,049</b>

AG: alteraciones genómicas; SA: Sin alteraciones; M: Masculino; F: Femenino; B2M: Beta-2 microglobulina; LDH: Lactato deshidrogenasa.

Concluyendo, nuestros datos muestran pérdidas de 9p21 en el 65% de los casos y ganancias 8q24 en el 60% de los pacientes evaluados, siendo más frecuentes en los casos de MF-F y MF-TR, indicando una asociación de las mismas con progresión de la enfermedad.

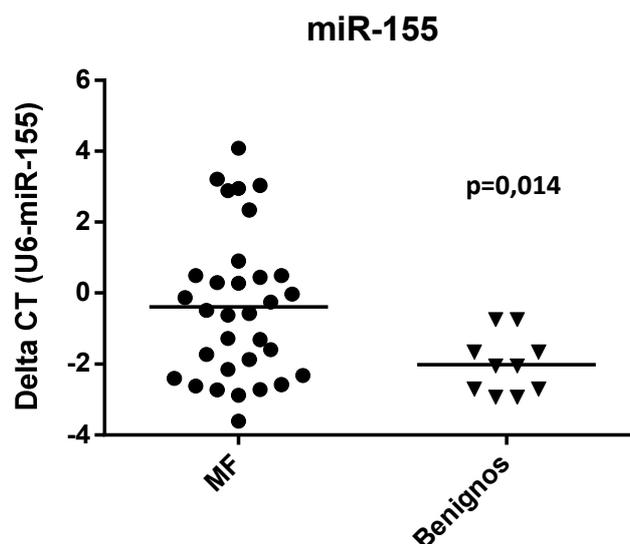
#### 4.2. Evaluación de la expresión del miRNA 155 en pacientes con MF y controles

Otro aspecto del presente trabajo fue la evaluación de la expresión del miR-155 en nuestra serie. Este estudio fue efectuado en 32 pacientes y en muestras de 10 lesiones cutáneas inflamatorias benignas, consideradas como nuestro grupo control. En 4 casos el material no resultó óptimo para el estudio de qRT-PCR. A modo de ejemplo en la Figura 28 se muestran los gráficos que describen las curvas de expresión de los genes *miR-155* y *RNU6B*.



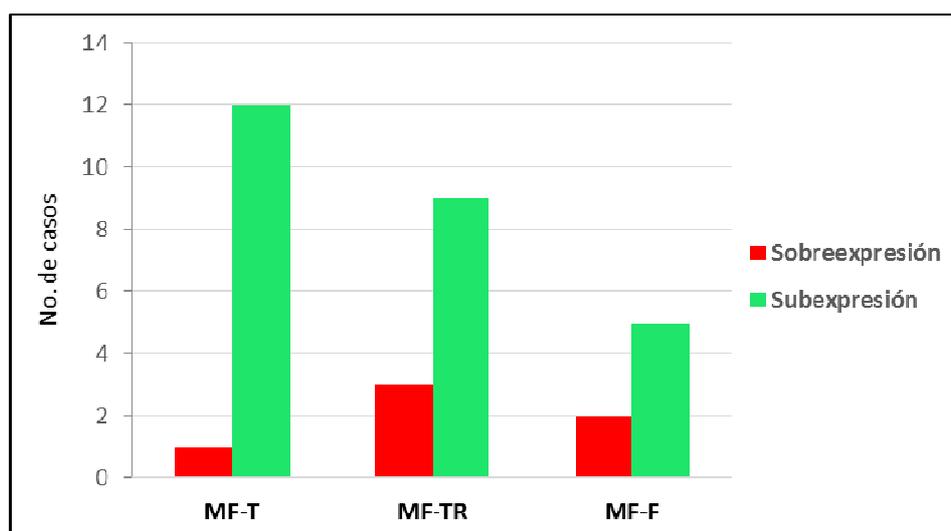
**Figura 28.** Imágenes del LightCycler que muestran las curvas de amplificación del gen de interés miR-155 y del gen de referencia RNU6B, en dos pacientes con MF: A) sin sobreexpresión de miR-155 y B) con sobreexpresión de miR-155.

En primera instancia se efectuó la comparación de la expresión del miR-155 entre pacientes y controles, observándose mayores niveles de expresión en los primeros ( $\log: -0,38 \pm 2,08$ ) respecto de controles ( $\log: -2,01 \pm 0,82$ ) ( $p=0,014$ ) (Figura 29).



**Figura 29.** Niveles de expresión de miR-155 medido por qRT-PCR en pacientes con MF y controles (benignos). Las barras horizontales representan la media ( $p=0,014$ ).

Cuando se efectuó este análisis en función de los subtipos de MF se detectó sobreexpresión de miR-155 en el 25% de las MF-TR, 28.6% de las MF-F y únicamente en 7.7% de las MF-T, sugiriendo una asociación entre histología y expresión del miR-155 (Figura 30).



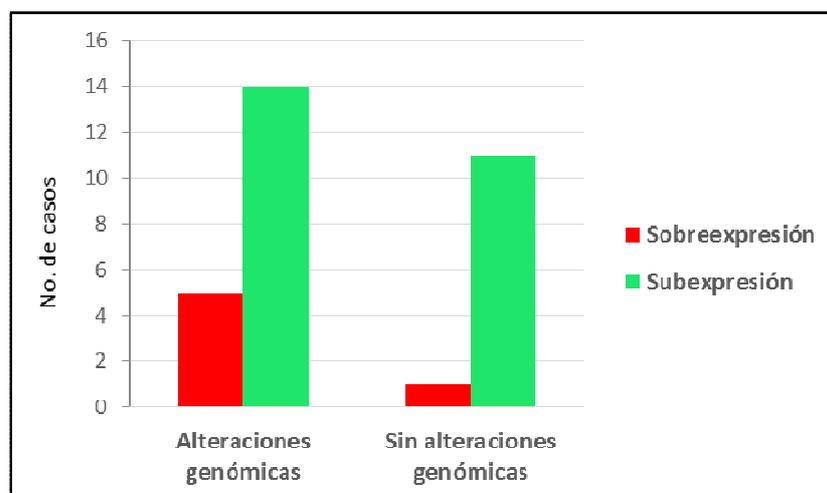
**Figura 30.** Expresión de miR-155 según el estadio y tipo de MF. MF-T: MF estadio tumoral; MF-F: MF foliculotrópica; MF-TR: Transformación a linfoma de células grandes.

Asimismo, se analizó la expresión de miR-155 en función de la presencia o no de desbalances genómicos detectados por FISH, hallando sobreexpresión del microRNA en el 26,3% de los pacientes con AG respecto del 8,3% de los casos SA. (Tabla 15; Figura 31), aunque sin alcanzar diferencias significativas ( $p=0,328$ ).

**Tabla 15:** Expresión de miR-155 en relación a las anomalías genómicas observadas.

miR-155	Grupos estudiados (%)		
	AG (%)	SA (%)	Controles (%)
<b>Sobreexpresión</b>	5 (26,3)	1 (8,3)	0
<b>No expresión</b>	14 (73,7)	11 (91,7)	10 (100)
<b>Total</b>	19 (100)	12 (100)	10 (100)

AG: alteraciones genómicas; SA: Sin alteraciones genómicas.



