

UNIVERSITAT AUTÒNOMA DE BARCELONA

FACULTAT DE BIOCIÈNCIES

Departament de Biologia Animal, de Biologia Vegetal i d'Ecologia



TESIS DOCTORAL

**CARACTERIZACIÓN GENÉTICA DE LA MICOSIS
FUNGOIDE TUMORAL**

Memoria presentada por Rocío Nieves Salgado Sánchez para optar al grado de Doctora en Ciencias (Biología) por la Universitat Autònoma de Barcelona

Directores

Dra. Blanca Espinet Solà

Dr. Ramon M. Pujol Vallverdú

Bellaterra, 2011

La Dra. Blanca Espinet Solà, adjunta del Laboratorio de Citogenética Molecular, Servicio de Patología del Hospital del Mar de Barcelona y el Dr. Ramon Maria Pujol Vallverdú, jefe del Servicio de Dermatología, del Hospital del Mar de Barcelona,

CERTIFICAN:

Que Rocío Nieves Salgado Sánchez ha realizado, bajo su dirección, el trabajo “Caracterización genética de la micosis fungoide tumoral” para optar al grado de Doctora en Ciencias (Biología).

Este trabajo ha sido realizado en el laboratorio de Citogenética Molecular, Servicio de Patología del Hospital del Mar de Barcelona.

Bellaterra, 2011

Dra. Blanca Espinet Solà

Dr. Ramon Maria Pujol Vallverdú

Rocío Nieves Salgado Sánchez

**A mis padres
A Carlos**

Agradecimientos

Todavía no me creo que esté escribiendo el apartado de agradecimientos de mi tesis doctoral. Así que en las siguientes líneas intentaré darles las gracias a todas las personas que me han ayudado, tanto a nivel personal como profesional, durante los últimos 6 años de mi vida. Y sois tantas las personas a las que aprecio y quiero, que seguro que me olvido de alguien, espero no me lo tengáis en cuenta.

En primer lugar me gustaría darle las gracias al destino, sin él hubiese sido imposible que yo llegara a Barcelona y menos aún, que yo llegara a escribir estas líneas.

A Kiko, te doy las gracias por darme la oportunidad de formar parte de este laboratorio y vivir una de las experiencias más intensas de mi vida. Gracias por confiar en mí y por tus palabras de apoyo en todos los momentos que lo he necesitado.

A Blanca, por acogerme con los brazos abiertos (cuando llegué por primera vez a este laboratorio un día 4 de abril del año 2005), por confiar en mí con los ojos cerrados, por luchar tanto por mí a todos los niveles, por tus consejos profesionales y personales, y tus palabras en algunos momentos difíciles. Hemos vivido muchos momentos intensos: denegación de becas pero también concesión de otras; congresos, en especial el de Argentina (nunca lo olvidaré); meriendas (siempre me acordaré de aquel cumpleaños en el que soplé las velas en tu casa junto con tus niños); las tardes de tenis (y por tanto de nuestro profe, jejeje, su vestuario es imposible de olvidar). Simplemente darte las gracias por todo.

A Ramon Pujol, por confiar en mí y darme la oportunidad de formar parte de muchos de los proyectos de cáncer cutáneo. Por tener siempre un hueco (aunque sea en la cafetería) para escucharme (es muy enriquecedor hablar y discutir de muchos temas contigo); por corregirme artículos, becas y esta tesis durante tus fines de semana y a horas intempestivas. Por todo ello, muchas gracias. También hago extensivo este agradecimiento a todo el servicio de dermatología, concretamente a todas las personas con las que he tenido oportunidad de trabajar: Mireia Yébenes, Montse Gilaberte, Gemma Martín-Ezquerro, Fernando Gallardo, Sonia Segura, Jùlia Sánchez-Schmidt. Y en especial a Agustí Toll, y aunque suene repetitivo, gracias por ayudarme en muchos de los proyectos, y sobre todo por confiar en mí. Finalmente, darle las

gracias a Octavio Servitje, Teresa Estrach, María Pilar García-Muret y Cristina Muniesa por su paciencia y por ayudarme en todo lo que he necesitado.

A las becarias. A las de mi primera etapa de becaria: Carlota, Cris y Olaya, muchas gracias por enseñarme algunas técnicas en mis primeros pasos en el laboratorio. En especial a Olaya, supongo que por ser de fuera de Barcelona, me entendías en algunos momentos de añoranza de nuestras respectivas tierras, gracias por estar ahí. Y a las de mi segunda etapa: Mar, Vera y Anna P. Mar (compañera incansable de los “miles” de cursos de FISH de Celgene) mucho ánimo para la recta final que aunque parezca que no, al final todo llega. Vera y Anna P., mucho ánimo para el duro pero enriquecedor camino que empezáis.

A todas las técnicas y adjuntas a las que he incordiado en algún momento durante estos 6 años, que no sois pocas también os doy las gracias: Carme (aprender la citogenética convencional y el FISH sin ti, no hubiese sido lo mismo), Rosa Mari (cuantas veces me has tenido que ayudar a sacar el anillo de linfos o responderme la misma pregunta durante un montón de veces), María (por ayudarme a responderme mis preguntas con autorespuesta), Ester (contigo aprendí el FISH en parafina, fíjate si no ha llovido...), Érica y Mercé (por buscarme bloques de OCT y cortarme unos cuantos), Raquel (por mis preguntas masivas sobre las cuantis), Bea Bellosillo (por hacerme un hueco en tu apretada para hablar de miRNAs), Tere Baró (primero por tu paciencia, segundo por hacerme muchas de las inmunos que tuve que hacer al principio, y tercero por enseñarme a hacerlas), Luz (por nuestros momentos Lu-Ché de viernes por la tarde) y Gemma (mi pareja de las sesiones bibliográficas).

A las citólogas: Lourdes Florensa, Encarna, Anna Ferrer y Leo. Lourdes me encanta tu positividad ante todas las adversidades y porque contigo es imposible que no pensemos en nuestras suegras.

Al resto de personas que estáis en el laboratorio. Secres: Asun, molas un montón. Como me gusta hablar contigo de cualquier cosa, y lo que más tu simpatía cuando voy a coger un boli del armario, jejejeje, o cuando voy a recoger algún albarán del IMIM...jejeje. Nos queda pendiente la partidita de pádel-playa!!!; Anna Chica, por tu paciencia cada vez que te incordio con algún fax o algún escaneo; Juani, se te echa de

menos por abajo. Técnicos: Montse, Rosa, Isa, Tania, Judith, y las chicas de molecular. A todas vosotras gracias por estar ahí y por ayudarme siempre que lo he necesitado.

A mis amigas-compañeras de trabajo: Eulàlia (Putxi), Cris, Blanca, Laura, Silvia y Laia. Chicas, hemos compartido muchos momentos divertidos y me habéis apoyado en muchos momentos malos que he tenido durante estos 6 años!!. Las visitas a Puig-Rubí, las visitas a la piscina de Blanca.... A las chicas de hemato (Putxi, Cris, Blanca y Laura) por compartir muchos viajes con vosotras que nunca olvidaré (Pamplona, Leuven, San Francisco). Silvia por ser la última superviviente conmigo. Laia, por escucharme siempre y aconsejarme; por compartir conmigo la pasión por el volei (me he quedado con las ganas de apuntarme al torneo 4x4 contigo!!), por hacerme sentir como en casa cada vez que he ido a tu casa. Noies, que us estimo!!!

A mis amigas-compañeras de trabajo-subterráneas: Marta Salido, Ana B., María (Mery-Me) y Raquel. Chicas! Os quiero, y le tengo que echar la culpa al volei, jejejej. Marta, gracias por todo, por todo lo que he podido aprender a nivel laboral y por todos los momentos divertidos que hemos vivido y nos quedan por vivir dentro y fuera del labo. Ana B., cómo te estoy echando de menos en estos últimos meses que me quedan de becaria, nuestras conversaciones, y lo que más nuestras risas de viernes a última hora con la Pepi!!!!, aayyy cabeza-pollo, jejejeje. Mery-Me, por estar ahí cada día, por echarme un cable siempre que lo he necesitado (eres la persona que no sabe decir que no), por tus palabras, tus consejos y tu cariño diario, por todo eso muchísimas gracias. A Raquel (Rachel, Reich), simplemente por ser como eres. No sabes lo contenta que estoy de que un día se fundara los subterráneos y me haya dado la oportunidad de conocerte. Gracias por ayudarme siempre que lo hemos necesitado sin dudar ni un segundo (sin tu bólide no sé cómo habríamos hecho la mudanza...).

A mis amigas de Pamplona: Lau y Bar. ¿Qué haría yo sin vosotras? Gracias por estar ahí, por escucharme y aconsejarme. Es muy tranquilizador saber que aunque nos veamos poco, seguís y seguiréis ahí para el resto de nuestras vidas (que tenemos que acabar en Cantabria y compartiendo jardín, no os olvidéis!!!). Aunque ya lo sabéis, os quiero un montón. Y a mis amigas de Almería: Erea, Azahara, Mar, Ana y Rocío. Que aunque estemos a casi mil kilómetros de distancia, sé que puedo contar con vosotras.

A la Fundació IMIM por su ayuda para la encuadernación de esta tesis doctoral.

A mis padres, Walter y Sara, por apoyarme y no dejarme tirar la toalla en alguno de mis momentos de duda durante este largo camino. Gracias por estar ahí. A mi tía Chela, siempre que te he necesitado no has dudado un minuto en venir a ayudarme/nos. A mis hermanos: Juanma, Rafa y Sari; simplemente deciros que os quiero y que estoy muy orgullosa de ser hermana vuestra. Os quiero familia!!!.

A mi familia, los Rodriguez Gómez (suegros, tíos, primos y abuela), por hacerme sentir tan bien y tan querida. En especial a mis suegros, Pili y Paco, solo deciros que gracias por todo y que os quiero un montón.

A Carlos, por apoyarme, por aguantarme, por ayudarme (“asunto del mail: imagen a 300x300 dpi”, jejeje), por quererme, por hacer que me sienta especial. En este punto, me gustaría volver a mencionar al destino, y le doy las gracias por habernos ayudado a que nuestras vidas se encontraran. No concibo ni mi presente ni mi futuro sin ti. Te quiero!!!

Índice

INDICE	I
GLOSARIO DE ABREVIATURAS	VII
RELACIÓN DE TABLAS	XIII
RELACIÓN DE FIGURAS	XVII
INTRODUCCIÓN	1
1. LINFOMAS CUTÁNEOS	3
1.1 Linfomas cutáneos primarios de células T	4
1.1.1 Clasificación de los linfomas primarios cutáneos de células T	5
2. MICOSIS FUNGOIDE/SÍNDROME DE SÉZARY	8
2.1 Epidemiología	9
2.2 Características clínicas: presentación clínica, estadiaje y manejo terapéutico	9
2.3 Características histológicas, inmunofenotípicas y genotípicas	13
2.4 Etiopatogenia	15
3. OTROS LINFOMAS CUTÁNEOS PRIMARIOS DE CÉLULAS T	19
3.1 Papulosis linfomatoide	20
3.2 Linfoma cutáneo anaplásico de células grandes CD30+	22
4. TÉCNICAS CITOGENÉTICAS Y MOLECULARES APLICADAS AL ESTUDIO DE LOS LCPCT	24
4.1 Hibridación <i>in situ</i> fluorescente	24
4.1.1 Tipos de sondas	27
4.1.2 Sondas no comerciales	28
4.2 Técnica de microarrays	28
4.2.1 Microarrays de hibridación genómica comparada (BACs, Oligos, SNPs)	29
4.3 Técnicas para el análisis de la inestabilidad cromosómica	31
5. CARACTERÍSTICAS BIOLÓGICAS Y MOLECULARES DE LOS LCPCT	32
5.1 Perfil genético de la micosis fungoide	32
5.2 Perfil genético del síndrome de Sézary	36
5.3 Perfil genético de los procesos linfoproliferativos cutáneos primarios de células T CD30+	38
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	43

MATERIAL Y MÉTODOS	47
1. MATERIAL	49
1.1 Selección de pacientes y controles	49
2. MÉTODOS	50
2.1 Microarrays de hibridación genómica comparada	50
2.1.1 Extracción de ADN	51
2.1.2 Análisis de la cantidad y calidad del ADN	53
2.1.3 Digestión enzimática del ADN	54
2.1.4 Purificación ADN digerido	55
2.1.5 Marcaje del ADN	56
2.1.6 Purificación del ADN marcado y cuantificación de la incorporación del fluorocromo	57
2.1.7 Hibridación	58
2.1.8 Lavados post-hibridación	60
2.1.9 Escaneado y normalización de los datos	61
2.1.10 Visualización y análisis de resultados	61
2.2 Análisis cuantitativo de la inestabilidad genética	63
2.3 Hibridación <i>in situ</i> fluorescente	64
2.3.1 Elaboración de sondas no comerciales	65
2.3.2 Selección y cultivo de BACs	67
2.3.3 Aislamiento del plásmido y del ADN	68
2.3.4 Marcaje de ADN	70
2.3.5 Comprobación localización	72
2.4 Hibridación <i>in situ</i> fluorescente sobre núcleos en suspensión	74
2.5 Hibridación <i>in situ</i> fluorescente sobre tejido incluido en parafina	76
2.6 Análisis estadístico	79
RESULTADOS	81
TRABAJO 1: Definición de marcadores pronóstico y grupos genómicos en la MFT mediante la técnica de microarrays de hibridación genómica comparada.	83
1. INTRODUCCIÓN	83
2. MATERIAL Y MÉTODOS	83
2.1 Descripción de pacientes y muestras	83
2.2 Métodos	86

3. RESULTADOS	87
3.1 Descripción de las alteraciones genéticas detectadas por arrayCGH	87
3.2 Análisis de inestabilidad genética	91
3.3 Análisis de la supervivencia	96
3.3.1 Asociación entre las alteraciones cromosómicas y el estatus genético con la supervivencia de los pacientes con MFt	96
3.3.2 Asociación entre las características clínicas, terapéuticas y morfológicas y la supervivencia de los pacientes con MFt	97
3.3.3 Análisis multivariado	98
TRABAJO 2: Análisis de las translocaciones de los genes del TCR (TCRAD, TCRB y TCRG) en linfomas cutáneos primarios de células T mediante la técnica de hibridación <i>in situ</i> fluorescente	99
1. INTRODUCCIÓN	99
2. MATERIAL Y MÉTODOS	100
2.1 Descripción de pacientes y muestras	100
2.2 Métodos	102
3. RESULTADOS	104
3.1 Ausencia de translocaciones cromosómicas en los loci del TCR en los pacientes afecto de linfomas cutáneos de células T	104
DISCUSIÓN	105
1. PERFIL GENÉTICO DE LA MICOSIS FUNGOIDE TUMORAL	107
1.1 La MFt presenta alteraciones cromosómicas recurrentes	107
1.2 Ausencia de translocaciones que afectan a los genes del TCR en la MFt	111
1.3 Perfil de inestabilidad genómica	113
1.4 Alteraciones genéticas y pronóstico	115
1.4.1 Deleción de la región 9p21.3	116
1.4.2 Ganancia de la región 8q24.21	118
1.4.3 Deleción de la región 10q26qter	119
2. COMPARACIÓN DEL PERFIL GENÉTICO DE LA MFt CON OTROS LCPCT: SÍNDROME DE SÉZARY Y LINFOMAS CUTÁNEOS ANAPLÁSICOS DE CÉLULA GRANDE CD30+	121
2.1 Comparación con el Síndrome de Sézary: ¿son entidades relacionadas?	121
2.2 Comparación con los linfomas anaplásicos de célula grande CD30+	124

CONCLUSIONES	127
BIBLIOGRAFÍA	131
ANEXO: Publicaciones	145
1. PUBLICACIONES RELACIONADAS CON LA TESIS DOCTORAL	147
1.1 Trabajo 1	149
1.2 Trabajo 2	159
2. OTRAS PUBLICACIONES	176