**Figura 31.** Expresión de miR-155 según la presencia de alteraciones genómicas.

Finalmente, se evaluó si existía algún tipo de asociación entre la sobreexpresión de miR-155 y los parámetros clínicos o de laboratorio (Tabla 16).

**Tabla 16.** Características clínicas de los pacientes según la expresión de miR-155.

Características clínicas	miR-155		Valor p
	Sobreexpresión	No sobreexpresión	
Género (M/F)	5/1	17/9	0,72
Edad mediana en años (rango)	65,5 (35-80)	64 (31-82)	0,87
Multifocalidad (%)	5 (83,3)	21 (80,7)	0,66
Localización (cabeza, cuello y extremidades inferiores) (%)	3 (50)	14 (56)	0,65
Tamaño (cm); media (rango)	5 (1-15)	7,9 (3-10)	0,22
Lesión ulcerada (%)	4 (66,6)	13 (50)	0,77
Células CD30 $\geq$ 25% (%)	2 (33,3)	9 (36)	0,95
Ki-67 (%); media (rango)	53,3 (20-70)	26,69 (5-90)	0,24
$\beta$ 2M ( $\mu$ g/mL); media (rango)	1,33 (1,5-4,5)	1,52 (2-6,7)	0,95
LDH (UI/L); media (rango)	328 (200-435)	497,5 (178-1060)	0,34
Refractario al tratamiento (%)	1 (16,67)	12 (46,15)	0,2
Recaída extracutánea (%)	1 (16,67)	3 (11,54)	0,73
Adenopatías (%)	2 (33,3)	13 (50)	0,77
Mortalidad relacionada (%)	1 (16,67)	5 (19,23)	0,66

M: Masculino; F: Femenino; B2M: Beta-2 microglobulina; LDH: Lactato deshidrogenasa.

El análisis de los datos no mostró diferencias estadísticamente significativas para los parámetros evaluados, así como tampoco entre los grupos de expresión de miR-155 y la respuesta terapéutica ( $p=0,2$ ).



## ***Discusión***

## 5. DISCUSIÓN

En el presente estudio reportamos el análisis de una serie de pacientes con diagnóstico clínico e histopatológico de MF en estadios avanzados y variantes, utilizando la técnica de FISH para la detección de desbalances genómicos a nivel de 9p21 y 8q24, y qRT-PCR para el análisis de la expresión de miR-155. Nuestros resultados muestran que los desbalances de estos genes son frecuentes en MF, alcanzando cerca del 60% de nuestra cohorte, detectándose valores ligeramente superiores de deleciones de 9p21 con respecto a las ganancias de 8q24. Asimismo, describimos por primera vez casos con ambas AG, lo que indicaría la presencia de evolución clonal en el proceso de progresión de esta patología. En cuanto a la frecuencia de las AG evaluadas, la literatura muestra datos controversiales con autores que observaron una distribución similar a la detectada en nuestro estudio (Thangavelu et al, 1997; Scarisbrick et al, 2002; Fischer et al, 2004; Batista et al, 2006; Laharanne et al, 2010a), en tanto que otros encontraron mayor proporción de ganancia de *C-MYC* respecto de pérdidas de 9p21 (Prochazkova et al, 2007, Van Doorn et al (2009). Simultáneamente, estudios de *microarrays* (Vermeer et al, 2008) mostraron una alta tasa de ganancias de *C-MYC* en pacientes con MF-T y SS. Asimismo, y en concordancia con los hallazgos de FISH y CGH, estudios citogenéticos previos (Batista et al, 2006) observaron anomalías cromosómicas, mayoritariamente cariotipos complejos en alrededor de la mitad de los pacientes con MF/SS, siendo muy frecuentes las alteraciones del cromosoma 9 (deleciones, translocaciones y monosomías), y en menor grado las anomalías del cromosoma 8 (inserciones, trisomías, y monosomías). Concomitantemente, Scarisbrick et al (2001) detectaron mayor frecuencia de pérdidas alélicas en SS que en MF, en tanto que otros autores observaron pérdidas de 9p21 en el linfoma anaplásico de células grandes CD30+ (Böni et al, 2000). En la Tabla 17 se detallan los trabajos en los que se evaluaron ambas AG en pacientes con MF y SS, los porcentajes hallados y la metodología empleada, mostrando la amplia variabilidad en los resultados obtenidos y la utilidad de la técnica de FISH para la realización de estos estudios.

**Tabla 17.** Distribución de alteraciones en 9p y 8q en pacientes con MF y SS en series de la literatura y nuestro estudio.

Referencia	Diagnóstico	No. de casos	Alteración (%)		Metodología
			9p	8q	
Batista et al (2006)	MF/SS	19	26	16	CTG SKY
Van Doorn et al (2009)	MF-T	22	41	23	Array-CGH
	SS	20	0	75	
Salgado et al (2010)	MF-T	41	42	32	Oligoarray-CGH
Nuestro estudio (2015)	MF-T	14	15	0	FISH
	MF-F	7	31	42	
	MF-TR	13	54	58	

CTG: Citogenética convencional; CGH: Hibridación genómica comparada; FISH: Hibridación in situ por fluorescencia; SKY: FISH multicolor; MF: Miosis fungoide; MF-T: MF estadio tumoral; MF-F: MF foliculotropa; MF-TR: MF en transformación a linfoma de células grandes T; SS: Síndrome de Sézary

En relación al diagnóstico histológico, todos los subtipos presentaron en alguna medida las aberraciones genómicas estudiadas, siendo menos frecuentes en el estadio tumoral de la MF clásica sin transformación, al compararse con la alta frecuencia en los casos de MF-TR y MF-F. Particularmente, la delección de CDKN2A fue detectada en poco más de la mitad de nuestros pacientes con MF-TR, y en menor medida en MF-F y MF-T, mientras que la ganancia de C-MYC fue más frecuente en los casos con peor evolución clínica, MF-TR y MF-F, no encontrándose en ninguno de los pacientes con MF-T. Estos hallazgos resultan coincidentes con datos de la bibliografía, sustentando la importancia de estos rearrreglos genómicos en la progresión tumoral (Scarbrick et al, 2001; Fischer et al, 2004; Van Doorn et al, 2009). Asimismo, la presencia en el estadio tumoral de delecciones de 9p21 con ausencia de ganancias de 8q24, permitiría sugerir que la pérdida de CDKN2A sería un evento más temprano que la ganancia de C-MYC en el desarrollo y la progresión de la MF.

Con respecto a las características clínico-morfológicas, la frecuencia de AG fue significativamente mayor en los casos que presentaban lesiones correspondientes a regiones

de cabeza, cuello y extremidades inferiores, cuando las células neoplásicas expresaban la proteína CD30 en  $\geq 25\%$  del volumen tumoral total y cuando se contabilizaba mayor expresión de Ki-67. La presencia de mayor porcentaje de AG en los pacientes con lesiones con mayor cuantificación de células CD30+ resulta interesante dada su asociación con mal pronóstico particularmente en la MF-TR (Abeldaño et al 2011; Quintanilla-Martínez et al 2013). Si bien sabemos que la MF generalmente tiene un curso indolente, en la actualidad se considera que la supervivencia es más corta si las células localizadas en la dermis son intensamente CD30 positivas (Edinger et al, 2009). No obstante, cabe mencionar que algunas pequeñas series publicadas han reportado que los pacientes con transformación CD30 positiva tienden a tener un mejor pronóstico que los CD30 negativos (Barberio et al, 2007; Arulogun et al, 2008). Al comparar dentro del grupo de MF-TR los casos CD30+ y CD30-, nosotros no hallamos diferencias significativas en la supervivencia, siendo necesarios más estudios para clarificar esta situación. Simultáneamente, resulta de interés la observación de mayor inestabilidad genómica en los casos que involucran cabeza, cuello y extremidades inferiores respecto de tronco y extremidades superiores, dato a nuestro conocimiento, registrado por primera vez en este estudio, y que podría constituir un nuevo factor pronóstico en la patología. Asimismo, un mayor índice de replicación medido por Ki67 en los casos con AG sugiere que la presencia de desbalances genómicos en MF estaría asociada al aumento de la capacidad replicativa de esta patología. En este contexto, sabemos que el gen CDKN2A en condiciones fisiológicas actúa como un supresor tumoral, induciendo el arresto del ciclo celular a nivel de la fase G1. La pérdida de un alelo llevaría a su desregulación, promoviendo el desarrollo tumoral y confiriendo resistencia a la quimioterapia en linfomas experimentales murinos (Laharanne et al, 2010; van Doorn et al, 2009). Por su parte, la ganancia de 8q24 con aumento de la expresión de C-MYC, importante regulador del crecimiento y desarrollo celular, sugiere un rol crítico de los efectos proliferativos de este gen en la progresión de esta patología (Vermeer et al, 2008).

El análisis de nuestros datos mostró mayor frecuencia de AG en otras variables como edad, género, tamaño y ulceración de las lesiones, multifocalidad, niveles de B2M y LDH, recaídas, y presencia de adenopatías, no alcanzándose significación estadística, salvo una tendencia a la significación en el número de varones respecto de mujeres en el grupo

con AG, que podría estar relacionado a la preponderancia del género masculino en la patología. Si bien la mayoría de los trabajos publicados no evalúan estas variables, cabe destacar que en dos reportes de la literatura que analizaron este aspecto (Scarisbrick et al, 2001; Salgado et al, 2010) no detectaron correlación entre la pérdida alélica de 9p21 y variables como el sexo y la edad al diagnóstico en MF.

En relación a las características clínico-terapéuticas, la ausencia de respuesta favorable a los tratamientos empleados y la frecuencia de transformación histológica a linfoma de células grandes fueron significativamente más frecuentes en los casos con AG, asociados a menor supervivencia. Estos hallazgos indican un importante rol de los genes que se localizan en 9p21 y 8q24 en la patogénesis de la MF-T y su transformación, y sustentan los escasos datos reportados en la literatura (Scarisbrick, 2001; Navas et al, 2002; Salgado et al 2010; van Doorn et al, 2009; 2010a), permitiendo sugerir a estos desbalances genéticos como marcadores tumorales de progresión neoplásica en esta patología. La pérdida y/o mutaciones del locus CDKN2A/CDKN2B así como su silenciamiento por metilación del promotor han sido descritas en diferentes tumores sólidos y neoplasias hematológicas así como en tumores de piel (Pinyol et al, 1998; Roussel et al, 1999; van Doorn et al, 2005; Stanganelli et al, 2010), asociadas a pronóstico desfavorable. Dicha inactivación promueve la tumorigénesis y genera resistencia al tratamiento que podría ser explicada por defectos en la inducción de la apoptosis y senescencia en respuesta a la terapia (van Doorn et al, 2009). Por el contrario C-MYC es un gen que traduce para una oncoproteína que funciona como un factor de transcripción con múltiples genes blanco, particularmente en el ciclo celular participa de la inhibición de la proteína Rb generando así una estimulación de la capacidad proliferativa de la célula e induciendo defectos en la apoptosis (Ott et al, 2013). Asimismo, en la actualidad se considera que fallas en los procesos que mantienen la integridad genómica podrían contribuir a una amplia variedad de alteraciones genéticas en neoplasias, asociadas a inestabilidad cromosómica y pronóstico adverso (Blaveri et al, 2005; Caprini et al, 2009). Más recientemente, Salgado et al (2010) utilizando array-CGH pudieron diferenciar dos grupos de pacientes con MF, estables e inestables, teniendo en cuenta el patrón de alteraciones genéticas, encontrando peor evolución clínica en este último grupo.

---

El impacto pronóstico significativo de las alteraciones genómicas evaluadas permite sugerir la importancia de realizar un futuro análisis en el marco de estudios clínicos prospectivos a fin de determinar su valor pronóstico independiente. Su detección con metodologías como FISH y/o MLPA (*Multiplex ligation dependent-probe amplification*) durante el seguimiento podría ser usada para un monitoreo cercano de este grupo de pacientes permitiendo identificar a su vez subgrupos con evolución clínica más agresiva, que podrían beneficiarse con un diferente manejo clínico-terapéutico.

De esta manera, los hallazgos de estas AG en un porcentaje interesante de pacientes con MF refuerzan además la implicación de estas dos regiones en la patogénesis de los pacientes con MF en estadios avanzados. Al igual que en los trabajos discutidos, nosotros sugerimos que las pérdidas y ganancias cromosómicas pueden contribuir a un fenotipo más agresivo en esta patología; sin embargo, debido a la baja incidencia de estadios avanzados de MF y de otras variantes como la MF-F, la cantidad de pacientes analizados es limitada y se requiere mayor número de estudios tanto prospectivos como multicéntricos para validar esta observación. Adicionalmente nuestros hallazgos son los primeros resultados acerca de alteraciones genómicas en MF en Argentina, existiendo únicamente un reporte previo de nuestro laboratorio utilizando citogenética convencional que mostró alteraciones similares a las reportadas en la literatura, así como una asociación entre anomalías clonales y estadios avanzados de la enfermedad (Slavutsky et al, 1990). Asimismo nuestros resultados agregan nueva información sobre estos desbalances genómicos en la MF foliculotropa, siendo a nuestro entender la primera vez que se estudian en esta variante de MF hasta ahora reconocida como de mal pronóstico.

Por otra parte, efectuamos la evaluación de la expresión de miR-155. Nuestros resultados arrojaron sobreexpresión de este miRNA en los pacientes con MF en relación a lo observado en las muestras de enfermedades inflamatorias benignas cutáneas usadas como control. Tomando en cuenta el tipo histológico, dicha sobreexpresión se detectó en casi un tercio de las MF-F y en la cuarta parte de las MF-TR, con muy baja frecuencia en las MF-T, sugiriendo una relación entre las formas agresivas de MF y la presencia de un incremento en la expresión de este oncomiR.

---

En este aspecto, está ampliamente reconocida la participación de miR-155 en la oncogénesis (Eis et al, 2005; Fulci et al, 2007; O'Connell RM et al, 2010; Narducci et al, 2011; Persson, 2013), algunos autores han detectado expresión aberrante de varios miRNAs y hasta se ha propuesto un perfil de miRNA para ciertos tumores sólidos o neoplasias hematológicas (Zanette DL et al, 2007; Malumbres R et al, 2009; Navarro A et al, 2008; Robertus JL et al, 2010; Calin GA et al, 2002). Sin embargo, en los linfomas cutáneos primarios es poca la información existente en la literatura, sobretodo en relación a la transformación a linfoma T de células grandes (Ballabio E et al, 2010; van Kester et al, 2011). En este marco, nuestros hallazgos pueden representar un aporte que sustente una probable relación de miR-155 con la progresión y la transformación de MF (Ballabio et al, 2010; Ralfkiaer et al, 2011; Maj et al, 2012).