Abreviaturas

aUPD	<i>Acquired uniparental disomy</i> , disomías uniparentales adquiridas
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNc	ADN complementario
ARN	Ácido ribonucleico
ArrayCGH	Microarrays de hibridación genómica comparada
BACarrayCGH	Microarrays de hibridación genómica comparada de BACs
BACs	<i>Bacterial artificial chromosomes</i> , cromosomas artificiales de bacterias
CC	Citogenética convencional
CDKN2A	<i>Cyclin-dependent kinase inhibitor 2A</i>
CDKN2B	<i>Cyclin-dependent kinase inhibitor 2B</i>
CEIC-PSMAR	Comitès Ètics d'Investigació Clínica-Parc de Salut Mar
CGH	<i>Comparative genomic hybridization</i> , hibridación genómica comparada
CHORI	Children's Hospital Oakland Research Institute
CMV	Citomegalovirus
EBF3	<i>Early B-cell factor 3</i>
EORTC	<i>European organization for research and treatment of Cancer</i> , organización europea para el tratamiento de la investigación del cáncer
FISH	<i>Fluorescence in situ hybridization</i> , hibridación in situ fluorescente
HTLV-I	<i>Human T-cell lymphotropic virus</i> , virus linfotrópico humano tipo 1
IL	Interleucina
IRF4	<i>Mutiple myeloma oncogene-1/interferon regulatory factor-4</i>
Kb	Kilobase
LB	Luria-Bertoni
LC	Linfomas cutáneos
LCACG-CD30+	Linfoma cutáneo anaplásico de célula grande CD30+
LCP	Linfomas cutáneos primarios
LCPCT	Linfomas cutáneos primarios de células T
LCTP	Linfoma de células T periférico
LH	Linfoma de Hogdkin
LLTA	Leucemia/Linfoma T del adulto

M-FISH	FISH multicolor
Mb	Megabase
MF	Micosis fungoide
MFt	Micosis fungoide tumoral
MGMT	<i>O-6-methylguanine-DNA methyltransferase</i>
MTAP	<i>Methylthioadenosine phosphorylase</i>
MYC	<i>v-myc myelocytomatosis viral oncogene homolog</i>
NAV3	<i>Neuron navigator 3</i>
OligoarrayCGH	Microarrays de hibridación genómica comparada de oligonucleótidos
OMS	Organización mundial de la salud
PL	Papulosis linfomatoide
PUVA	Psolaren mas radiación ultravioleta A
REAL	<i>Revised european-american classification of lymphoid neoplasms</i> , clasificación revisada europea-americana de linfomas
RMC	Región mínima común
RS	Reed-Sternberg
RX-FISH	<i>Rainbow cross species color banding</i> , bandeo multicolor
SG	Supervivencia global
SKY	<i>Spectral karyotyping</i> , cariotipo espectral
SLPC	Síndromes linfoproliferativos crónicos
SNParrays	<i>Single nucleotide polymorphism</i> , polimorfismo de un sólo nucleotido
SS	Síndrome de Sézary
TCR	<i>T-cell receptor</i> , receptor de células T
TCRAD	<i>TCR alpha/delta</i> , receptor de células T alfa/delta
TCRB	<i>TCR beta</i> , receptor de células T beta
TCRG	<i>TCR gamma</i> , receptor de células T gamma
Th2	<i>T helper 2</i> , T cooperadora 2
UVB	Ultravioleta B
VEB	Virus de Epstein-Barr
VHC	Virus de la hepatitis C
VHH-8	Virus del herpes humano 8

VIH	Virus de la inmunodeficiencia humana
YACs	<i>Yeast artificial chromosomes</i> , cromosomas artificiales de levaduras
YT	Yeast tryptone, levadura triptona

Relación de tablas

Tabla 1. Clasificación de los linfomas primarios cutáneos de células T.	7
Tabla 2. Sistema de estadiaje para la MF y SS.	12
Tabla 3. Resumen de los resultados de las series de MFt analizadas mediante las técnicas de CGH y arrayCGH.	36
Tabla 4. Cariotipo de tres pacientes afectados de LCACG-CD30+.	39
Tabla 5. <i>Genome browsers</i> más comúnmente utilizados para la búsqueda de BACs.	65
Tabla 6. Características clínicas de los 41 pacientes afectados de MFt analizados mediante oligoarrayCGH.	84
Tabla 7. Resumen de las alteraciones más frecuentemente detectadas en las MFt y posibles genes candidatos.	87
Tabla 8. Deleciones homocigotas y amplificaciones detectadas en MFt mediante la técnica de oligoarrayCGH.	89
Tabla 9. Parámetros analizados para el análisis de inestabilidad genética en 41 MFt.	92
Tabla 10. Características clínicas y citogenéticas de los pacientes con SS, MF y LCACG-CD30+.	100
Tabla 11. Resultados de las alteraciones más frecuentemente observadas en la MFt en los distintos análisis mediante la técnica de arrayCGH. Discrepancias y similitudes.	108
Tabla 12. Resumen de los resultados de las series de SS analizadas mediante las técnicas de arrays genómicos.	121
Tabla 13. Diferencias en las alteraciones genéticas de la MFt y el SS.	123
Tabla 14. Resumen de los resultados de las series de LCACG-CD30+ analizadas mediante las técnicas de arrays genómicos.	125

Relación de figuras

Figura 1. Frecuencia de los distintos tipos de linfomas cutáneos primarios de células T.	8
Figura 2. Manifestaciones clínicas de la MF.	10
Figura 3. Manifestación clínica del SS.	11
Figura 4. Imágenes histológicas de la MFt.	14
Figura 5. Imagen citológica de una célula de Sézary.	14
Figura 6. Papel de la inmunología en la progresión tumoral de la MF.	19
Figura 7. Manifestación clínica de la PL.	20
Figura 8. Manifestación clínica de un LCACG-CD30+.	22
Figura 9. Imágenes histológicas de un LCACG-CD30+.	23
Figura 10. Etapas de la técnica de hibridación <i>in situ</i> fluorescente.	26
Figura 11. Representación de los distintos tipos de sondas.	28
Figura 12. Esquema de los procesos básicos de los microarrays de hibridación genómica comparada y de los <i>SNParrays</i> .	31
Figura 13. Microarrays de hibridación genómica comparada empleados para el análisis de 41 MFt.	50
Figura 14. Diagrama de las etapas del proceso de hibridación para los oligoarrayCGH empleados en la presente tesis.	51
Figura 15. Valoración de un gel de bromuro de etidio para el análisis de la integridad del ADN.	54
Figura 16. Visualización de los resultados a partir del software CGH Analytics v.3.2.25 (Agilent Technologies).	62
Figura 17. Ejemplo de la cuantificación de alteraciones para el análisis de inestabilidad genética en la MFt.	64
Figura 18. Diagrama de las etapas a seguir para la elaboración de una sonda no comercial de BACs.	66
Figura 19. Perfil genético de los 41 pacientes con MFt.	88
Figura 20. Validación de los resultados obtenidos mediante oligoarrayCGH en tres pacientes afectados de MFt.	90
Figura 21. Análisis de inestabilidad de genética.	91

Figura 22. Resultados del análisis de comparaciones múltiples entre el estatus genómico de la MFt y las alteraciones detectadas mediante oligoarrayCGH.	94
Figura 23. Diagramas de Kaplan-Meier de supervivencia para las MFt con respecto al estatus genético y las alteraciones mínimas alteradas.	96
Figura 24. Diagramas de Kaplan-Meier de supervivencia para las MFt con respecto a las características clínicas.	97
Figura 25. Diseño de las sondas de <i>split</i> para el estudio de las translocaciones de los genes <i>TCRAD</i> , <i>TCRB</i> y <i>TCRG</i> .	102
Figura 26. Resultados de la técnica de FISH.	103

Introducción

1. LINFOMAS CUTÁNEOS

Los procesos linfoproliferativos cutáneos (LC) representan aproximadamente un 30% de todos los linfomas, y son el segundo tipo más común de los linfomas no Hodgkin extranodales. Representan un grupo heterogéneo de neoplasias con características clínicas, histológicas, inmunofenotípicas y evolutivas completamente diferentes a sus equivalente nodales, y se dividen principalmente en dos grupos: linfomas cutáneos de células T y NK y linfomas cutáneos de células B (Willemze *et al.* 2005; Swerdlow *et al.* 2008). A diferencia de los linfomas nodales, de los cuales los síndromes linfoproliferativos de células B representan la mayoría, los linfomas cutáneos de células T constituyen aproximadamente el 77% de los linfomas cutáneos primarios (LCP).

El concepto de LCP se aplica a aquellos linfomas que se originan en la piel sin evidencia de infiltración extracutánea en el momento del diagnóstico y tras la práctica de una completa estadificación. Una excepción a esta definición lo constituyen, dentro de los linfomas cutáneos primarios de célula T (LCPCT), la micosis fungoide (MF) (que se considera siempre como un linfoma cutáneo primario aunque haya diseminación extracutánea al establecer su diagnóstico), la transformación de un linfoma cutáneo previo en una forma más indiferenciada o la asociación de dos procesos linfoproliferativos cutáneos primarios (p. ej. el desarrollo de un linfoma cutáneo CD30+ en el contexto de un paciente con MF). Por otra parte, se consideran linfomas cutáneos secundarios aquellos linfomas que se desarrollan en la piel como consecuencia de la diseminación cutánea de un linfoma primario extracutáneo.

En algunas ocasiones resulta muy difícil definir el carácter primario o secundario de un linfoma cutáneo, especialmente en aquellos casos que presentan de forma simultánea una única lesión cutánea y adenopatías regionales en las que se evidencia una infiltración linfoide clonal en ausencia de afectación en otras localizaciones.

1.1 Linfomas cutáneos primarios de células T

Los linfomas cutáneos primarios de células T (LCPCT) son un grupo heterogéneo de linfomas no Hodgkin en los que las células clonales linfoides T poseen una tendencia a infiltrar la epidermis (epidermotropismo).

La presentación clínica de las distintas formas de LCPCT es muy variable pudiéndose observar máculas eritemato-descamativas o bien placas infiltradas en los estadios iniciales de la enfermedad, nódulos eritemato-violáceos con tendencia a la ulceración en fases avanzadas o una eritrodermia en el caso de las variantes leucémicas de la enfermedad (síndrome de Sézary [SS]) (Kuzel *et al.* 1991; Diamandidou *et al.* 1996).

Histológicamente, los LCPCT suelen presentar un infiltrado linfoide epidermotropo formado por células atípicas que normalmente se agrupan formando acúmulos intraepidérmicos, denominados microabscesos de Pautrier. Estas células atípicas expresan antígenos linfoides de células T y ocasionalmente muestran un fenotipo aberrante con la pérdida de marcadores de células T maduras como los antígenos CD2, CD3, CD5 o CD7 (Willemze 1995; Diamandidou *et al.* 1996). En las “proliferaciones linfoides cutáneas T CD30+”, también se evidencia la expresión por parte de las células neoplásicas del antígeno linfoide de activación CD30 (Kadin 1991).

Otra de las herramientas que ayuda al diagnóstico de estas neoplasias es el análisis del reordenamiento del receptor de células T (*TCR*) que suele evidenciar la presencia de una población monoclonal linfoide en la mayor parte de los casos (Neri *et al.* 1995).

Desde un punto de vista terapéutico, en aquellos casos de lesiones nodulares solitarias, no tributarias de exéresis quirúrgica en el momento del diagnóstico, la radioterapia local convencional suele ser el tratamiento de elección. En aquellos pacientes con lesiones multifocales o diseminadas suele indicarse tratamiento con monoquimioterapia (en casos con evolución indolente y buen pronóstico) o poliquimioterapia (CHOP, CVP, etc.) en aquellos casos con una evolución clínica más agresiva (Scarbrick 2006).

1.1.1 Clasificación de los linfomas cutáneos primarios de células T

Durante muchos años, las distintas clasificaciones propuestas para los linfomas cutáneos representaban una extrapolación a nivel cutáneo de las clasificaciones generales de los linfomas (Kempf and Sander 2010). Dichas clasificaciones solían basarse inicialmente en criterios morfológicos. La clasificación REAL (del inglés, *Revised European–American Classification of Lymphoid Neoplasms*) realizada en 1994 fue la primera en incorporar parámetros clínicos, histopatológicos, inmunofenotípicos y moleculares, dividiendo los linfomas en linfomas de células T y linfomas de células B (Harris *et al.* 1994). La clasificación de la OMS (Organización mundial de la salud) de los linfomas (Fink-Puches *et al.* 2002) seguía los mismos principios. Sin embargo, desde un punto de vista dermatológico la clasificación más utilizada durante mucho tiempo fue

la clasificación de la EORTC (del inglés, *European Organization for Research and Treatment of Cancer*), una clasificación individualizada de los procesos linfoproliferativos cutáneos primarios.

Sólo durante los últimos años se han definido esquemas de clasificación globales y basados en características fenotípicas linfoides que permiten incorporar, si bien no en su totalidad, la mayoría de los procesos linfoproliferativos cutáneos primarios dentro de los esquemas generales de clasificación de los linfomas nodales y extranodales. Las clasificaciones actuales de los LCP intentan definir e individualizar entidades clínico-patológicas basadas en las características clínicas, histopatológicas, inmunofenotípicas y genotípicas, intentando establecer una correlación con la contrapartida fisiológica de la célula neoplásica responsable.

Siguiendo estos principios en el año 2008, se intentó integrar las clasificaciones de la EORTC y la OMS (clasificación OMS/EORTC) para finalmente describir y caracterizar las peculiaridades de los distintos LCP. En la actual clasificación de la OMS (Swerdlow *et al.* 2008), se incluyen todas las entidades de linfomas cutáneos establecidas en la clasificación OMS/EORTC (Willemze *et al.* 2005) dentro de la clasificación general de neoplasias linfoides nodales y extranodales. Los distintos tipos de LCPCT se detallan en la Tabla 1.

Tabla 1. Clasificación de los linfomas primarios cutáneos de células T (Swerdlow *et al.* 2008)

Neoplasias maduras de células T y NK (Código ICD-O)

Micosis Fungoide (MF) (9700/3)

Variantes de la MF

Foliculotropía

Reticulosis pagetoide

Piel laxa granulomatosa

Síndrome de Sézary (9701/3)

Leucemia/Linfoma T del adulto (9827/3)

Procesos linfoproliferativos cutáneos primarios de células T CD30+

Linfomas primarios cutáneos anaplásicos de célula grande (9718/3)

Papulosis linfomatoide (9718/1)

Linfoma de célula T subcutáneo paniculítico (9708/3)

Linfoma extranodal de células T/NK, tipo nasal (9719/3)

Linfomas cutáneos primarios de células T periféricos, subtipos raros

Linfoma primario cutáneo agresivo epidermotrópico de célula T citotóxica CD8+ (entidad provisional) (9709/3)

Linfoma primario cutáneo de células T γ/δ (9726/3)

Linfoma primario cutáneo de células T CD4+ de tamaño pequeño/medio (entidad provisional) (9709/3)

La forma más frecuente de los LCPCT es la micosis fungoide (60%) seguido de los procesos linfoproliferativos de células T CD30+ (25%), que incluyen la papulosis linfomatoide (PL) y los linfomas cutáneos primarios anaplásicos de célula grande (LCACG-CD30+). La frecuencia de las distintas formas de LCPCT se detalla en la figura 1.

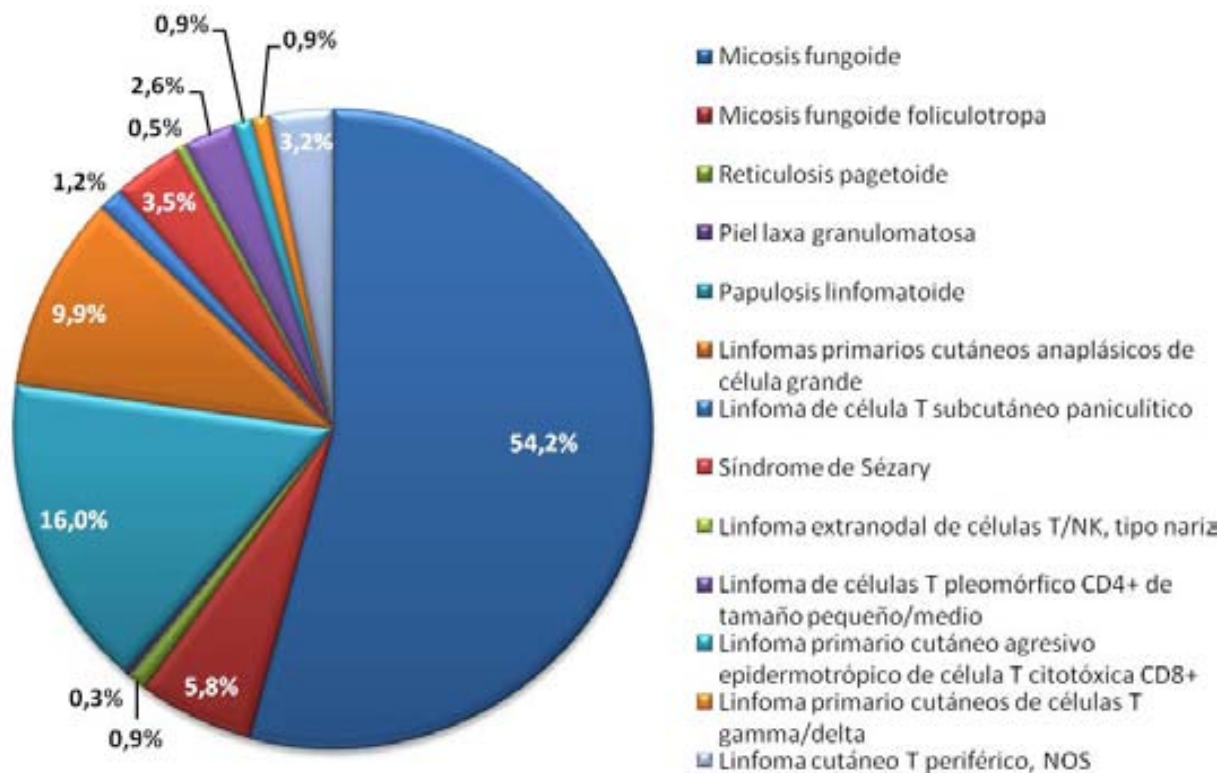


Figura 1. Frecuencia de los distintos tipos de linfomas cutáneos primarios de células T.

2. MICOSIS FUNGOIDE Y SÍNDROME DE SÉZARY (MF/SS)

La micosis fungoide (MF) es un linfoma cutáneo primario de células T maduras cooperadoras (*helper*) CD4+ que muestran una marcada afinidad por la piel y particularmente por la epidermis (epidermotropismo). La MF es un linfoma indolente con un curso clínico que puede durar años o incluso décadas, que se caracteriza por el desarrollo secuencial de lesiones iniciales en forma de máculas que pueden evolucionar a la formación de placas infiltradas, y éstas ocasionalmente a tumores. Cuando la enfermedad progresa, las células neoplásicas pierden su afinidad por la epidermis y tienden a desarrollar una afectación extracutánea nodal, hematológica o visceral.

Por otra parte, el síndrome de Sézary (SS) se considera la variante leucémica de la MF. Su manifestación clínica se caracteriza por la presencia de eritrodermia, linfadenopatías, y más de 1.000 células linfoides atípicas circulantes por mm^3 (células de Sézary/ mm^3). Es considerado en la clasificación de la OMS/EORTC como un linfoma T cutáneo de curso agresivo, progresa más rápidamente, y es más resistente al tratamiento que una MF convencional.

2.1 Epidemiología

La MF es la forma más frecuente de todos los LCPCT con una incidencia anual de 0,9 por cada 100.000 habitantes en los Estados Unidos (Criscione and Weinstock 2007). Esta entidad suele observarse en individuos adultos (más frecuentemente en hombres que en mujeres [2:1]), con un pico de incidencia en la sexta y séptima década de la vida, aunque se han descrito casos aislados en la infancia y adolescencia (Koch *et al.* 1987; Weinstock and Gardstein 1999; Criscione and Weinstock 2007).

Por otra parte, el SS es una entidad poco frecuente, con una incidencia anual de 0,3 casos por cada 1.000.000 habitantes en Estados Unidos. Es también una patología frecuente en adultos mayores de 30 años y se observa más frecuentemente en hombres que en mujeres. (2,6:0,9) (Criscione and Weinstock 2007).

2.2 Características clínicas: manifestaciones clínicas, estadiaje y manejo terapéutico

El paciente afecto de MF puede debutar con una única o varias lesiones cutáneas. Inicialmente, suelen ser máculas eritematosas (*patch stage* o fase de mácula) de tamaño variable, localizadas preferentemente en zonas no fotoexpuestas,

normalmente en el tronco (nalgas, axilas, etc.) (Figura 2a). Estas lesiones pueden evolucionar a placas infiltradas (*plaque stage* o fase de placa) de morfología y extensión variables. Las placas pueden asimismo desarrollarse *de novo*, involucionar espontáneamente, permanecer estables o evolucionar a nódulos y tumores (Figura 2b). En la fase tumoral (*tumoral stage*, MFt), con frecuencia se observa la combinación de máculas, placas y tumores. Los tumores pueden ser solitarios o múltiples, tienden a ulcerarse y pueden también desarrollarse a partir de una placa, o bien aparecer *de novo*. Es durante este estadio cuando la enfermedad posee una mayor tendencia a presentar una diseminación extracutánea preferentemente ganglionar y ocasionalmente visceral (esplénica, pulmonar, gastrointestinal, etc.) (Figura 2c).



Figura 2. Manifestaciones clínicas de la MF: a) Lesión cutánea en fase de mácula, b) lesión cutánea en fase de placa y c) lesión cutánea en fase tumoral.

En el SS, los pacientes suelen presentar eritrodermia muy pruriginosa asociada a linfadenopatía generalizada y se observa la presencia de linfocitos T atípicos en piel, ganglios y sangre periférica (Figura 3).



Figura 3. Manifestación clínica del SS: Eritrodermia característica de un paciente con SS.

El sistema de estadiaje (TNMB, del inglés *Tumor, Node, Metastases and Blood*) para la MF y el SS, recomendado por la actual clasificación de la OMS, se basa en el tipo de la lesión, en la superficie corporal afectada, en la presencia/ausencia de diseminación linfática, visceral o afectación de sangre periférica (Olsen *et al.* 2007) (Tabla 2).

La MF generalmente se caracteriza por una historia natural extremadamente lenta y larga. La mayoría de los pacientes con estadios iniciales (máculas y placas: IA-IIA) tienen un excelente pronóstico y su supervivencia global es similar a la de la población general. En estos estadios, la actitud terapéutica es la aplicación de tratamientos tópicos, fototerapia o radioterapia con unas tasas de respuesta del 50-88% (Scarbrick 2006). Por otra parte, en los pacientes con estadios avanzados (tumores o SS: IIB-IVB) la evolución puede ser más rápida. En estos pacientes, el tratamiento a seguir no está estandarizado y va desde la aplicación de radioterapia (las lesiones de MF y SS son relativamente radiosensibles) a terapias sistémicas (fotoféresis extracorporea, inmunoterapia, anticuerpos monoclonales, quimioterapia o trasplante de médula ósea). En estos pacientes la supervivencia a los 5 años disminuye drásticamente y si además presentan afectación extracutánea a los 3 años, la supervivencia se reduce (Scarbrick 2006).

Caracterización genética de la MFt

Estadio	Tumor (T)	Ganglio linfático (N)	Metástasis (M)	Sangre (B)
IA	T1: máculas o placas en <10% de la superficie corporal	N0: Ausencia adenopatías clínicamente anormales. No se requiere biopsia	M0: Ausencia diseminación visceral	B0: ≤5% de linfocitos en sangre periférica -B0a: No clonalidad -B0b: Clonalidad B1: >5% de linfocitos en sangre periférica -B1a: No clonalidad -B1b: Clonalidad
IB	T2: máculas o placas en >10% de la superficie corporal	N0	M0	B0 o B1
IIA	T1 o T2	N1: Adenopatías clínicamente anormales (grado histopatológico holandés 1) -N1a: No clonalidad -N1b: Clonalidad N2: Evidencia histológica de infiltración por MF sin presentar ganglios palpables (grado histopatológico holandés 2) -N2a: No clonalidad -N2b: Clonalidad	M0	B0 o B1
IIB	T3: tumores (1 o más, >1 cm de diámetro)	N0-N2	M0	B0 o B1
III	T4: eritrodermia (>80% de la superficie corporal)	N0-N2	M0	B0 o B1
IIIA	T4	N0-N2	M0	B0
IIIB	T4	N0-N2	M0	B1
IVA	T1-T4	N0-N2	M0	B2: Alta carga tumoral >1000 células de Sézary/ul
IVA	T1-T4	N3: Adenopatías clínicamente anormales (grado histopatológico holandés 3-4). Con o sin clonalidad	M0	B0-B2
IVB	T1-T4	N0-N3	M1: Diseminación visceral (confirmación histológica)	B0-B2

Tabla 2. Sistema de estadiaje para la MF/SS (adaptada de Olsen *et al.* 2007)

2.3 Características histológicas, inmunofenotípicas y genotípicas

Los hallazgos histopatológicos en la MF varían según los estadios de la enfermedad (máculas, pápulas y tumores):

- **Fase de mácula:** En las lesiones iniciales, los hallazgos histopatológicos pueden ser no específicos. Puede observarse un infiltrado liquenoide focal o en banda en la dermis papilar con un discreto epidermotropismo a expensas de linfocitos aislados de pequeño tamaño, ocasionalmente distribuidos a lo largo de la capa basal de la epidermis. La atipia de las células linfoides suele ser mínima. La epidermis puede presentar una hiperplasia psoriasiforme y la dermis una discreta fibrosis. En esta fase resulta especialmente difícil de establecer el diagnóstico y con frecuencia se precisa de la práctica de múltiples biopsias (Figura 4a).
- **Fase de placa:** En esta etapa se conservan las características de la fase inicial pero se hacen más evidentes permitiendo el diagnóstico a partir de criterios histológicos. Se observa un denso infiltrado en banda formado por células mononucleares de tamaño pequeño-intermedio con núcleo hiper cromático de morfología cerebriforme sin espongiosis. La afectación epidérmica a expensas de exocitosis de células individuales o de agregados de células cerebriformes intraepidérmicos (microabscesos de Pautrier) es un hallazgo característico (Figura 4b).
- **Fase tumoral:** En esta fase se observa un infiltrado monofórmico con un patrón nodular o difuso que ocupa la dermis. Puede no existir epidermotropismo. Los

linfocitos son de pequeño tamaño. Se evidencian células linfoides atípicas de gran tamaño con abundantes mitosis afectando a toda la dermis. Ocasionalmente puede desarrollarse una transformación a un linfoma de alto grado (Figura 4c)

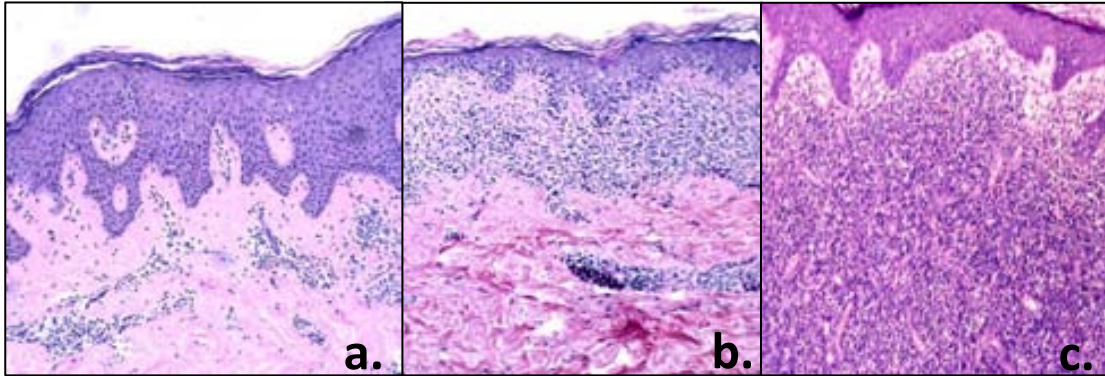


Figura 4. Imágenes histológicas de la MFt: a) Fase de mácula, b) fase de placa y c) fase de tumor.

Por otra parte, los hallazgos histológicos del SS son similares a los de la MF, con presencia de un infiltrado denso, en banda, en dermis papilar, que por lo general muestra menor tendencia al epidermotropismo. Además, el SS se caracteriza por la presencia de linfocitos atípicos circulantes. Dichas células son mononucleares de tamaño moderadamente grande con núcleos convolutos, que se denominan células de Sézary (Figura 5).

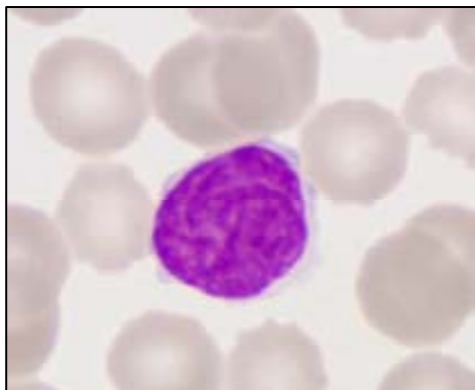


Figura 5. Imagen citológica de una célula de Sézary (tinción de May Grunwald-Giemsa).

Inmunofenotípicamente, las células neoplásicas en la MF y el SS presentan un perfil de célula madura linfoide T cooperadora (*helper*) de memoria (CD3+, β F1+, CD4+, CD8-, CD29+, CD45RO+) con un fenotipo aberrante por la ausencia de marcadores de célula T madura como CD7, CD2 o CD5 (Wood *et al.* 1990; Bernengo *et al.* 2001). Las células linfomatosas de la MF pueden presentar expresión del antígeno CD30 y en ocasiones la presencia de células CD30+ está asociada a la progresión a linfoma de célula grande y a un peor pronóstico.

Genotípicamente, el reordenamiento monoclonal del receptor de células T (TCR, del inglés *T-cell receptor*) por técnicas de amplificación (PCR) se detecta en un 50-70% de MF en estadios iniciales y un 78-100% en estadios avanzados (MFt y SS) (Bachelez *et al.* 1995; Curco *et al.* 1997; Cherny *et al.* 2001; Cordel *et al.* 2005; Ponti *et al.* 2005; Massone *et al.* 2008; Goeldel *et al.* 2010).

2.4 Etiopatogenia

Se desconocen los factores etiológicos que intervienen en el desarrollo de la MF/SS. Se ha postulado la participación de distintos agentes infecciosos, factores ambientales/ocupacionales, alteraciones inmunológicas y genéticas (ver apartado 2.5). Sin embargo, no se ha podido demostrar de forma definitiva su relación.

Agentes infecciosos

Se ha postulado que la MF/SS se desarrollaría tras un estímulo antigénico persistente que conduciría al acúmulo de células linfoides T clonales en la epidermis, con un mecanismo defectuoso de la apoptosis celular programada.

La relación etiológica de algunos virus con algunos subtipos de linfomas nodales (virus de la inmunodeficiencia humana [VIH], virus de Epstein-Barr [VEB], virus de la hepatitis C [VHC], virus humano de la leucemia-linfoma T de células tipo I [HTLV-I, del inglés *human T-cell lymphotropic virus*], el virus del herpes humano 8 [VHH-8]) hace sospechar una asociación similar entre algunos agentes víricos y los procesos linfoproliferativos cutáneos.

Por otro lado, la similitud observada entre las lesiones de MF/SS y las lesiones cutáneas de la leucemia/linfoma T del adulto (LLTA) ha hecho considerar el papel de los retrovirus en la patogenia de los LCPCT. Se han publicado diferentes estudios sobre la relación del HTLV-I y la MF con resultados contradictorios. Sin embargo, a pesar de estos hallazgos, no puede considerarse que el HTLV-I como un agente etiológico primario en los LCPCT (Ranki *et al.* 1990; Manca *et al.* 1994).

También se ha estudiado el probable papel del VIH en el desarrollo de una MF pero no se ha demostrado la integración del genoma del VIH-1 en las células tumorales. Herne *et al.* (Herne *et al.* 2003) no hallaron ningún caso de MF/SS positivo serológicamente para el VIH-1.

También se han detectado anticuerpos contra el VEB en pacientes con MF en un porcentaje y concentración más elevados que en la población general, así como la expresión genética del VEB en células tumorales y en cultivos de células de MF. Esta relación del VEB con la MF también varía según la zona geográfica, recogándose

porcentajes más elevados en países asiáticos (Manca *et al.* 1994; Pancake *et al.* 1995; Anagnostopoulos *et al.* 1996; Shimakage *et al.* 2001; Novelli *et al.* 2009).