En cuanto a los niveles de expresión de miR-155, la literatura resulta aún contradictoria, algunos autores como Maj et al (2012) han reportado sobreexpresión de este gen tanto en estadios tempranos como avanzados de MF clásica en comparación con controles, mientras que en el estudio de Moyal et al (2013) sólo los estadios avanzados mostraron aumento de expresión de este miRNA. Diferentes reportes (Tili E et al 2009; Maj et al, 2012) sugieren que la sobreexpresión prolongada o sostenida puede llevar a proliferación incontrolada, inhibición de la apoptosis y transformación maligna, por lo que miR-155 podría ser un buen candidato en el posible enlace entre inflamación y carcinogénesis cutánea. Entre los linfomas T, la sobreexpresión de miR-155 ha sido detectada en el linfoma anaplásico de células grandes ALK negativo, y recientemente en MF-TR y MF-T (Laharanne et al, 2010b; van Kester et al, 2011). Además otros estudios en subpoblaciones de pacientes con LCCT observaron una expresión diferencial de miR-155 y miR-21 en pacientes con MF-T y SS, respectivamente (van der Fits et al, 2011; van Kester et al, 2011). De esta forma, han quedado de lado las variantes de MF probablemente debido a su menor incidencia; de ellas la MF-F es reconocida como agresiva y de peor pronóstico (Ralfkiaer et al, 2008), siendo actualmente este trabajo y el de Marosvári et al (2015) de reciente publicación los únicos al respecto. Ambos estudios concuerdan en la sobreexpresión de miR-155 en MF-F comparado con el grupo control, sin embargo, nosotros también hallamos incremento en la expresión de este miRNA en lesiones de MF-

TR, situación que sugeriría un rol para miR-155 en el proceso de transformación a linfoma T de células grandes.

Por su parte Ralfkiaer et al (2011) proponen otras combinaciones de expresión de miRNAs (miR-203, miR-205, miR-326, miR-663b y miR-711) para discriminar los LCCT de los procesos inflamatorios benignos tipo psoriasis, dermatitis atópica y dermatitis de contacto. Nosotros no incluimos los estadios tempranos en nuestro trabajo, debido a la dificultad para la obtención de un volumen tumoral suficiente para discriminar la expresión de miR-155 de las escasas células patológicas frente al extenso fondo inflamatorio linfoide, situación que puede enmascarar los resultados. Simultáneamente, al analizar la expresión de miR-155 según la presencia de AG (pérdida de 9p21 y ganancia de 8q24) encontramos que estaba incrementada en pacientes con estas anormalidades respecto del grupo sin ellas. A pesar de no hallarse diferencias significativas, a nuestro conocimiento, este sería el primer trabajo que estudia la relación entre miR-155 y estas AG en LCCT.

La combinación de los datos epidemiológicos, genéticos y de biología molecular ha mostrado que pueden requerirse múltiples cambios a nivel de los genes relacionados con la tumorigénesis de MF y la progresión a linfomas de mayor agresividad. La inestabilidad genómica que otorgan estos desbalances, junto con la implicación de la actividad oncogénica de algunos miRNAs hablaría de una alteración en eventos cruciales en la regulación del ciclo celular, apoptosis y proliferación celular, que harían a cierto tipo de pacientes con MF más susceptibles de tener un peor pronóstico. Es importante además mencionar que su posible utilidad diagnóstica particularmente en estadios tempranos resulta controversial, con autores como Ralfkiaer et al (2014) que proponen a miR-155 como parte de un panel de miRNAs que discriminarían a MF de los trastornos inflamatorios cutáneos; mientras que existen otros (Moyal et al, 2013) que niegan esta asociación.

Finalmente, en nuestra evaluación no hallamos asociación entre la sobreexpresión de miR-155 y los parámetros clínicos, terapéuticos y de laboratorio. La literatura muestra pocos trabajos que estudian la asociación de miRNAs con las características clínico-patológicas de los pacientes, uno de ellos es el realizado por Maj et al (2012) quienes



detectaron sobreexpresión de miR-155 en MF pero sin asociación con la supervivencia de los pacientes. Ellos mostraron que la alta expresión de otros miRNAs diferentes a miR-155 se asociaba a mejor pronóstico aunque tampoco alcanzaron significación estadística. Sin embargo, otras series como las de van Kester et al (2011) y Ralfkiaer et al (2011) sugieren la sobreexpresión de miR-155 como un marcador pronóstico en MF.

Nuestros datos y los reportados indican que miR-155 estaría involucrado en la progresión de esta patología, sustentando su rol en la linfomagénesis de la MF, siendo posible que, en un futuro, éste y otros miRNAs puedan servir como blancos terapéuticos en esta entidad. Sin duda, la realización de estudios con un número mayor de pacientes permitirá determinar con certeza la función de miR-155 en el proceso de transformación en sus diferentes estadios y variantes.

Los ensayos genéticos y moleculares continúan avanzando a través del tiempo, actuando hoy como información adicional a la clínica, la morfología y la inmunohistoquímica (Pimpinelli et al, 2005), y aunque no se pretende reemplazar los criterios diagnósticos, se van volviendo una opción prometedora para el mismo y fundamentalmente para la evaluación del pronóstico en esta patología. Así, las AG resultan potencialmente útiles para futuros algoritmos diagnósticos en MF y SS (Salgado et al, 2010); a su vez, el análisis del perfil de expresión de microRNAs son pruebas moleculares con un gran potencial diagnóstico y pronóstico para ser utilizado en la práctica médica cotidiana. En la actualidad ambas no son empleadas de rutina para evaluar el comportamiento de la enfermedad, y vemos que pueden ser un excelente aporte al intercambio multidisciplinario continuo entre el dermatólogo, el hematólogo, el patólogo/dermatopatólogo, y el genetista/biólogo molecular para realizar una adecuada interpretación de estas herramientas según el contexto clínico y maximizar el cuidado de nuestros pacientes.

## ***Conclusiones***

---

## 6. CONCLUSIONES

Teniendo en cuenta lo anteriormente expresado, los estudios efectuados en el presente trabajo permitieron arribar a las siguientes conclusiones:

- Nuestros resultados muestran una alta proporción de pérdidas de 9p21 y ganancias de 8q24 en pacientes con MF, particularmente en los casos de transformación a linfomas de células grandes y en la variante foliculotropa, asociando estas AG a los casos de peor pronóstico.
- La delección de *CDKN2A* fue más frecuente en las MF foliculotropas; mientras que la ganancia de *C-MYC* fue mayor en las MF transformadas.
- En nuestra serie el grupo con <25% de células CD30+ tuvo menos AG que el grupo con valor igual o mayor a dicho punto de corte.
- En relación a las características clínicas, las lesiones localizadas en cabeza, cuello y extremidades inferiores arrojaron mayor número de AG.
- La presencia de delección 9p21 y ganancia 8q24 estaría relacionada significativamente a un incremento en el índice de proliferación (Ki-67) y a menor sobrevida global.
- Si bien el número de micosis fungoide foliculotropa es reducido en nuestra serie, esta variante morfológica estaría asociada a una mayor frecuencia de AG y sobreexpresión de miR-155.
- No encontramos diferencias estadísticamente significativas entre la presencia de estas AG y la edad de los pacientes, la multifocalidad de las lesiones, su tamaño, la presencia de características ulcerativas, la recaída extracutánea, respuesta a la terapéutica y los niveles de B2M y LDH, así como tampoco en su comparación con los niveles de expresión de miR-155.
- La expresión de miR-155 está incrementada significativamente en la MF en comparación con los controles, apoyando su relación con la inestabilidad genómica y el desarrollo tumoral en esta patología.
- Estos hallazgos permiten sugerir a las AG evaluadas como probables factores pronóstico en la patología de importancia para la evaluación de riesgo genético, e

indican la necesidad de lograr combinaciones de marcadores que permitan establecer con mayor certeza la evolución clínica de los pacientes.

- Finalmente, consideramos que estos estudios pueden constituir un aporte para la profundización de la caracterización biológica y la comprensión de los mecanismos patogénicos de la MF, contribuyendo a un mejor manejo clínico-terapéutico de la patología.

## ***Bibliografía***

## 7. BIBLIOGRAFÍA

- Abeldaño A, Benedetti A, Maskin M, et al. Síndromes linfoproliferativos CD30+. Serie de 26 casos y revisión de la literatura. *Dermatol Argent* 2011; 17: 284-93.
- Andrade JH, Meiss R, Chuit R, et al. Linfomas cutáneos primarios en la República Argentina 2014. Disponible en: [www.redlinfomacutaneo.org.ar](http://www.redlinfomacutaneo.org.ar)
- Arulogun SO, Prince HM, Ng J, et al. Long-term outcomes of patients with advanced-stage cutaneous T-cell lymphoma and large cell transformation. *Blood* 2008; 112: 3082-7.
- Ballabio E, Mitchell T, van Kester MS, et al. MicroRNA expression in Sezary syndrome: identification, function, and diagnostic potential. *Blood* 2010; 116: 1105-13.
- Baltimore D, Boldin MP, O'Connell RM, et al. MicroRNAs: new regulators of immune cell development and function. *Nature Immunol* 2008; 9: 839-45.
- Banerjee A, Schambach F, DeJong CS, et al. Micro-RNA-155 inhibits IFN-gamma signaling in CD4+ T cells. *Eur J Immunol* 2010; 40: 225-31.
- Barberio E, Thomas L, Skowron F, et al. Transformed mycosis fungoides: clinicopathological features and outcome. *Br J Dermatol* 2007; 157: 284-9.
- Batista DA, Vonderheid EC, Hawkins A, et al. Multicolor fluorescence in situ hybridization (SKY) in mycosis fungoides and Sézary syndrome: Search for recurrent chromosome abnormalities. *Genes Chromosomes Cancer* 2006; 45: 383-91.
- Beà S, and Campo E. Secondary genomic alterations in non-Hodgkin's lymphomas: tumor-specific profiles with impact on clinical behavior. *Haematologica* 2008; 93: 641-5.
- Bellon M, Lepelletier Y, Hermine O, et al. Deregulation of microRNA involved in hematopoiesis and the immune response in HTLV-1 adult T-cell leukemia. *Blood* 2009; 113: 4917-7.
- Blaveri E, Brewer JL, Roydasgupta R, et al. Bladder cancer stage and outcome by array-based comparative genomic hybridization. *Clin Cancer Res* 2005; 11: 7012-22.
- Böni R, Xin H, Kamarashev J, et al. Allelic deletion at 9p21-22 in primary cutaneous CD30+ large cell lymphoma. *J Invest Dermatol* 2000; 115: 1104-7.
- Bradford PT, Devesa SS, Anderson WF, et al. Cutaneous lymphoma incidence patterns in the United States: a population-based study of 3884 cases. *Blood* 2009; 113: 5064-73.

- Brito-Babpulle V, Maljaie SH, Matutes E, et al. Relationship of T leukaemias with cerebriform nuclei to T-prolymphocytic leukaemia: a cytogenetic analysis with in situ hybridization. *Br J Haematol* 1997; 96: 724-32.
- Bunn PA Jr. and Lamberg SI. Report of the Committee on Staging and Classification of Cutaneous T-Cell Lymphomas. *Cancer Treatment Reports* 1979; 63: 725-8.
- Calin GA, Dumitru CD, Shimizu M, et al. Frequent deletions and down-regulation of micro- RNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002; 99: 15524-9.
- Calin GA, Sevignani C, Dumitru CD, et al. Human microRNA genes are frequently located at fragile sites and genomic regions involved in cancers. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004; 101: 2999–3004.
- Campbell JJ, Clark RA, Watanabe R, et al. Sezary syndrome and mycosis fungoides arise from distinct T-cell subsets: a biologic rationale for their distinct clinical behaviors. *Blood* 2010; 116: 767–71.
- Caprini E, Cristofolletti C, Arcelli D, et al. Identification of key regions and genes important in the pathogenesis of Sézary syndrome by combining genomic and expression microarrays. *Cancer Res* 2009; 69: 8438–46.
- Carissimi C, Fulci V, and Macino G. MicroRNAs: novel regulators of immunity. *Autoimmunity reviews* 2009; 8: 520-4.
- Caudron A, Marie-Cardine A, Bensussan A, et al. New developments in Sezary syndrome. *Ann Dermatol Venereol* 2012; 139: 31–40.
- Ceribelli A, Satoh M, and Chan EK. MicroRNAs and autoimmunity. *Curr Opin Immunol* 2012; 24: 686–91.
- Cerroni L, Gatter K, and Helmut K. *Skin lymphoma: The illustrated guide*. Third edition. Wiley-Blackwell. Oxford, 2009.
- Cetinozman F, Jansen PM, and Willemze R. Expression of Programmed Death-1 in primary cutaneous CD4-positive small/medium-sized pleomorphic T-cell lymphoma, cutaneous pseudo-T-cell lymphoma, and other types of cutaneous T-cell lymphoma. *Am J Surg Pathol*. 2012; 36:109–16.
- Chudnovsky Y, Khavari PA and Adams AE. Melanoma genetics and the development of rational therapeutics. *J Clin Invest* 2005; 115: 813-24.
- Cordel N, Lenormand B, Courville P, et al. Usefulness of cutaneous T-cell clonality analysis for the diagnosis of cutaneous T-cell lymphoma in patients with erythroderma. *Arch Pathol Lab Med* 2005; 129: 372-6.