Aunque no se ha podido establecer una relación etiológica entre el citomegalovirus (CMV) y la MF/SS, se ha hallado una incidencia significativamente mayor de pacientes con MF/SS seropositivos IgG a CMV (97,4%) respecto grupos control sanos (57,3%), independientemente del estadio tumoral y de la edad de los pacientes. Esta incidencia es incluso superior respecto a grupos considerados de riesgo para la infección por CMV como los hombres homosexuales y los enfermos HIV/SIDA (Herne *et al.* 2003; Gupta *et al.* 2006; Ballanger *et al.* 2009).

Otro de los agentes infecciosos relacionado con la patogénesis de la MF es *Borrelia burgdoferi*, de la que se ha sugerido que podría actuar como un estímulo antigénico persistente, lo que originaría una inflamación crónica y una proliferación de linfocitos T (Tothova *et al.* 2006). Recientemente se ha sugerido que la presencia de múltiples agentes infecciosos en un mismo paciente aumenta 13,7 veces el riesgo de desarrollar una MF, aunque como se había dicho hasta el momento, este hecho no parece ser el responsable de la progresión de la enfermedad (Bonin *et al.* 2010).

Factores ambientales/ocupacionales

Diversos aspectos ocupacionales se han asociado a un mayor riesgo de padecer un LCPCT. Los trabajadores de industrias de materiales plásticos, metales, aceites de corte, disolventes y productos de manufactura con carcinógenos como la N-nitrosamina parecen tener una cierta predisposición a padecer una MF (Morales-

Suarez-Varela *et al.* 2004). Recientemente, se ha postulado que la exposición a hidrocarburos aromáticos y halogenados, pesticidas y la radiación solar podrían tener un papel etiopatogénico en la MF (Morales-Suarez-Varela *et al.* 2006).

Alteraciones inmunopatogénicas

En la homeostasis de la piel normal, las células T *helper* CD4+ son reclutadas a la piel después de un estímulo ambiental o infeccioso dando lugar a la liberación de citocinas por parte de los queratinocitos y desencadenando la respuesta inmune de las células inmunológicas residentes en la piel como las células dendríticas, mastocitos y macrófagos.

Las células T malignas de la MF expresan receptores CLA y CCR4, que son marcadores de tropismo cutáneo y epidermotropismo. Expresan asimismo niveles elevados de CCL17 y CCL22 (Ferenczi *et al.* 2002; Kakinuma *et al.* 2003) así como otras quimocinas receptoras expresadas en piel infiltrada por linfocitos T como CXCR3 y CXCR4, y moléculas de superficie generalmente expresadas por los queratinocitos y las células de Langerhans. La expresión de estos marcadores confirma el papel de la respuesta inmune en los estadios iniciales de esta enfermedad (Lu *et al.* 2001; Kallinich *et al.* 2003). A medida que la enfermedad progresa, los linfocitos T CD4+ adquieren un fenotipo de célula T *helper* 2 (Th2) produciendo IL-4, IL-5 e IL-10. En este momento, la respuesta inmune antitumoral no es suficiente para controlar la enfermedad lo que da lugar a un crecimiento tumoral descontrolado (Figura 6).

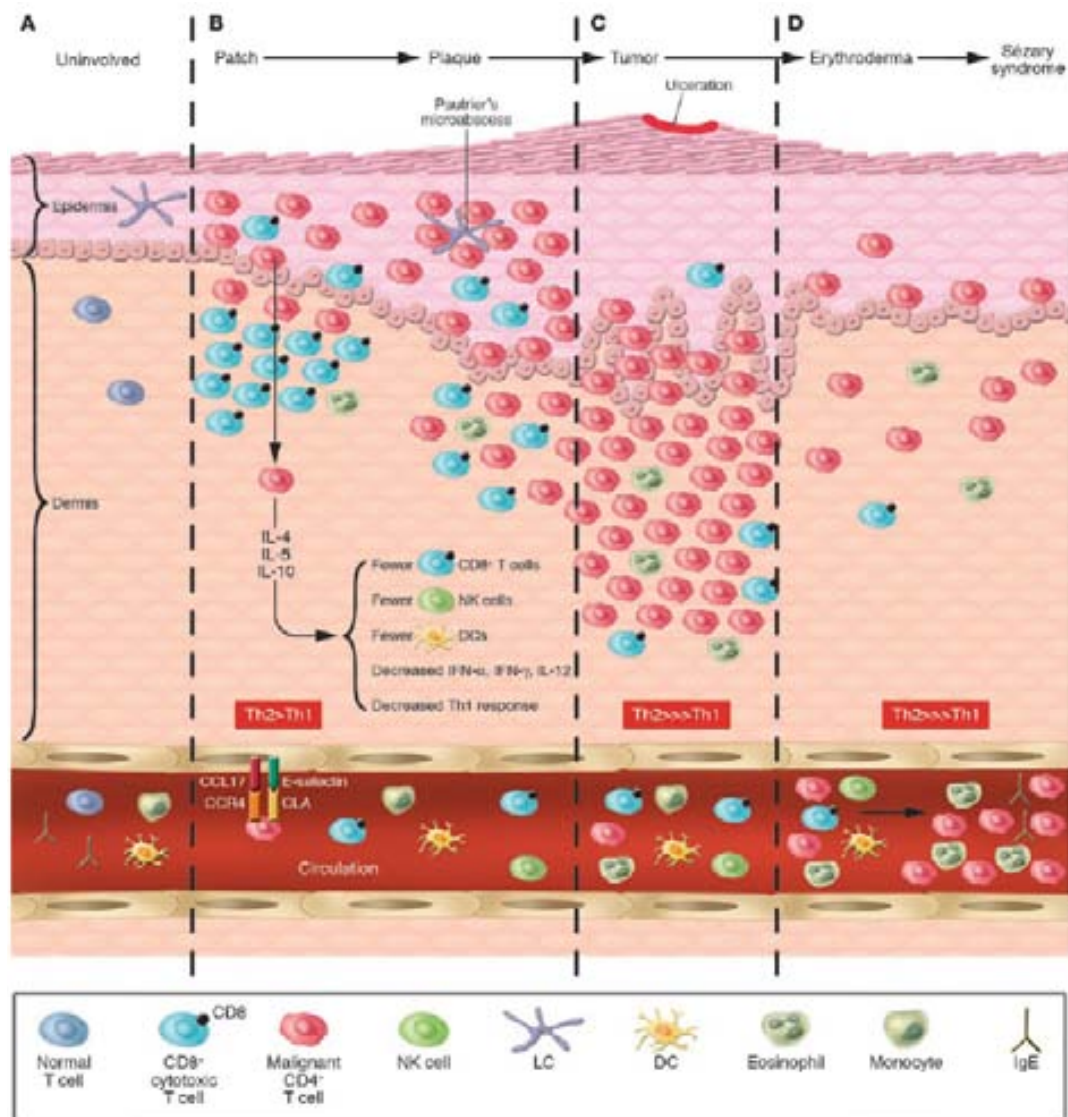


Figura 6. Papel de la inmunología en la progresión tumoral de la MF (Kim *et al.* 2005).

3. PROLIFERACIONES LINFÓIDES CUTÁNEAS CD30 POSITIVAS

Las proliferaciones linfoides cutáneas CD30+ son un grupo de procesos linfoproliferativos cutáneos asociados a un pronóstico relativamente favorable, que poseen en común la positividad por parte de las células neoplásicas del antígeno Ki-1 o

CD30, considerado inicialmente característico de las células de Reed-Sternberg (RS) de la enfermedad de Hodgkin (LH). Este grupo incluye la papulosis linfomatoide (PL), los linfomas de célula grande CD30 + (LCACG-CD30+) y ciertos procesos a los que se ha acordado denominar "*borderline*" que corresponden a casos de discrepancia clínico-histológica para considerarlos como PL o como LCACG-CD30+. Se considera que representan un espectro continuo de lesiones cuyos extremos serían la PL y el LCACG-CD30+, respectivamente. La supervivencia media de este grupo es superior al 90% a los 5 años (Beljaards *et al.* 1993; Bekkenk *et al.* 2000).

3.1 Papulosis linfomatoide

La papulosis linfomatoide (PL) es un proceso linfoproliferativo indolente cuya histología simula una neoplasia linfoide maligna. Aunque es más frecuente en adultos, puede observarse a cualquier edad. Las lesiones consisten en pápulas o nódulos dérmicos que presentan una tendencia a la necrosis central y ulceración (Figura 7). Las lesiones involucionan espontáneamente dejando cicatrices de aspecto varioliforme. Por lo general se localizan en tronco y extremidades, pueden aparecer agrupadas o tener una distribución múltiple, con número y tamaño variables, y es característico que estén en diferentes estadios evolutivos. El curso es crónico y recurrente. La involución de las lesiones suele observarse en uno o dos meses con la aparición de nuevos elementos durante meses o años.



Figura 7. Manifestación clínica de la PL: lesión cutánea típica de la PL.

En la mayor parte de los casos, la histología de la PL muestra un infiltrado linfoide de disposición perivascular e interfase con una disposición o morfología en "cuña". La presencia de células linfoides atípicas, de gran tamaño, parecidas a las células de RS es característica. Dichas células son intensamente positivas para el antígeno CD30 expresado con un patrón perinuclear. También suele observarse un abundante infiltrado inflamatorio acompañante compuesto principalmente de polimorfonucleares neutrófilos y eosinófilos. Este aspecto histológico clásico puede plantear el diagnóstico diferencial con la pitiriasis liquenoide o picaduras de artrópodo. Un pequeño porcentaje de pacientes con PL (entre el 5 al 20%), pueden desarrollar a lo largo de la evolución un verdadero linfoma cutáneo (MF o LCACG-CD30+) o asociarse a linfoma de Hodgkin.

Inmunofenotípicamente, las células neoplásicas tienen un fenotipo T cooperador (CD3+,CD4+,CD8-) con presencia de CD30 en las grandes células atípicas. Se puede detectar mediante reordenamiento del gen del *TCR* con clonalidad en el 50-70% de los casos de PL (el-Azhary *et al.* 1994; Cabanillas *et al.* 1995).

El tratamiento de la PL vendrá condicionado por la extensión del proceso cutáneo y por las molestias que pueda experimentar el paciente. En muchas ocasiones no se prescribe tratamiento y la simple explicación de la naturaleza del proceso por parte del médico es suficiente. En aquellos casos con lesiones necróticas o con tendencia a dejar cicatrices puede prescribirse tratamiento con fototerapia (radiación ultravioleta B [UVB] o psolaren mas radiación ultravioleta A [PUVA]) o metotrexate oral a dosis bajas (el-Azhary *et al.* 1994; Bekkenk *et al.* 2000). Dichos tratamientos pueden bloquear la

aparición de nuevos brotes. Sin embargo, las lesiones suelen recurrir al suspender dichos tratamientos.

3.2 Linfoma primario cutáneo CD 30 positivo

Dentro del espectro de procesos cutáneos primarios CD30 positivos, ocupando el polo opuesto a la PL, se encuentran los linfomas de célula grande CD30+ (LCACG-CD30+). Desde el punto de vista clínico su presentación más característica es forma de una única lesión tumoral a veces con otras adyacentes de menor tamaño (Figura 8). Ocasionalmente, las lesiones pueden presentar una regresión espontánea completa o parcial, aunque son frecuentes las recurrencias cutáneas. La diseminación extracutánea se detecta en aproximadamente en un 10% de los pacientes, principalmente a los ganglios linfáticos regionales y habitualmente en pacientes con una enfermedad cutánea multicéntrica (Bekkenk *et al.* 2000; Drews *et al.* 2000).



Figura 8. Manifestación clínica de un LCACG-CD30+: Lesión cutánea típica.

Histológicamente se caracteriza por una proliferación densa de células linfoides grandes de citoplasma poligonal y morfología atípica (al menos el 30% del infiltrado son células neoplásicas). El fenotipo suele ser T CD4/CD45RO. La positividad para CD30

en estos casos suele ser muy marcada (>75% de las células neoplásicas) (Figura 9). Existe una variante no anaplásica de este tumor (20% de los casos), en la que el infiltrado, de aspecto pleomórfico, está compuesto por células de tamaño mediano y grande de núcleo irregular o de aspecto inmunoblástico. No parecen existir diferencias en el comportamiento clínico de los linfomas CD30+ respecto a si son morfológicamente anaplásicos, pleomórficos o inmunoblásticos (no anaplásicos). Se ha descrito la coexpresión de CD56 (antígeno de células NK) en algunos casos quizás siguiendo un comportamiento más agresivo (Natkunam *et al.* 2000). Sin embargo la expresión de marcadores citotóxicos no es infrecuente (TIA-1, granzyme B) sin que ello parezca afectar al pronóstico. Tampoco expresan EMA y son CD15 -, a diferencia de los linfomas ganglionares y del linfoma de Hodgkin. Es habitual detectar reordenamiento del *TCR* en un 65%-90% de los pacientes (Greisser *et al.* 2006).

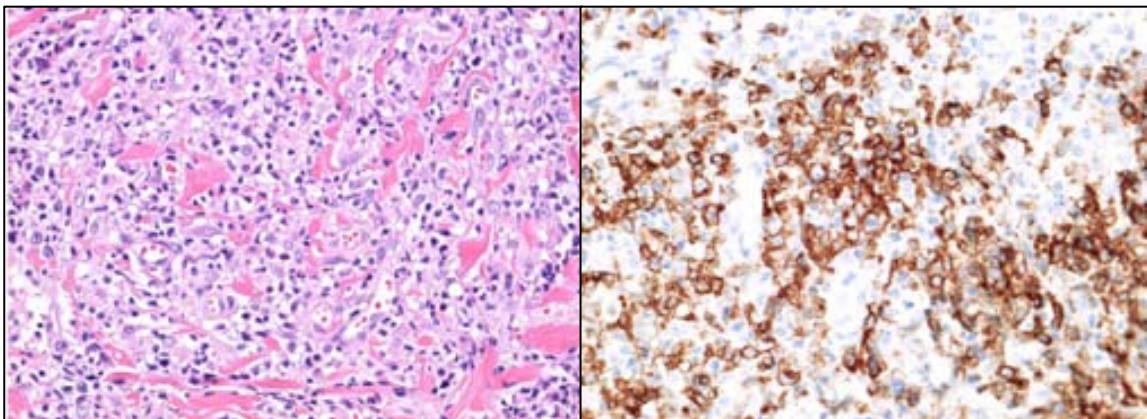


Figura 9. Imágenes histológicas de un LCACG-CD30+: a) tinción con hematoxilina-eosina y b) expresión del marcador CD30+

El pronóstico de estos tumores es muy favorable con una supervivencia a los 5 años superiores al 75-95%. En un reciente estudio multicéntrico europeo se detectó extensión extracutánea en un porcentaje relativamente bajo de pacientes, a pesar de lo cual, ante dicha posibilidad se aconseja un estudio de extensión que incluya un

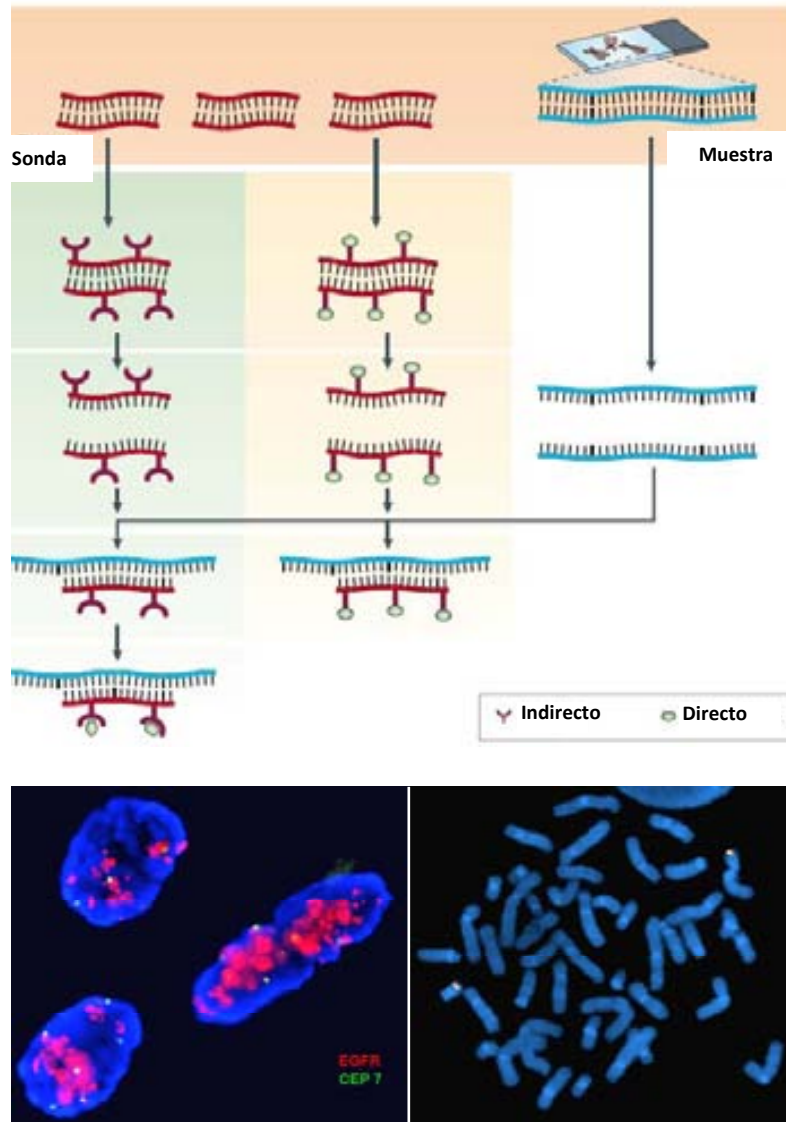
examen de médula ósea, una citología de sangre periférica y estudios de imagen adecuados (Bekkenk *et al.* 2000). El tratamiento más indicado es difícil de establecer debido al escaso número de estudios controlados del que se dispone. Sin embargo, debe ser conservador mediante cirugía o radioterapia, o bien monoquimioterapia con metotrexate en lesiones localizadas. La afectación cutánea extensa multicéntrica debe plantear la posibilidad de empleo de poliquimioterapia. En algunos casos se ha observado una involución espontánea del tumor.