- Dang CV, O'Donnell KA, Zeller KI, et al. The c-MYC target gene network. *Sem Cancer Biol* 2006; 16: 253-64.
- Davidson-Moncada J, Papavasiliou FN, and Tam W. MicroRNAs of the immune system: roles in inflammation and cancer. *Annals of the New York Acad Sci* 2010; 1183: 183-94.
- Dereure O, Levi E, Vonderheid EC, et al. Infrequent Fas mutations but no Bax or p53 mutations in early mycosis fungoides a possible mechanism for the accumulation of malignant T lymphocytes in the skin. *J Invest Dermatol* 2002; 118: 949-56.
- Diamandidou E, Colome-Grimmer M, Fayad L, et al. Transformation of mycosis fungoides/Sezary syndrome: clinical characteristics and prognosis. *Blood* 1998; 92: 1150-9.
- Duro D, Bernard O, Della Valla V, et al. A new type of p16 gene transcript expression in B-cell malignancies. *Oncogene* 1995; 11: 11-29.
- Edinger JT, Clark BZ, Pucevich BE, et al. CD30 expression and proliferative fraction in nontransformed mycosis fungoides. *Am J Surg Pathol*. 2009; 33: 1860-8.
- Eis PS, Tam W, Sun L et al. Accumulation of miR-155 and BIC RNA in human B-cell lymphomas. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005; 102: 3627-32.
- Fischer TC, Gellrich S, Muche JM, et al. Genomic aberrations and survival in cutaneous T cell lymphomas. *J Invest Dermatol* 2004; 122: 579-86.
- Fulci V, Chiaretti S, Goldoni M, et al. Quantitative technologies establish a novel microRNA profile of chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2007; 109: 4944-51.
- Fulci V, Colombo T, Chiaretti S, et al. Characterization of B- and T-lineage acute lymphoblastic leukemia by integrated analysis of MicroRNA and mRNA expression profiles. *Genes Chromosomes Cancer* 2009; 48: 1069-82.
- Garzon R, Calin G and Croce CM. MicroRNAs in cancer. *Annu Rev Med* 2009; 60: 167-79.
- Gerami P, Rosen S, Kuzel T, et al. Folliculotropic mycosis fungoides: an aggressive variant of cutaneous T-cell lymphoma. *Arch Dermatol* 2008; 144: 738-46.
- Ghisi M, Corradin A, Basso K, et al. Modulation of microRNA expression in human T-cell development: targeting of NOTCH3 by miR-150. *Blood* 2011; 117: 7053-62.
- Goeldel AL, Cornillet-Lefebvre P, Durlach A, et al. T-cell receptor gamma gene rearrangement in cutaneous T-cell lymphoma: comparative study of polymerase chain reaction with denaturing gradient gel electrophoresis and GeneScan analysis. *B J Dermatol*. 2010; 162: 822-9.



- Gracias DT, Stelekati E, Hope JL, et al. The microRNA miR-155 controls CD8 (+) T cell responses by regulating interferon signaling. *Nature Immunol* 2013; 14: 593-602.
- Herrmann JL, and Hughey LC. Recognizing large-cell transformation of mycosis fungoides. *J Am Acad Dermatol* 2012; 67: 665-72.
- Hoffman B, and Liebermann DA. Apoptotic signaling by c-MYC. *Oncogene* 2008; 27: 6462-72.
- Holland PM, Abramson RD, Watson R, et al. Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5'---3' exonuclease activity of *Thermus aquaticus* DNA polymerase. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; 88: 7276-80.
- Iorio MV, and Croce CM. MicroRNAs in cancer: small molecules with a huge impact. *J Clin Oncol* 2009; 27: 5848-56.
- Iqbal J, Liu ZF, Deffenbacher K, et al. Gene expression profiling in lymphoma diagnosis and management. *Best Pract Res Clin Haematol* 2009; 22: 191–210.
- Karenko L, Hyytinen E, Sarna S, et al. Chromosomal abnormalities in cutaneous T-cell lymphoma and in its premalignant conditions as detected by G-banding and interphase cytogenetic methods. *J Invest Dermatol* 1997; 108: 22–9.
- Karenko L, Kahkonen M, Hyytinen ER, et al. Notable losses at specific regions of chromosomes 10q and 13q in the Sezary syndrome detected by comparative genomic hybridization. *J Invest Dermatol* 1999; 112: 392–5.
- Karenko L, Sarna S, Kähkönen M, and Ranki A. Chromosomal abnormalities in relation to clinical disease in patients with cutaneous T-cell lymphoma: a 5-year follow-up study. *Clin Lab Invest* 2003; 148: 55-64.
- Kempf W, Ostheeren-Michaelis S, Paulli M, et al. Granulomatous mycosis fungoides and granulomatous slack skin: a multicenter study of the Cutaneous Lymphoma Histopathology Task Force Group of the European Organization for Research and Treatment of Cancer (EORTC). *Arch Dermatol* 2008; 144: 1609–17.
- Kempf W, Kazakov DV and Kerl K. Cutaneous lymphomas: an update. Part 1: T-cell and Natural killer/T-cell lymphomas and related conditions. *Am J Dermatopathol* 2014; 36: 105-23.
- Kluiver J, Poppema S, de Jong D, et al. BIC and miR-155 are highly expressed in Hodgkin, primary mediastinal and diffuse large B cell lymphomas. *J Pathol* 2005; 207: 243–49.
- Kopp KL, Ralfkiaer U, Gjerdrum LM, et al. STAT5-mediated expression of oncogenic miR-155 in cutaneous T-cell lymphoma. *Cell Cycle* 2013; 12: 1939-47.

- Krol J, Loedige I, and Filipowicz W. The widespread regulation of microRNA biogenesis, function and decay. *Nat Rev Genet* 2010; 11: 597–610.
- Laharanne E, Chevret E, Idrissi Y, et al. CDKN2A-CDKN2B deletion defines an aggressive subset of cutaneous T-cell lymphoma. *Modern Pathol* 2010a; 23: 547-58.
- Laharanne E, Oumouhou N, Bonnet F, et al. Genome-wide analysis of cutaneous T-cell lymphomas identifies three clinically relevant classes. *J Invest Dermatol* 2010b; 130: 1707–18.
- Lehman JS, Cook-Norris RH, Weed BR, et al. Folliculotropic mycosis fungoides: single-center study and systematic review. *Arch Dermatol* 2010; 146: 607–13.
- Lenz G, Wright GW, Emre NCT, et al. Molecular subtypes of diffuse large B-cell lymphoma arise by distinct genetic pathways. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008; 105: 13520–5.
- Limon J, Nedoszytko B, Brozek I, et al. Chromosome aberrations, spontaneous SCE and growth kinetics in PHA-stimulated lymphocytes in 5 cases of Sezary syndrome. *Cancer Genet Cytogenet* 1995; 83: 75-81.
- Lionetti M, Biasiolo M, Agnelli L, et al. Identification of microRNA expression patterns and definition of a microRNA/mRNA regulatory network in distinct molecular groups of multiple myeloma. *Blood* 2009; 114: e20–e26.
- Lu L-F, Boldin MP, Chaudhry A, et al. Function of miR-146a in controlling Treg cell-mediated regulation of Th1 responses. *Cell* 2010; 142: 914-29.
- Lujambio A, and Lowe SW. The microcosmos of cancer. *Nature* 2012; 482: 347–55.
- Magro CM, Crowson AN, and Mihm MC. The cutaneous lymphoid proliferations: A comprehensive textbook of lymphocytic infiltrates of the skin. John Wiley & Sons, Inc. Hoboken, New Jersey 2007.
- Maj J, Jankowska-Konsur A, Sadakiewska-Chudy A, et al. Altered microRNA expression in mycosis fungoides. *Br J Dermatol* 2012; 166:331–6.
- Malumbres R, Sarosiek KA, Cubedo E, et al. Differentiation stage specific expression of microRNAs in B lymphocytes and diffuse large B-cell lymphomas. *Blood* 2009; 113: 3754–64.
- Manfe V, Biskup E, Rosbjerg A, et al. miR-122 regulates p53/Akt signaling and the chemotherapy-induced apoptosis in cutaneous T-cell lymphoma. *PLoS One* 2012; 7: e29541.

- Mansour MR, Sanda T, Lawton LN, et al. The TAL1 complex targets the FBXW7 tumor suppressor by activating miR-223 in human T cell acute lymphoblastic leukemia. *J Exp Med* 2013; 210: 1545-57.
- Mao X, Lillington D, Scarisbrick JJ, et al. Molecular cytogenetic analysis of cutaneous T-cell lymphomas: identification of common genetic alterations in Sezary syndrome and mycosis fungoides. *Br J Dermatol* 2002; 147:464–75.
- Mao X, Lillington D, Czepulkowski B, et al. Molecular cytogenetic characterization of Sezary syndrome. *Genes Chromosomes Cancer* 2003; 36: 250–60.
- Mao X, Orchard G, Vonderheid EC, et al. Heterogeneous abnormalities of CCND1 and RB1 in primary cutaneous T-cell lymphomas suggesting impaired cell cycle control in disease pathogenesis. *J Invest Dermatol* 2006; 151: 546–56.
- Marosvári D, Téglási V, Csala I, et al. Altered microRNA expression in folliculotropic and transformed mycosis fungoides. *Pathol Oncol Res* 2015. DOI 10.1007/s12253-015-9897-8.
- Massone C, Crisman G, Kerl H, et al. The prognosis of early mycosis fungoides is not influenced by phenotype and T-cell clonality. *Br J Dermatol* 2008; 159: 881–6.
- McNeil N, and Ried T. Novel molecular cytogenetic techniques for identifying complex chromosomal rearrangements: technology and applications in molecular medicine. *Expert Rev Mol Med* 2000; ISSN 1462-3994.
- Mishra A and Garzon R. The (miR)e of CTCL. *Blood* 2014; 123:1438.
- Moyal L, Barzilai A, Gorovitz B, et al. miR-155 is involved in tumor progression of mycosis fungoides. *Exp Dermatol* 2013; 22: 417-37.
- Muniesa C, Estrach T, Pujol RM, et al. Folliculotropic mycosis fungoides: clinicopathological features and outcome in a series of 20 cases. *J Am Acad Dermatol* 2010; 62: 418-26.
- Munker R and Calin GA. MicroRNA profiling in cancer. *Clin Sci* 2011; 121: 141-58.
- Narducci MG, Scala E, Bresin A, et al. Skin homing of Sezary cells involves SDF-1-CXCR4 signaling and down-regulation of CD26/dipeptidylpeptidase IV. *Blood* 2006; 107: 1108-15.
- Narducci MG, Arcelli D, Picchio MC, et al. MicroRNA profiling reveals that miR-21, miR486 and miR-214 are upregulated and involved in cell survival in Sezary syndrome. *Cell Death Dis* 2011; 2: e151.
- Navarro A, Gaya A, Martinez A, et al. MicroRNA expression profiling in classic Hodgkin lymphoma. *Blood* 2008; 111: 2825–32.

- Navarro A, Beá S, Fernández V, et al. MicroRNA expression, chromosomal alterations, and immunoglobulin variable heavy chain hypermutations in Mantle cell lymphomas. *Cancer Res* 2009; 69: 7071–8.
- Navas IC, Algara P, Mateo M, et al. p16(INK4a) is selectively silenced in the tumoral progression of mycosis fungoides. *Lab Invest* 2002; 82: 123–32.
- Ng SB, Yan J, Huang G, et al. Dysregulated microRNAs affect pathways and targets of biologic relevance in nasal-type natural killer/T-cell lymphoma. *Blood* 2011; 118: 4919–29.
- Nowell PC, Finan JB, and Vonderheid EC. Clonal characteristics of cutaneous T-cell lymphomas: cytogenetic evidence from blood, lymph nodes and skin. *J Invest Dermatol* 1982; 78: 69–75.
- O’Connell RM, Rao DS, Chaudhuri AA, et al. Sustained expression of microRNA-155 in hematopoietic stem cells causes a myeloproliferative disorder. *J Exp Med* 2008; 205: 585–94.
- O’Connell RM, Rao DS, Chaudhuri AA, et al. Physiological and pathological roles for microRNAs in the immune system. *Nat Rev Immunol* 2010; 10: 111–22.
- Olsen E, Vonderheid E, Pimpinelli N, et al. Revisions to the staging and classification of mycosis fungoides and Sezary syndrome: a proposal of the International Society for Cutaneous Lymphomas (ISCL) and the cutaneous lymphoma task force of the European Organization of Research and Treatment of Cancer (EORTC). *Blood* 2007; 110: 1713–22.
- Ott G, Rosenwald A, Campo E. Understanding MYC-driven aggressive B-cell lymphomas: pathogenesis and classification. *American Society of Hematology. From Blood* 2013; 122: 575–83.
- Persson JL. miR-155 meets the JAK/STAT pathway. *Cell Cycle* 2013; 12: 2170.
- Pimpinelli N, Olsen EA, Santucci M, et al. Defining early mycosis fungoides. *J Am Acad Dermatol* 2005; 53: 1053–63.
- Pinyol M, Cobo F, Beá S, et al. p16(INK4a) gene inactivation by deletions, mutations, and hypermethylation is associated with transformed and aggressive variants of non-Hodgkin’s lymphomas. *Blood* 1998; 91: 2977–84.
- Prathapam T, Tegen S, Oskarsson T, et al. Activated Src abrogates the Myc requirement for the G0/G1 transition but not for the G1/S transition. *PNAS* 2006; 103: 2695–700.
- Prochazkova M, Chevret E, Mainhaguiet G, et al. Common chromosomal abnormalities in mycosis fungoides transformation. *Genes Chromosomes Cancer* 2007; 46: 828–38.

- Qin Y, Buermans HP, van Kester MS, et al. Deep-sequencing analysis reveals that the miR-199a2/214 cluster within DN3os represents the vast majority of aberrantly expressed microRNAs in Sezary syndrome. *J Invest Dermatol* 2012; 132: 1520-2.
- Quintanilla-Martinez L, Jansen PM, Kinney MC, et al. Non-mycosis fungoides cutaneous T-cell lymphomas: report of the 2011 Society for Hematopathology/European Association for Haematopathology Workshop. *Am J Clin Pathol* 2013; 139: 491-514.
- Ralfkiaer E, Cerroni L, Sander CA, et al. Mycosis fungoides. In: Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, et al (eds). WHO Classification of tumors of haematopoietic and lymphoid tissues. International Agency for Research on Cancer Press: Lyon, France, 2008a. pp. 296-8.
- Ralfkiaer E, Willemze R, and Whittaker SJ. Sézary syndrome. In: Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, et al (eds). WHO Classification of tumors of haematopoietic and lymphoid tissues. International Agency for Research on Cancer Press: Lyon, France, 2008b. pp. 299.
- Ralfkiaer U, Hagedorn PH, Bangsgaard N, et al. Diagnostic microRNA profiling in cutaneous T-cell lymphoma. *Blood* 2011; 118: 5891-900.
- Ralfkiaer U, Lindahl LM, Litman T, et al. MicroRNA expression in early micosis fungoides is distinctly different from atopic dermatitis and advanced cutaneous T-cell lymphoma. *Anticancer Res* 2014; 34:7207-17.
- Redon R, Fitzgerald T, and Carter NP. Comparative genomic hybridization: DNA labeling, hybridization and detection. *Methods Mol Biol* 2009; 529: 267-78.
- Robertus JL, Kluiver J, Weggemans C, et al. MiRNA profiling in B non-Hodgkin lymphoma: a MYC-related miRNA profile characterizes Burkitt lymphoma. *Br J Haematol* 2010; 149: 896-9.
- Roccaro AM, Sacco A, Chen C, et al. MicroRNA expression in the biology, prognosis, and therapy of Waldenström macroglobulinemia. *Blood* 2009a; 113, 4391-402.
- Roccaro AM, Sacco A, Thompson B, et al. MicroRNAs 15a and 16 regulate tumor proliferation in multiple myeloma. *Blood* 2009b; 113: 6669-80.
- Roussel MF. The INK4 family of cell cycle inhibitors in cancer. *Oncogene* 1999; 18: 5311-17.
- Russell-Jones R, Whittaker S. Sezary syndrome: diagnostic criteria and therapeutic options. *Semin Cut Med Surg* 2000; 19: 100-8.
- Saki N, Abroun S, Soleimani M, et al. Involvement of MicroRNA in T-cell differentiation and malignancy. *Int J Hematol Oncol and Stem Cell Research* 2015; 9: 33-49.