4. TÉCNICAS CITOGENÉTICAS Y MOLECULARES APLICADAS AL ESTUDIO DE LOS LCPCT

4.1 Hibridación *in situ* fluorescente

La técnica de hibridación *in situ* fluorescente (FISH, del inglés *fluorescence in situ hybridization*) permite detectar y localizar secuencias específicas de ácidos nucleicos (ADN o ARN) sobre preparaciones cromosómicas, extensiones celulares y cortes de tejido (Pardue and Gall 1969; Jones 1970; Gerhard *et al.* 1981; Harper and Saunders 1981). Las técnicas de FISH consisten en utilizar pequeñas secuencias de ADN de cadena sencilla, a las que denominaremos sondas, previamente marcadas directa o indirectamente con moléculas fluorescentes. La base metodológica para la realización de dicha técnica requiere un proceso de desnaturalización del ADN, tanto de la muestra control como de la sonda a utilizar, que debe ser complementario al fragmento de ADN que se desee analizar. Dicho proceso se basa en la rotura de los puentes de hidrógeno que unen la doble hélice del ADN mediante la aplicación de disolventes orgánicos (como la formamida) a temperaturas elevadas (70-80°C) y bajo

unas condiciones de pH concretas, quedando ADN de una sola hebra. Posteriormente, se procede a unir los ADNs de la muestra y de la sonda, incubándolos conjuntamente a una temperatura de 37°C, de modo que se produzca la unión entre ambos por complementariedad de bases, proceso al cual denominamos hibridación o renaturalización. La desnaturalización y renaturalización (o hibridación) del ADN son, por tanto, procesos reversibles mediados por cambios de temperatura. Finalmente, se procede al análisis de los resultados usando un microscopio de fluorescencia. Las etapas generales de la FISH se detallan en la figura 10.



Preparación de la muestra:

- Extensión de metafases
- Corte de tejido histológico

Marcaje de la sonda:

- Directo: fluorocromos
- Indirecto: biotina, digoxigenina,...

Desnaturalización de la sonda y de la muestra:

- alta temperatura (73-80°C)
- separación de la doble hebra

Reacción de hibridación:

- 37°C
- Unión sonda-muestra

Lavados posthibridación:

- Eliminar reactivos y restos de sonda que no se han unido

Revelado (sondas de marcaje indirecto)

Contratinción

- DAPI II: se intercala en el ADN genómico y permite la visualización de la morfología nuclear

Visualización al microscopio

Figura 10. Etapas de la técnica de hibridación *in situ* fluorescente (Adaptada de Speicher and Carter 2005).

Las sondas de FISH se utilizan de forma rutinaria en el diagnóstico de las neoplasias hematológicas y de algunos tumores sólidos como el cáncer de mama o de pulmón, entre otros. Sin embargo, otra de las aplicaciones de esta técnica es confirmar los resultados de ganancias y/o pérdidas de material genómico obtenidos a partir de microarrays de ADN genómicos.

4.1.1 Tipos de sondas

Según el tipo de alteración a estudiar, se empleará un diseño de sonda concreta. Los tipos de sondas se detallan a continuación y se representan gráficamente en la figura 11:

- Las sondas centroméricas están formadas por secuencias repetitivas de ADN que hibridan con el ADN de la región centromérica del cromosoma. Estas sondas permiten detectar alteraciones cromosómicas numéricas (ganancias o pérdidas de un cromosoma).
- Las sondas de secuencia única o *locus* específico hibridan con el ADN de una región genómica concreta, correspondiente a un gen o banda cromosómica de interés. Con ellas es posible detectar tanto alteraciones numéricas como estructurales.
- Las sondas de pintado cromosómico consisten en un cóctel de sondas que cubren un cromosoma completo. Estas sondas se utilizan para definir anomalías estructurales difíciles de concretar a partir del cariotipo.
- Las sondas teloméricas se utilizan para detectar reordenamientos submicroscópicos en las regiones subtelo méricas asociados principalmente a síndromes de retraso mental muy difíciles de detectar mediante técnicas de citogenética convencional.

En la actualidad existe un número elevado de sondas comerciales. Sin embargo, en el caso de querer analizar una región genómica para la cual no exista sonda comercial, se puede proceder a diseñar una sonda “no comercial”.

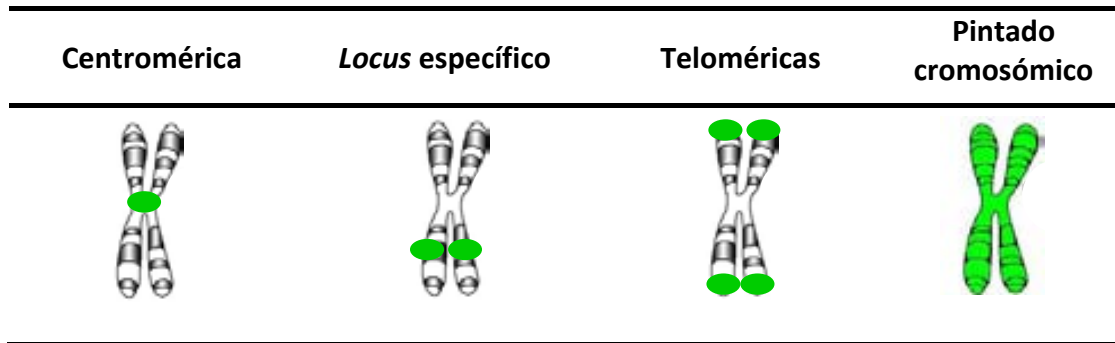


Figura 11. Representación de los distintos tipos de sondas

4.1.2 Sondas no comerciales

Las sondas no comerciales o de elaboración casera se pueden fabricar a partir de moléculas de ADN complementario (ADNc) (von Deimling *et al.* 1999), plásmidos (Tsuchiya *et al.* 2002), cósmidos (Tsuchiya *et al.* 2002), clones P1 (Mark *et al.* 2005), fósmidos (Birren *et al.* 1996), YACs (del inglés, *yeast artificial chromosome*) (Liehr *et al.* 2002) o BACs (del inglés, *bacterial artificial chromosome*) (Liehr *et al.* 2002).

Actualmente, los vectores más comúnmente utilizados para la elaboración de sondas de FISH son los BACs. Los BACs son F-plásmidos que contienen una secuencia del genoma humano de un tamaño de 3.000 a 30.000 bp y un gen de resistencia a antibiótico. Normalmente, los clones de BACs se conservan en bacterias *E. coli* cultivados en medio LB (Luria-Bertoni). Las principales ventajas del uso de BACs son, en primer lugar su tamaño y en segundo lugar, su secuencia bien definida, lo que favorece el correcto marcaje, y por lo tanto facilita la evaluación de los resultados de FISH.

4.2 Técnica de *microarrays*

Se le denomina *microarray* a una colección de elementos ordenados ortogonalmente, en filas y columnas sobre un soporte sólido. Dicho soporte puede ser o bien un

portaobjetos de cristal o membranas de nylon o plástico donde podemos encontrar material genético (ADN [microarrays genómicos] o ADNc [microarrays de expresión]), tejidos (microarrays de tejidos), proteínas o células.

4.2.1 Microarrays de ADN genómico

Los microarrays de ADN genómico se emplean para detectar cambios en el número de copias de ADN. Esta técnica surgió como la evolución de la técnica de hibridación genómica comparada (CGH, del inglés *comparative genomic hybridization*) desarrollada a principios de los años 90 (Kallioniemi *et al.* 1992). La técnica de CGH se basa en la hibridación competitiva de un ADN tumoral contra un ADN normal, marcados con dos moléculas fluorescentes de diferente color, sobre una extensión de metafases normales. La aplicación de la CGH ha permitido la caracterización genética de numerosas neoplasias. Sin embargo, la resolución de la CGH oscila entre 5-10 Mb siendo ésta la principal limitación de la técnica.

La técnica de microarrays de hibridación genómica comparada (arrayCGH) fue descrita a finales de los años 90 (Solinas-Toldo *et al.* 1997; Pinkel *et al.* 1998) y su fundamento es el mismo que el de la CGH convencional metafásica. La diferencia entre ambas técnicas es que la hibridación, en vez de realizarse sobre una extensión de metafases, se realiza sobre un soporte sólido. Este soporte contiene de miles a millones de sondas de BACs (BACarrayCGH) u oligonucleótidos (OligoarrayCGH) que cubren todo el genoma, o bien una región concreta, dependiendo del diseño del microarray. Con la aplicación de esta técnica se ha conseguido solventar la limitación de resolución de la técnica de CGH, y por tanto estudiar el genoma con una resolución mucho mayor, descubriendo nuevos marcadores desconocidos hasta el momento.

Recientemente, se ha desarrollado la técnica de “*SNParrays*”, un tipo array de oligonucleótidos que permite el estudio de *SNPs* (del inglés, *single nucleotide polymorphism*) o polimorfismos de un solo nucleótido. A diferencia de los arrayCGH, la reacción de hibridación no es competitiva, es decir no se mezcla un ADN tumoral junto con un ADN sano, sino que sólo la muestra tumoral se hibrida sobre el array y posteriormente se compara con bases de datos de población normal (HapMap) o bien con una muestra sana del mismo paciente, que se ha hibridado en un array independiente. La principal ventaja de este tipo de microarray genómico es la detección de alteraciones alélicas sin cambio en el número de copias, conocidas como disomías uniparentales adquiridas (aUPD, del inglés *acquired uniparental disomy*). Se ha demostrado que este fenómeno es más común de lo que inicialmente se pensaba en los procesos tumorales. El efecto patogénico de las aUPD consiste en que aunque no haya cambio en el número de copias, debido a la duplicación de uno de los cromosomas parentales, las posibles mutaciones que puedan estar presentes ya no son contrarrestadas por su alelo sano, adquiriendo por tanto un efecto patogénico que puede favorecer al desarrollo tumoral (Figura 12).

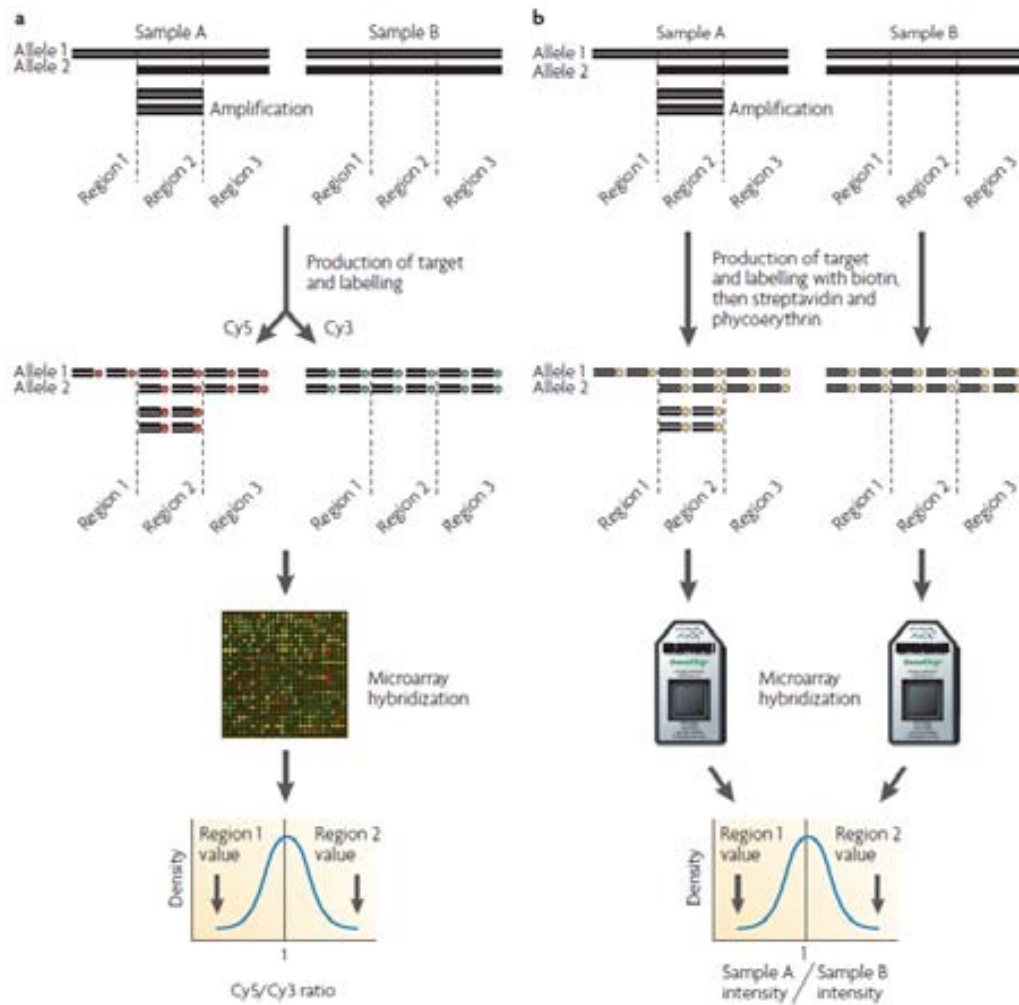


Figura 12. Esquema de los procesos básicos de los microarrays de hibridación genómica comparada (a) y de los *SNParrays* (b) (Gresham *et al.* 2008).

4.3 TÉCNICAS PARA EL ANÁLISIS DE LA INESTABILIDAD CROMOSÓMICA

Existen dos tipos de inestabilidad genética, la inestabilidad de microsatélites y la inestabilidad cromosómica. Mientras que la inestabilidad de microsatélites se debe a mutaciones puntuales que dan lugar a fallos en los mecanismos de reparación del ADN, la inestabilidad cromosómica es debida a pérdidas y ganancias de cromosomas o regiones cromosómicas, translocaciones, amplificaciones o deleciones homocigotas (Lengauer *et al.* 1998).

Para evaluar el grado de inestabilidad cromosómica presente en un tumor se han empleado técnicas de citogenética convencional y más recientemente técnicas de citogenética molecular como la hibridación *in situ* fluorescente, las técnicas de CGH convencional así como los microarrays genómicos, todas ellas comentadas anteriormente.