- Sakurai K, Furukawa C, Haraguchi T, et al. MicroRNAs miR-199a-5p and -3p target the Brm subunit of SWI/SNF to generate a double-negative feedback loop in a variety of human cancers. *Cancer Res* 2011; 71: 1-10.
- Salaun B, Yamamoto T, Badran B, et al. Differentiation associated regulation of microRNA expression in vivo in human CD8+ T cell subsets. *J Translat Med* 2011; 9: 44.
- Salaverria I, Zettl A, Beà S, et al. Specific secondary genetic alterations in mantle cell lymphoma provide prognostic information independent of the gene expression-based proliferation signature. *J Clin Oncol* 2007; 25: 1216-22.
- Salgado R, Servitje O, Gallardo F, et al. Oligonucleotide array-CGH identifies genomic subgroups and prognostic markers for tumor stage mycosis fungoides. *J Invest Dermatol* 2010; 130: 1126-35.
- Scarlsbrick JJ, Woolford AJ, Russell-Jones R, et al. Allelotyping in mycosis fungoides and Sezary syndrome: common regions of allelic loss identified on 9p, 10q, and 17p. *J Invest Dermatol* 2001; 117: 663-70.
- Scarlsbrick JJ, Woolford AJ, Calonje E, et al. Frequent abnormalities of the p15 and p16 genes in mycosis fungoides and Sézary syndrome. *J Invest Dermatol* 2002; 118: 493-99.
- Sharpless NE, and DePinho RA. The INK4A/ARF locus and its two gene products. *Curr Opin Genet Dev* 1999; 9: 22-30.
- Slavutsky I, Fernández Alonso GI, Bengiό R, et al. Estudio colaborativo de linfomas cutáneos. *Rev.Arg Dermatol* 1990; 71: 199-208.
- Stanganelli C, Arbelbide J, Fantl D, et al. DNA-methylation analysis of tumor suppressor genes in monoclonal gammopathy of undetermined significance. *Ann Hematol* 2010; 89: 191-9.
- Thangavelu M, Finn WG, Yelavarthi KK, et al. Recurring structural chromosome abnormalities in peripheral blood lymphocytes of patients with mycosis fungoides/Sezary syndrome. *Blood* 1997; 89: 3371-7.
- Tili E, Croce CM, and Michaille JJ. MiR-155: on the crosstalk between inflammation and cancer. *Int Rev Immunol* 2009; 28:264-84.
- Tomita M, Tanaka Y, and Mori M. MicroRNA miR-146a is induced by HTLV-1 tax and increases the growth of HTLV-1 infected T-cells. *Int J Cancer* 2012; 130: 2300-9.
- Tsitsiou E, Lindsay MA. MicroRNAs and the immune response. *Current opinion in pharmacology* 2009; 9: 514-20.

- van der Fits L, van Kester MS, Qin Y, et al. MicroRNA-21 expression in CD4+ T cells is regulated by STAT3 and is pathologically involved in Sézary Syndrome. *J Invest Dermatol* 2011; 131: 762-68.
- van Doorn R, Van Haselen CW, van Voorst Vader PC, et al. Mycosis fungoides: disease evolution and prognosis of 309 Dutch patients. *Arch Dermatol* 2000; 136: 504-10.
- van Doorn R, Scheffer E, and Willemze R. Follicular mycosis fungoides, a distinct disease entity with or without associated follicular mucinosis: a clinicopathologic and follow-up study of 51 patients. *Arch Dermatol* 2002; 138: 191-8.
- van Doorn R, Gruis NA, Willemze R, et al. Aberrant DNA methylation in cutaneous malignancies. *Semin Oncol* 2005; 32: 479-87.
- van Doorn R, van Kester MS, Dijkman R, et al. Oncogenomic analysis of mycosis fungoides reveals major differences with Sezary syndrome. *Blood* 2009; 113: 127-36.
- van Kester MS, Ballabio E, Benner MF, et al. miRNA expression profiling of mycosis fungoides. *Mol Oncol* 2011; 5: 273-80.
- Vermeer MH, van Doorn R, Dijkman R, et al. Novel and highly recurrent chromosomal alterations in Sezary syndrome. *Cancer Res* 2008; 68: 2689-98.
- Visone R, and Croce CM. MiRNAs and cancer. *Am J Pathol* 2009; 174: 1131-8.
- Watanabe A, Tagawa H, Yamashita J, et al. The role of microRNA-150 as a tumor suppressor in malignant lymphoma. *Leukemia* 2011; 25: 1324-34.
- Whang-Peng J, Bunn PA Jr, Knutsen T, et al. Clinical implications of cytogenetic studies in cutaneous T-cell lymphoma. *Cancer* 1982; 50: 1539-53.
- Willemze R, Jaffe ES, Burg G, et al. WHO-EORTC classification for cutaneous lymphomas. *Blood* 2005; 105: 3768-85.
- Wilcox RA. Cutaneous T-cell lymphoma: 2011 update on diagnosis, risk stratification, and management. *Am J Hematol* 2011; 86: 928-48.
- Wilson LD, Hinds GA, and Yu JB. Age, race, stage, and incidence of cutaneous lymphoma. *Clinical Lymphoma, Myeloma & Leukemia* 2012; 12: 291-6.
- Wong HK, Mishra A, Hake T, et al. Evolving insights in the pathogenesis and therapy of cutaneous T-cell lymphoma (mycosis fungoides and Sezary syndrome). *Br J Haematol* 2011; 155: 150-66.

Zhang C, Toulev A, Kamarashev J, et al. Consequences of p16 tumor suppressor gene inactivation in mycosis fungoides and Sezary syndrome and role of the bmi-1 and ras oncogenes in disease progression. *Hum Pathol* 2007; 38: 995-1002.

Zhao JJ, Lin J, Lwin T, et al. MicroRNA expression profile and identification of miR-29 as a prognostic marker and pathogenetic factor by targeting CDK6 in mantle cell lymphoma. *Blood* 2010; 115: 2630–9.