5. CARACTERÍSTICAS GENÉTICAS DE LOS LCPCT

5.1 PERFIL GENÉTICO DE LA MF

Estudios de citogenética convencional y cariotipado espectral

La MF es un tumor relativamente poco estudiado con técnicas de citogenética convencional, debido a la dificultad de obtener células en división procedentes del tumor cutáneo (Harwix *et al.* 2001). Sin embargo, existen diferentes publicaciones en las cuales se analizan las células tumorales en sangre periférica (Karenko *et al.* 1997; Batista *et al.* 2006).

Los estudios más destacados son los publicados por Batista *et al.* (Batista *et al.* 2006) y Padilla-Nash *et al.* (Padilla-Nash *et al.* 2007). En el primer trabajo Batista *et al.* estudiaron mediante SKY (del inglés, *spectral karyotyping*) muestras de sangre periférica en ocho pacientes afectados de MF en estadios avanzados (MFt). Únicamente, dos de éstos pacientes presentaron alteraciones citogenéticas que no pudieron considerarse recurrentes entre los distintos pacientes. Posteriormente, Padilla-Nash *et al.* estudiaron cuatro pacientes afectados de MF en estadios iniciales de los cuales se

establecieron cuatro líneas celulares a partir de biopsias cutáneas. De todos ellos, se procedió al análisis cromosómico mediante la técnica de SKY (técnica de citogenética molecular en la que cada uno de los cromosomas es identificado por un color característico). De los cuatro pacientes se observó que dos presentaban un cariotipo normal mientras que los dos pacientes restantes presentaron clones aislados, siendo las alteraciones más recurrentes la trisomía 21, del(5)(p15.1), del(17)(p12) y la del(18)(p11.2). Con respecto a las alteraciones estructurales detectadas, ninguna de ellas se pudo considerar recurrente (Padilla-Nash *et al.* 2007).

Estudios de hibridación genómica comparada (CGH)

Como se ha comentado anteriormente, la CGH es una técnica de citogenética molecular que permite estudiar las ganancias y pérdidas a nivel de todo el genoma. Esta técnica presenta dos principales ventajas: (i) proporciona una visión global del genoma en un solo experimento y (ii) no necesita células en división como sucede con la citogenética convencional.

Debido a la dificultad de obtener células tumorales en división, la técnica de CGH es la que más se ha empleado para la caracterización genética de las MF. Los estudios de CGH en MF han descrito a los cromosomas 1, 8, 9, 10, 11, 12 y 17 como los más afectados en las distintas series (Karenko *et al.* 1999; Mao *et al.* 2002; Fischer *et al.* 2004). Aunque se han publicado muchos estudios que describen alteraciones genéticas recurrentes, y algunas de ellas se han asociado con un pronóstico desfavorable, parece que la importancia de estos marcadores es limitada debido a que se han establecido a partir de estudios realizados en series cortas y heterogéneas de pacientes.

Recientemente, Prochazkova *et al.* (Prochazkova *et al.* 2007) analizaron una serie homogénea de pacientes diagnosticados de MFt mediante CGH. Las alteraciones recurrentes identificadas fueron las pérdidas de 17p, 10q, 2q36qter, 9p21 y las ganancias del cromosoma 7 y de 17q, 9q34qter, 8q (Prochazkova *et al.* 2007).

Estudios de microarrays de hibridación genómica comparada (arrayCGH)

La aplicación de la técnica de arrayCGH al estudio de la MF ha permitido el hallazgo de genes candidatos implicados en su patogénesis. El primer estudio fue realizado por Mao *et al.* (Mao *et al.* 2003a) que incluyó cinco pacientes con SS (ver punto 5.2) y dos con MFt empleando la plataforma *AmpliOnc I DNA array* (Vysis, Downers Grove, IL, EEUU) un BACarrayCGH que incluye 59 clones de 57 oncogenes que se han encontrado comúnmente amplificados en distintas neoplasias humanas. Las alteraciones comunes de las 2 MFs fueron las ganancias de las regiones 3p25 (*RAF*), 8p22 (*CTSB*), 8p11 (*FGFR1*), 11p15 (*HRAS*), 19p13 (*JUNB*), 20q13 (*PTPN1*) y 22q11 (*BCR*). En la validación de resultados en una serie independiente se observó que el gen *JUNB* está frecuentemente amplificado y sobreexpresado en la MF, así como en otros LCPCT, lo que sugiere un papel patogénico de este marcador en este tipo de linfoma. Recientemente, Carbone *et al.* (Carbone *et al.* 2008) han estudiado 16 pacientes con MF en estadios iniciales utilizando la plataforma comercial *Human Genome CGH Microarray Kit 44B* (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, EEUU). Las alteraciones más recurrentes fueron la monosomía del cromosoma 19 seguido de las deleciones de las regiones 12q24.31, 7p22.1, 7q11.1q11.23, 9q34.12, 16q22.3q23.1 y las ganancias de 8q22.3q23.1 y 21q22.12. Estos autores han centrado sus estudios en las deleciones recurrentes de la región 12q24.31, en la cual se hallan los genes supresores de

tumores *BCL7A*, *SMAC/DIABLO*, y *RHOF* que tienen un importante papel patogénico en neoplasias hematológicas. Estas regiones cromosómicas y genes podrían estar implicados en las fases iniciales del desarrollo de la MF. Sin embargo, los resultados hallados en este estudio no coinciden con los descritos en fases más avanzadas de la enfermedad. Con respecto a estadios más avanzados, Van Doorn *et al.* (van Doorn *et al.* 2009) analizaron 22 pacientes empleando un BACarrayCGH no comercial que incluía 3.500 sondas. Las alteraciones citogenéticas más frecuentemente halladas fueron las ganancias de 7q36, 7q21-7q22 y las pérdidas de las regiones 5q13, 9p21 y 13q14. Además, las deleciones de 9p21.3 y las ganancias de 8q24 y 1q21q22 se relacionaron con una peor supervivencia global de los pacientes. Sin embargo, aunque con la plataforma de BACarrayCGH se pueden detectar cambios en el número de copias, el tamaño de estas sondas (100-300 kb) puede obviar la detección de alteraciones más pequeñas (Gunnarsson *et al.* 2008).

Los resultados de los estudios más relevantes hasta la realización de esta tesis sobre alteraciones genéticas en la MF se detallan en la tabla 3.

Tabla 3. Resumen de los resultados de las series de MFt analizadas mediante las técnicas de CGH y arrayCGH

Publicación	n	Técnica aplicada	Alteraciones recurrentes
Karenko <i>et al.</i> J Invest Dermatol, 1999	4	CGH	No observaron alteraciones
Mao <i>et al.</i> Br J Dermatol, 2002	6	CGH	Pérdidas: 1p y 17p
Fischer <i>et al.</i> J Invest Dermatol, 2004	5	CGH	Ganancia: 8q
Prochazkova <i>et al.</i> Genes Chromosomes Cancer, 2007	11	CGH	Ganancias: 1p36, 7, 9q34, 17q24qter, 19 Pérdidas: 2q36qter, 9p21 y 17p
Mao <i>et al.</i> Blood, 2003	2	BACarrayCGH	Ganancias: 3p25, 8p11, 8p22, 19p13, 20q13, 22q11
Van Doorn <i>et al.</i> Blood, 2008	22	OligoarrayCGH	Ganancias: 7q36, 7q21q22 Pérdidas: 5q13, 9p21

5.2 PERFIL GENÉTICO DEL SÍNDROME DE SÉZARY

Estudios de citogenética convencional y cariotipado espectral

A diferencia de la MF, en el SS existen numerosos estudios en los que se ha aplicado tanto la técnica de citogenética convencional como la técnica de SKY o FISH multicolor (M-FISH). Esto se debe al mejor crecimiento de los cultivos, ya que la célula patológica se encuentra en sangre periférica (Sole *et al.* 1995; Thangavelu *et al.* 1997; Mao *et al.* 2003b; Espinet *et al.* 2004; Batista *et al.* 2006). En la revisión publicada por Mao *et al.* (Mao *et al.* 2003b), se compararon los resultados obtenidos por este grupo con los datos de todos los estudios publicados hasta ese momento en los cuales se estudiaron las características citogenéticas del SS mediante las técnicas de citogenética

convencional y M-FISH. En dicho trabajo concluyeron que las alteraciones más frecuentemente descritas en el SS fueron las pérdidas de los cromosomas 10 y 1p, la presencia del isocromosoma 17q y las translocaciones que afectaban a 1p, 10q y 14q.

Estudios de hibridación genómica comparada (CGH)

Por otra parte, en el SS también existen trabajos en los que se ha aplicado la técnica de CGH (Karenko *et al.* 1999; Mao *et al.* 2002; Barba *et al.* 2008). El más destacado fue el realizado por Mao *et al.* (Mao *et al.* 2002) en el cual se estudiaron un total de 20 SS. Las alteraciones más frecuentemente observadas fueron las pérdidas en 1p, 10, 10q, 17p y 19, y las ganancias de 17q y 18.

Estudios de microarrays de hibridación genómica comparada

El primer análisis mediante esta técnica fue realizado por Mao *et al.* (Mao *et al.* 2003a). En dicho trabajo se estudiaron sólo cinco pacientes afectos de SS empleando el *AmpliOnc I DNA array* (Vysis) cuyas características se han comentado anteriormente (pag. 34). Hallaron como alteraciones recurrentes (observadas en al menos dos pacientes) las ganancias de *MYCL1* (1p34), *RAF1* (3p25), *PIK3CA* (3q26), *CTSB* (8p22), *FGFR1* (8p11), *PAK1* (11q13), *GLI* (12q13), *FES* (15q26), *MYBL2* (20q13), *PTPN1* (20q13), *ZNF217* (20q13) y *BCR* (22q11) y las pérdidas de *MOS* (8q11), *GARP* (11q13), *MLL* (11q23).

Recientemente, se han descrito estudios más extensos en los que se incluyeron un número mayor de pacientes (Vermeer *et al.* 2008 [n=20]; Caprini *et al.* 2009 [n=28]; Laharanne *et al.* 2010a [n=16]). Además, las plataformas utilizados eran de mejor

resolución que la describió por Mao *et al.*, lo que ha permitido establecer el perfil genético del SS (Vermeer *et al.* 2008; Caprini *et al.* 2009; Laharanne *et al.* 2010a).

5.3 PERFIL GENÉTICO DE LOS PROCESOS LINFOPROLIFERATIVOS CUTÁNEOS PRIMARIOS DE CÉLULAS T CD30+: PAPULOSIS LINFOMATOIDES Y LINFOMAS CUTÁNEOS ANAPLÁSICOS DE CÉLULA GRANDE CD30+

Estudios de citogenética convencional

Existen sólo dos estudios en los que se haya aplicado la técnica de citogenética convencional en los procesos linfoproliferativos cutáneos CD30+. El primero de ellos descrito por Peters *et al.* (Peters *et al.* 1995) analizaron a un paciente que presentaba una papulosis linfomatoide (PL). Tras aplicar la técnica de citogenética convencional de los linfocitos atípicos CD30+, se observó la presencia de trisomía 7 así como alteraciones estructurales que afectaban a la región cromosómica 10q24. En el segundo estudio publicado por Ott *et al.* (Ott *et al.* 1998) analizaron una serie de 11 linfomas de célula grande CD30+ entre los cuales incluyeron tres pacientes afectados de linfoma anaplásico de célula grande CD30+ (LCACG-CD30+). Observaron la presencia de cariotipos complejos en los tres casos, de los cuales cabe destacar la presencia de alteraciones recurrentes como la del(6)(q21), add(10)(q26) y la trisomía 21 (Tabla 4).

En ninguno de los casos estudiados en ambos trabajos se observó la presencia de la t(2;5)(p23;q35) la cual yuxtapone a los genes *ALK* y *NPM*. Dicha translocación da lugar a la expresión de la proteína quimérica p80^{NPM/ALK} y es una alteración recurrente en los linfomas anaplásicos CD30+ nodales que no se observa en los LCACG-CD30+ (DeCoteau *et al.* 1996). Actualmente, la detección de este reordenamiento se utiliza como

herramienta para el diagnóstico diferencial entre este tipo de linfomas y los LCACG-CD30+.

Tabla 4. Cariotipo de tres pacientes afectados de LCACG-CD30+ (Adaptada de Ott *et al.* 1998)

Paciente	Tejido	Cariotipo
9	Piel	50- 59,XY,+X,+add(1)(p13)x2,+2,+2,+4,+del(6)(q21q23),+7,+9,dup(12)(q21q24),+der(12)dup(12)(q21q24),+14,+17,+21
10	Piel	49,Y,add(X)(?p11),- 1,der(1)t(1;3)(q11;?p13),add(2)(q37)x2,del(2)(q13),+del(2)(q13),add(3)(?p13),add(4)(q31.1),add(5)(q33),del (6)(q21),del(7)(q22q32),add(8)(q24),+9,t(9;11)(q34;q23),add(10)(q26),del(11)(p11),-16,+21,der(22)t(1;22)(q13;p13),+der(?)t(?;1)(?;q21)
11	Piel	46,Y,add(X)(p10),add(1)(p36),t(2;?14)(p?25;q?24),del(3)(q?21),del(4)(q31),del(7)(p13),del(9)(q34),add(10)(q?26),der(12)add(12)(p10)add(12)(q22),del(14)(q24),i(17)(q10),-18,del(18)(q22),-20,-21,+mar1x2,+r

Estudios de hibridación genómica comparada (CGH)

Así como en los estudios de citogenética convencional, existen pocos trabajos en los que se hayan analizado las alteraciones genéticas de los LCACG-CD30+ mediante la técnica de CGH convencional. El primer estudio fue publicado por Mao *et al.* en el año 2003 (Mao *et al.* 2003c). En dicho trabajo se analizaron 15 pacientes y se observaron como alteraciones recurrentes las ganancias de 1/1p, 5, 6, 7, 8/8p y 19.

En este mismo año, el grupo francés analizó mediante esta misma técnica nueve LCACG-CD30+ (Prochazkova *et al.* 2003). El objetivo de este trabajo fue el de comparar el perfil genético de tumores que presentaban o no recaídas. Finalmente observaron como alteraciones más recurrentes la ganancia del cromosoma 9 y las deleciones en 6q21 y 18p11.3.

Estudios de microarrays de hibridación genómica comparada

En el mismo trabajo mencionado en el punto anterior, Mao *et al.* (Mao *et al.* 2003c) realizó el primero análisis de arrayCGH en esta patología utilizando la plataforma *AmpliOnc I DNA array* (Vysis). Concretamente, este trabajo analizó cinco pacientes con LCACG-CD30+ previamente estudiados por la técnica de CGH convencional y observó como alteraciones recurrentes las ganancias de *FGFR1* (8p11), *MYCN* (2p24), *RAF1* (3p25), *CTSB* (8p22), *FES* (15q26) y *CBFA2* (21q22).

Durante los últimos años han surgido distintos trabajos que han empleado plataformas con mayor resolución a la utilizada por Mao *et al.* (Mao *et al.* 2003c), cuyos objetivos han sido caracterizar a más profundidad esta entidad (Laharanne *et al.* 2010a; van Kester *et al.* 2010; Sanchez-Schmidt *et al.* 2011). Van Kester *et al.* (van Kester *et al.* 2010), analizaron 11 pacientes afectados de LCACG-CD30+ con una plataforma de 3.500 BACs que cubría todo el genoma. El objetivo de dicho trabajo era el de analizar las diferencias genéticas entre los LCACG-CD30+ y los linfomas de células T periféricos (LCTP). Las alteraciones que observaron más frecuentemente en los LCACG-CD30+ fueron las ganancias en 7q, 1p y 17q y las pérdidas en 6q, 13q y 8p. Posteriormente, Laharanne *et al.* (Laharanne *et al.* 2010a) estudiaron el perfil genético de un grupo de LCPCT entre los cuales incluyeron 18 LCACG-CD30+. En este trabajo emplearon una plataforma de 44.000 oligonucleótidos (oligoarrayCGH) (*Human Genome Microarray 44K, Agilent Technologies*) con una resolución mayor a la plataforma empleada por van Kester *et al.* (van Kester *et al.* 2010). Las alteraciones más frecuentemente observadas fueron las pérdidas en 7p, 8p, 13q, 16p, 6q, 1p y 20p, y la ganancia en 7q21q31.

Finalmente, un estudio cooperativo europeo liderado por el grupo español (Sanchez-Schmidt *et al.* 2011) analizaron 19 pacientes con el mismo microarray empleado por Laharanne *et al.* (Laharanne *et al.* 2010a). En este análisis describieron como alteraciones recurrentes las ganancias observadas en 16p y 1p, y las pérdidas en 16q, 13q, 17p y 20q.

Hipótesis y Objetivos

HIPÓTESIS

Se considera que el cáncer es una enfermedad genética compleja que incluye alteraciones estructurales y de expresión de oncogenes y genes supresores de tumores. La identificación de perfiles genómicos contribuye a expandir nuestro conocimiento de los mecanismos patogénicos implicados en el desarrollo de las neoplasias malignas.

Las técnicas de citogenética convencional, hibridación genómica comparada convencional y FISH con sondas de locus específico han permitido detectar alteraciones citogenéticas recurrentes tanto en neoplasias hematológicas como en tumores sólidos. Sin embargo, los estudios realizados con estas técnicas en la micosis fungoide (MF) son escasos, incluyen series heterogéneas de pacientes así como un bajo número de casos, motivos por los cuales es una entidad poco caracterizada genéticamente. Por lo tanto, son necesarios más estudios con técnicas de mayor resolución y un mayor número de casos para poder estudiar con más profundidad la genética de este tipo de linfoma.

La detección de las alteraciones genéticas subyacentes en las lesiones tumorales de MF (MFt) representará un importante avance en la búsqueda de los mecanismos patogénicos implicados en el desarrollo de estas neoplasias malignas. Asimismo, la definición de los perfiles genómicos en la MF puede permitir definir marcadores diagnósticos y de progresión de esta enfermedad, y facilitar el diseño de tratamientos futuros más específicos y selectivos.

OBJETIVOS

Objetivos generales

Conocer los mecanismos genómicos involucrados en la patogenia de la MFt, así como analizar la relación de dichos hallazgos con las características clínicas, biológicas y evolutivas de los pacientes.

Objetivos específicos

1. Analizar las ganancias y pérdidas cromosómicas en la MFt mediante la técnica de oligoarrayCGH.
2. Analizar, mediante la técnica de FISH, las alteraciones estructurales que afectan a los loci del gen del receptor de células T (*TCR: TCRAD, TCRB y TCRG*) con el fin de definir si existen anomalías en estos genes de forma recurrente, como ocurre en otros linfomas de células T.
3. Definir el perfil de inestabilidad genética en la MF tumoral y analizar, mediante herramientas bioinformáticas, cuales son las regiones cromosómicas más implicadas.
4. Evaluar el significado clínico-biológico de las alteraciones genómicas detectadas en relación con las características clínicas, histopatológicas y de evolución clínica de los pacientes.
5. Comparar los perfiles genéticos de la MF tumoral con aquellos descritos para otros LCPCT (SS y LCACG-CD30+) para conocer las similitudes y diferencias a nivel genético de estas entidades.

Material y Métodos

MATERIAL

1.1 Selección de pacientes y controles

Se incluyeron un total de 60 muestras de LCPCT distribuidos de la siguiente manera:

- Micosis fungoide tumorales (Mft): 41
- Linfomas cutáneos anaplásicos de célula grande CD30+ (LACG-CD30+): 6
- Síndrome de Sézary (SS): 13

Como muestras control, se incluyeron 10 ganglios reactivos y 10 muestras de sangre periférica, así como un *pool* de ADN comercial (Promega, Madison, WI, EEUU) para el estudio de oligoarrayCGH.

Las muestras procedían de los bancos de tumores de los siguientes hospitales: Hospital del Mar (Barcelona), Hospital Clínic (Barcelona), Hospital de Sant Pau (Barcelona), Hospital Universitari de Bellvitge (L'Hospitalet de Llobregat), Hospital 12 de Octubre (Madrid), Leiden University Medical Center (Leiden, Holanda) y University Hospital Zürich (Zürich, Suiza). En todos los casos, se obtuvo el consentimiento informado de los enfermos siguiendo los criterios de la Declaración de Helsinki y el estudio fue aprobado por el comité ético del Hospital del Mar (CEIC-PSMAR).

El número de pacientes y controles incluidos en los diferentes estudios se detallan en cada uno de los trabajos presentados en esta tesis en el apartado de resultados (pag. 80).

2. MÉTODOS

2.1 Microarrays de hibridación genómica comparada

La técnica de microarrays de hibridación genómica comparada fue realizada con las plataformas comerciales *Human Genome CGH 44K microarrays* y *Human Genome CGH 4x44K microarrays* (G4410B y G4426B) (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, EEUU). Ambas plataformas consisten en un microarray de 44.000 oligonucleótidos (oligoarrayCGH) que cubren todo el genoma con una resolución promedio de 75 kb. Es importante destacar que la única diferencia entre ambas plataformas es el formato. Mientras que en la plataforma *Human Genome CGH 44K microarrays* un portaobjetos incluía un único array, en la plataforma *Human Genome CGH 4x44K microarrays*, se incluían cuatro arrays (Figura 13).

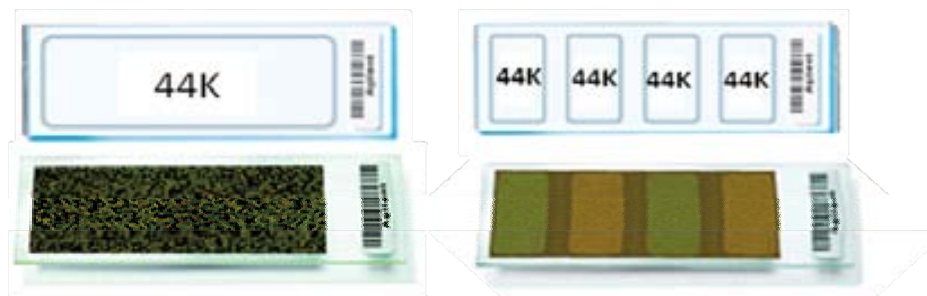


Figura 13. Microarrays de hibridación genómica comparada de oligonucleotidos empleados en el análisis de 41 MfT: *Human Genome CGH 44K microarrays* (derecha) y *Human Genome CGH 4x44K microarrays* (izquierda).

La técnica de arrayCGH consiste en primer lugar en un proceso de digestión de los ADNs, control y tumoral, que seguidamente son marcados con moléculas fluorescentes de distinto color para ser posteriormente mezclados e hibridados sobre los arrays genómicos. En la figura 14 se resumen las etapas de dicho proceso.

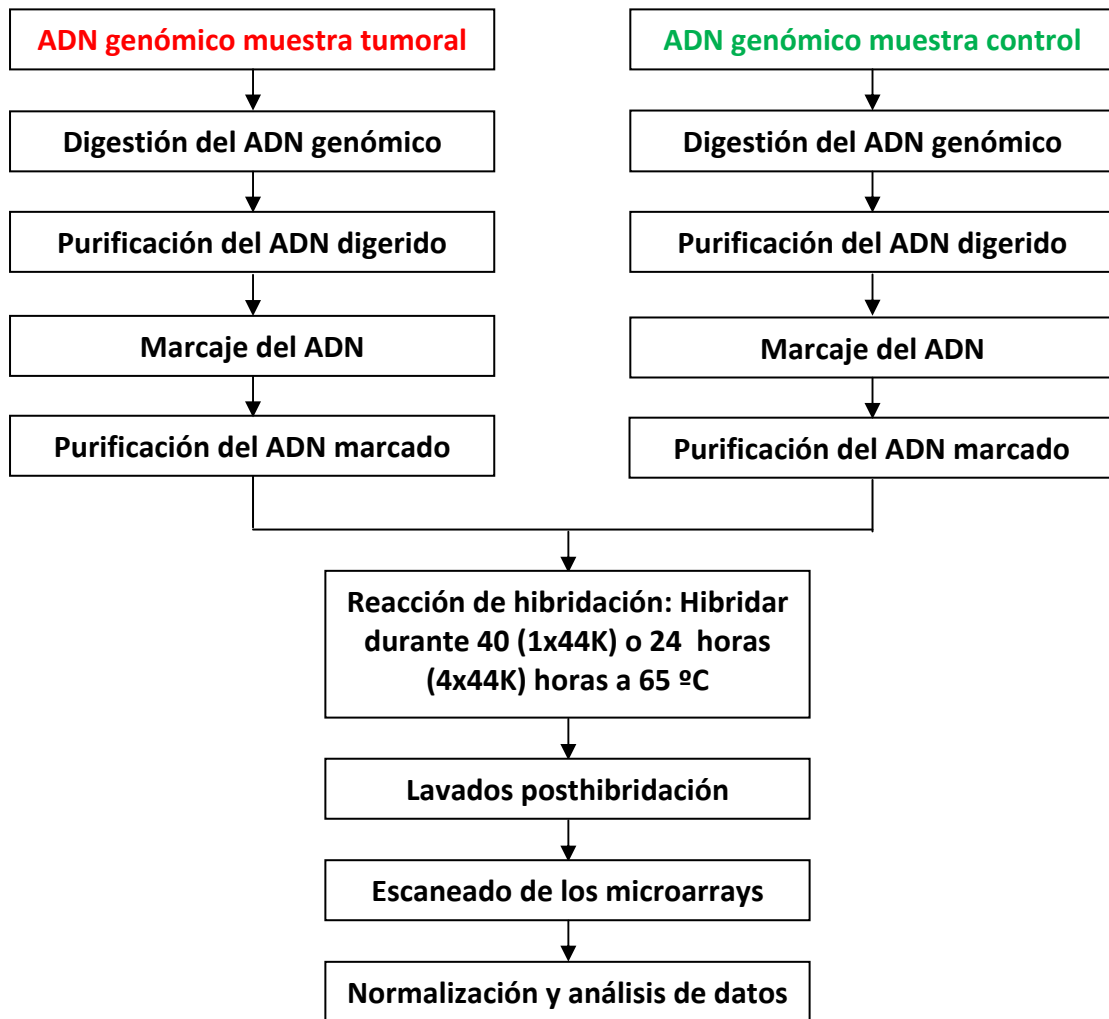


Figura 14. Diagrama de las etapas del proceso de hibridación para los oligoarrayCGH empleados en la presente tesis.

A continuación se especifican los detalles técnicos de cada una de las etapas de la técnica de microarrays de hibridación genómica comparada.

2.1.1 Extracción de ADN

La extracción de ADN de todas las muestras se realizó a partir de muestras incluidas en *Tissue-Tek® O.C.T™ Compound* (Sakura Finetek Tissue-Tek O.C.T. Compound,

Zoeterwoude, Países bajos) y conservadas a -80 °C en los bancos de tumores de cada uno de los centros participantes en el estudio.

Se empleó el kit comercial *DNeasy Blood & Tissue Kit* (Qiagen, Hilden, Alemania) siguiendo las condiciones del fabricante que se detallan a continuación.

Reactivos

El *DNeasy Blood & Tissue Kit* (Qiagen) incluye:

- Columnas de purificación, tubos colectores
- Tampón de lisis tisular (ATL)
- Proteinasa K (>600 mAU/ml)
- Tampón de lisis (AL)
- Soluciones de lavado 1 y 2 (AW1 y AW2)

PBS 10x (Roche, Barcelona, España)

Etanol absoluto (Merck, Darmstadt, Países Bajos)

Procedimiento

1. Realizar 20 cortes seriados de 10 µm en el criostato y almacenarlos en un tubo estéril de 1,5 ml.

Eliminación de los restos de O.C.T. de la muestra:

2. Añadir en el eppendorf 1 ml de PBS 1x.
3. Realizar un vórtex hasta que el tejido quede desenganchado de las paredes del tubo de 1,5 ml.
4. Centrifugar 5 min a 3.000 rpm
5. Eliminar el sobrenadante con una pipeta *Pasteur* de 1 ml.

Digestión de la muestra:

6. Añadir 180 µl de tampón ATL y 20 µl de proteinasa K. Mezclar con vórtex.
7. Sellar el eppendorf con parafilm e incubar en un baño a 56°C toda la noche para que la proteinasa K digiera el tejido.

Extracción de ADN

8. Antes de comenzar, encender el baño seco a 70°C y precalentar una alícuota de agua estéril para su posterior uso.
9. Retirar el parafilm y realizar un pulso de la muestra.
10. Añadir 200 µl de tampón AL. Mezclar bien con vórtex e incubar en baño seco a 70°C durante 10 min.
11. Añadir 210 µl de etanol absoluto y mezclar con vórtex durante 15 segundos.
12. Pasar la mezcla a una columna de purificación acoplada a un tubo colector y centrifugar 8.000 rpm durante 1 min. Descartar el tubo colector.
13. Poner la columna en un tubo colector nuevo y añadir 500 µl de tampón AW1. Centrifugar a 8000 r.p.m. durante 1 min.
14. Descartar de nuevo el tubo colector y colocar la columna en un tubo nuevo. Añadir 500 µl de tampón AW2. Centrifugar a máxima velocidad durante 3 min.
15. Descartar el tubo. Colocar la columna en un tubo estéril de 1,5 ml.
16. Añadir 50 µl de agua destilada precalentada a 70°C. Incubar 1 min a temperatura ambiente antes de centrifugar para hidratar la columna.
17. Centrifugar a 8.000 rpm durante 1 min.
18. Recoger los 50 µl y volverlos a filtrar por la columna para recoger los posibles restos de ADN que hayan quedado. Centrifugar a 8.000 rpm 1 min.
19. Almacenar a -20°C.

2.1.2 Análisis de la cantidad e integridad del ADN genómico

Para cuantificar el ADN genómico obtenido a partir de la extracción, se utilizó el espectrofotómetro (Nanodrop, Wilmington, DE, EEUU). Por otra parte para analizar la integridad del ADN se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio. Las muestras incluidas en el análisis por microarrays debían presentar el ADN lo más íntegro posible para asegurar un buen resultado de la hibridación (Figura 15).

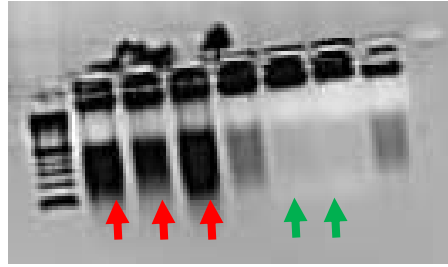


Figura 15. Valoración de un gel de bromuro de etidio para el análisis de la integridad del ADN. A la izquierda se observan tres muestras con *smear* pronunciado lo que indica degradación del ADN (↑), mientras que a la derecha se observan dos muestras (↑) muy conservadas y óptimas para el análisis por arrayCGH.

2.1.3 Digestión enzimática del ADN

El proceso de digestión del ADN de la muestra tumoral y control se realiza para evitar la formación de bucles de ADN, y conseguir la incorporación óptima de los fluoróforos en la reacción de marcaje. La digestión se lleva a cabo con las enzimas de restricción *Alu I* y *Afa I (Rsa I)* (GE Healthcare, Barcelona, Spain).

Reactivos

Enzima *Alu I* (GE Healthcare)

Enzima *Afa I (Rsa I)* (GE Healthcare)

Tampón T (*BSA-free*) (GE Healthcare)

Procedimiento

1. Antes de comenzar el procedimiento, precalentar un baño a 37°C para su posterior uso.
2. Descongelar las enzimas de restricción y el tampón T en hielo.
3. Preparar 2000 ng de ADN en un volumen de 42,5 µl.
4. Para cada una de las muestras se añadirá en un tubo de 1,5 ml esteril:
 - 5 µl Tampón T

- 1,25 µl de *Alu I* (10 U/µl)
 - 1,25 µl de *Afa I (Rsa I)* (10 U/µl)
5. Incubar la reacción a 37°C durante 2 horas.
 6. Mantener en hielo.

*Posible punto de parada: Se pueden conservar las muestras a –20°C hasta el día siguiente.

2.1.4 Purificación ADN digerido

Para la eliminación de los restos de tampón T y enzimas *Alu I* y *Afa I (Rsa I)* (GE Healthcare) que pueda interferir en el posterior proceso de marcaje, se procedió a la purificación del ADN usando el *kit* comercial *QiaPrep Spin Miniprep Kit* (Qiagen) siguiendo las indicaciones del fabricante.

Reactivos

El *QiaPrep Spin Miniprep Kit* (Qiagen) incluye:

- Columnas de purificación
- Tubos colectores
- Soluciones de lavado PB
- Tampón PE
- Tampón de elución (EB)

Procedimiento

1. Añadir 500 µl de tampón PB a cada una de las muestras de ADN control y tumoral, y traspasar el volumen a una columna de purificación.
2. Centrifugar a 13.000 rpm durante 1 min. Descartar tubo colector.
3. Añadir 750 µl de tampón PE a cada una de las muestras. Centrifugar a 13.000 rpm durante 1 min.

4. Repetir paso num. 3 para eliminar los posibles restos que puedan quedar en la columna.
5. Dejar secar la columna durante 5 min para eliminar los restos de etanol que podrían interferir en el proceso de hibridación.
6. Descartar tubo colector y colocar la columna en un tubo estéril de 1,5 ml.
7. Añadir 50 µl tampón EB y centrifugar a 13.000 rpm durante 1 min.

Tras la purificación de ADN, se comprueba nuevamente la calidad y cantidad de ADN mediante un gel de agarosa al 1% y espectrofotometría (Nanodrop), respectivamente, de todas las muestras procesadas para comprobar si el ADN esta correctamente fragmentado y confirmar la presencia de la cantidad de partida de ADN (2.000 ng).

2.1.5 Marcaje del ADN

Para la realización del marcaje del ADN se utilizó el kit comercial *BioPrime Array CGH labeling system* (Invitrogen, Carlsbad, CA, EEUU). En este kit se emplean *random primers* y una forma mutante del fragmento *Klenow* de la ADN polimerasa I (*exo-klenow* polimerasa), que carece de actividad exonucleasa (tanto 5'-3' como 3'-5'), mucho más efectiva que la *Klenow* convencional.

Con esta enzima se consigue el marcaje selectivo de las muestras de ADN genómico con nucleótidos marcados con fluorescencia. Con este kit, el ADN genómico se une a los *random octamers*. Los primers se extienden gracias a la reacción de polimerización bajo unas condiciones de alta concentración de la enzima *exo-klenow* y los nucleótidos marcados lo que resulta en un buen rendimiento de incorporación de nucleótidos y en una amplificación del material de partida de unas 7-10 veces.

Reactivos

Kit BioPrime Array CGH labeling system (Invitrogen):

- *Exo-Klenow Fragment* (40 U/ μ l)
- *2,5x Random Primers Solution*
- *10x dUTP Nucleotide Mix*
- *Tampón Stop* (0,5 M EDTA pH 8,0)

Cy5 d-UTP (GE Healthcare)

Cy3 d-UTP (GE Healthcare)

Procedimiento

1. Antes de comenzar, preparar baños secos a 95°C, 37°C y 65°C.
2. Añadir 20 μ l de *2,5x Random Primers Solution* a cada muestra y mezclar pipeteando.
3. Incubar a 95°C durante 5 min. y seguidamente incubar en hielo durante 5 min para parar la reacción.
4. Añadir a cada muestra:
 - 5 μ l de *10x d-UTP mix*
 - 3 μ l de Cy3 d-UTP (muestra control) ó Cy5 d-UTP (muestra problema)
 - 1 μ l de *Exo-Klenow*

Mezclar bien con la pipeta. Incubar a 37°C durante 3 horas.

5. Parar la reacción añadiendo 5 μ l de *tampón Stop* a cada una de las muestras.

* Posible punto de parada: Las muestras se pueden dejar a -20°C toda la noche.

2.1.6 Purificación del ADN marcado y cuantificación de la incorporación del fluorocromo

Una vez realizada la reacción de marcaje, se procede a purificar nuevamente los ADNs ya marcados usando columnas de purificación *Microcon YM-30* (Millipore, Billerica, MA, EEUU) para eliminar los nucleótidos y fluoróforos que no se hayan incorporado y que pueden interferir en el proceso de hibridación. Tras el primer lavado, se cuantifica la incorporación del fluoróforo de cada muestra tumoral y su correspondiente muestra

normal mediante espectrofotometría (Nanodrop). Esta medida viene dada en pmol/ μ l y el valor óptimo es entorno a 10 pmol/ μ l.

Reactivos y equipamiento

TE 1x (pH 8.0)

Columnas de purificación *Microcon YM-30* y tubos colectores (Millipore)

Soluciones

TE 1x: 10 ml de 1M Tris-HCl (pH 8,0) + 400 μ l de 0,25 M EDTA

Procedimiento

Purificación del ADN

1. Colocar los microcones en sus tubos colectores. Preparar un *microcon YM-30* y tubo colector para cada una de las muestras y controles.
2. Añadir 400 μ l 1x TE (pH 8,0) a cada tubo. Mezclar pipeteando.
3. Añadir los 480 μ l (80 μ l reacción de marcaje + 400 μ l TE) en un *microcon YM-30*.
4. Centrifugar a 9.000 rpm durante 10 min. Descartar el filtrado.
5. Añadir 480 μ l de 1x TE a cada filtro para eliminar cualquier resto que pueda quedar en el filtro.
6. Centrifugar a 9.000 rpm durante 10 min. Descartar el filtrado.
7. Colocar el filtro invertido en un tubo colector nuevo.
8. Centrifugar a 9.000 rpm durante 1 min.

Cuantificación de la incorporación del fluoróforo

9. Cuantificar las muestras en el NanoDrop (Program: *Microarray Measurement*).

2.1.7 Hibridación

Una vez se comprueba que los valores de incorporación de fluoróforos de las parejas muestra tumoral-muestra control son similares teniendo en cuenta la cuantificación en pmol/ μ l obtenida, se procede a mezclarlas y a preparar la reacción de hibridación. La

reacción se prepara con el kit comercial *Agilent Oligo aCGH hybridization kit* (Agilent Technologies). También se añade *Human Cot-1 DNA* (Roche) para bloquear las secuencias repetitivas del genoma que puedan interferir en el resultado final del análisis de arrayCGH. La mezcla se coloca en un *gasket*, un cubreobjetos con un área delimitada que corresponde al área del array. Finalmente, los arrays se colocan en las cámaras de hibridación (Agilent Technologies) y se hibridan durante 40 (1x44K) o 24 horas (4x44K).

Reactivos y equipamiento

Human Cot-1 DNA 1 µg/µl (Roche)

Agilent Oligo aCGH hybridization kit (Agilent Technologies):

- *Agilent 10x Blocking Agent*
- *Agilent 2x Hybridization Buffer*

Hybridization Chamber gasket slides (Agilent Technologies)

Human Genome CGH 44K microarrays [Num. Cat. G4410B [1x44K] y G4426B [4x44K]] (Agilent Technologies)

Cámaras de hibridación (Agilent Technologies)

Horno de hibridación (Agilent Technologies)

Procedimiento

1. Antes de su primer uso, añadir 1360 µl de agua *nuclease-free* al vial de 10x *Blocking Agent*. Dar un vórtex. Conservar a -20°C.
2. Preparar dos baños secos a 95°C y a 37°C.
3. Añadir a cada una de las muestras en el siguiente orden:
 - 50 µl *Human Cot-1 DNA*
 - 50 µl 10x *Blocking Agent*
 - 250 µl 2x *Hybridization Buffer*
4. Mezclar pipeteando y hacer un *spin* para que todo el contenido vaya al fondo.
5. Incubar 3 minutos a 95°C.

6. Inmediatamente colocar las muestras a 37°C durante 30 min.
7. Centrifugar a 13.000 rpm durante 1 min.
8. Colocar el *gasket* en la cámara de hibridación y añadir 500 µl de muestra sobre él.
9. Dejar caer el *array* sobre el *gasket* que contiene la muestra y sellar la cámara de hibridación.
10. Hibridar durante 40 (1x44K) ó 24 horas (4x44K) a 65 °C.

2.1.8 Lavado post-hibridación

Los lavados post-hibridación se realizan para eliminar los restos de reactivos y ADN marcados que intervienen en la reacción de hibridación que no han hibridado en el *microarray*. Debido a la susceptibilidad del Cy5 d-UTP a la degradación por contacto con el ozono, el proceso de los lavados posthibridación se realizó en una cámara libre de ozono.

Reactivos

SSPE 20x (Invitrogen)

N-Laurylsarcosine (Sigma)

Acetonitrilo puro (Romil)

Soluciones

Tampón de lavado 1 (W1) (0,5x SSPE/0,005% *N-Laurylsarcosine*): 25 ml SSPE 20x + 250 µl de *N-Laurylsarcosine*. Enrasar a 1 litro con agua destilada. Se preparan 2 litros para cada 5 arrays.

Tampón de lavado 2 (W2) (0,1x SSPE/0,005% *N-Laurylsarcosine*): 5 ml SSPE 20x + 250 µl de *N-Laurylsarcosine*. Enrasar a 1 litro con agua destilada. Se prepara 1 litro para cada 5 arrays.

Procedimiento

1. Precalentar el tampón W2 y un vaso de precipitados de 1 litro en estufa a 37°C el día anterior a los lavados.
2. Sacar los *arrays* del horno de hibridación.
3. Retirar cuidadosamente el *gasket* del *array* dentro de una cubeta con 1 litro de tampón W1 con la ayuda de unas pinzas.
4. Una vez se van retirando los *gaskets*, se van colocando los *arrays* en un cestillo.
5. Cambiar el tampón W1 y colocar el cestillo en el tampón W1 limpio.
6. Lavar en agitación durante 1 min.
7. Preparar el vaso de precipitado a 37°C con el tampón W2.
8. Pasar el cestillo al tampón W2. Lavar en agitación durante 1 min.
9. Pasar el cestillo a la cubeta con acetonitrilo. Incubar durante 30 seg mientras se agita manualmente.
10. Sacar el cestillo lentamente y colocar uno por uno los *arrays* en una caja opaca hasta el momento del escaneado.

2.1.9 Escaneado y normalización de los datos

El escaneado se realizó con el escáner de microarrays (G2565CA, Agilent Technologies). Las imágenes obtenidas se transformaron a intensidad de fluorescencia con el programa *Feature Extraction* v 9.1 (Agilent Technologies) y el método de normalización fue lineal. Los datos obtenidos fueron en formato Log_{10} (ratio de fluorescencia Cy5/ratio de fluorescencia Cy3).

2.1.10 Visualización y análisis de resultados

Para la interpretación y visualización de los resultados, se empleó el software *Agilent CGH Analytics* v 3.2.25 (Agilent Technologies). En primer lugar, se valoró la calidad de la hibridación del *array*. Para este análisis, se utilizó el parámetro *DLR Spread* (del inglés, *derivative log ratio spread*) que indica el grado de dispersión que hay entre dos

clones consecutivos del array. Para que el array sea valorable, el valor del *DLR Spread* tiene que ser $<0,3$. Posteriormente, se realizó un visionado de los resultados a nivel genómico, génico y cromosómico para valorar cada una de las ganancias y pérdidas obtenidas (Figura 16).

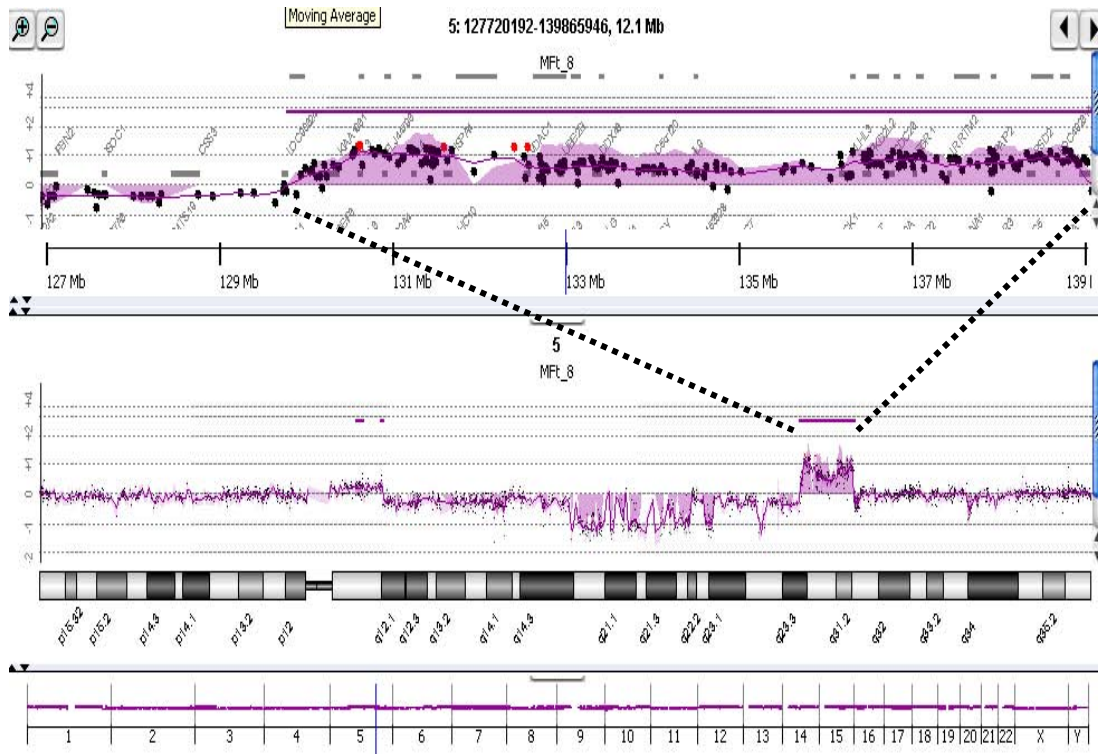


Figura 16. Visualización de los resultados a partir del software CGH Analytics v.3.2.25 (Agilent Technologies). En la parte inferior, se puede visualizar el perfil del genoma completo del paciente 8 (MfT_8) ya que se pueden observar las alteraciones que afectan a todos los cromosomas. En la parte central, se obtiene el perfil cromosómico ya que se observan las alteraciones que afectan al cromosoma 5 completo. Finalmente, en la parte superior se observan los genes de regiones concretas que previamente se han seleccionado.

A continuación, se realizó un análisis estadístico de los datos utilizando el software *InSilico arrayCGH* (<http://bioinfo.cipf.es>) (Conde *et al.* 2007) incluido en el paquete GEPAS suite (<http://gepas.bioinfo.cipf.es>) desarrollado por el Centro de Investigación Príncipe Felipe (Valencia). El método utilizado para dicho análisis fue el *Smoothing* que

calcula el valor de número de copias de una región cuyos puntos están estadísticamente situados en el mismo umbral de valor de LogRatio. De este análisis se obtiene una tabla de datos de excel con un valor de CNV (del inglés, *copy number value*), a partir de cual, y junto con la visualización del programa *CGH Analytics*, se establece un punto de corte para ganancia ($>0,3$) y pérdida ($<-0,5$) de material genómico, y un gráfico para cada uno de los cromosomas de cada uno de los pacientes. Para considerar una región como alterada debía cumplir éstos criterios y además haber al menos 5 sondas consecutivas alteradas. Finalmente, se definió como región mínima común (RMC) alterada aquella región detectada en al menos dos pacientes.

Todas aquellas regiones alteradas que presentaran un solapamiento mínimo del 80% con un polimorfismo descrito fueron excluidas del estudio (<http://projects.tcag.ca/variation/>).

2.2 Análisis de la inestabilidad genética

Para la evaluación del estatus genómico, se realizó un estudio de inestabilidad genética. Este análisis se realizó una vez integrados los resultados obtenidos a partir de los softwares *CGH Analytics* e *InSilico arrayCGH*. Este análisis consiste en la cuantificación de las pérdidas y/o ganancias cromosómicas completas o parciales, de las amplificaciones génicas, las pérdidas homocigóticas así como las roturas cromosómicas de cada uno de los pacientes a partir de los resultados de arrayCGH y empleando como plantilla los gráficos obtenidos a partir del análisis del software *InSilico arrayCGH*. En la figura 17 se muestra un ejemplo de la cuantificación de las distintas alteraciones evaluadas en el análisis de inestabilidad.

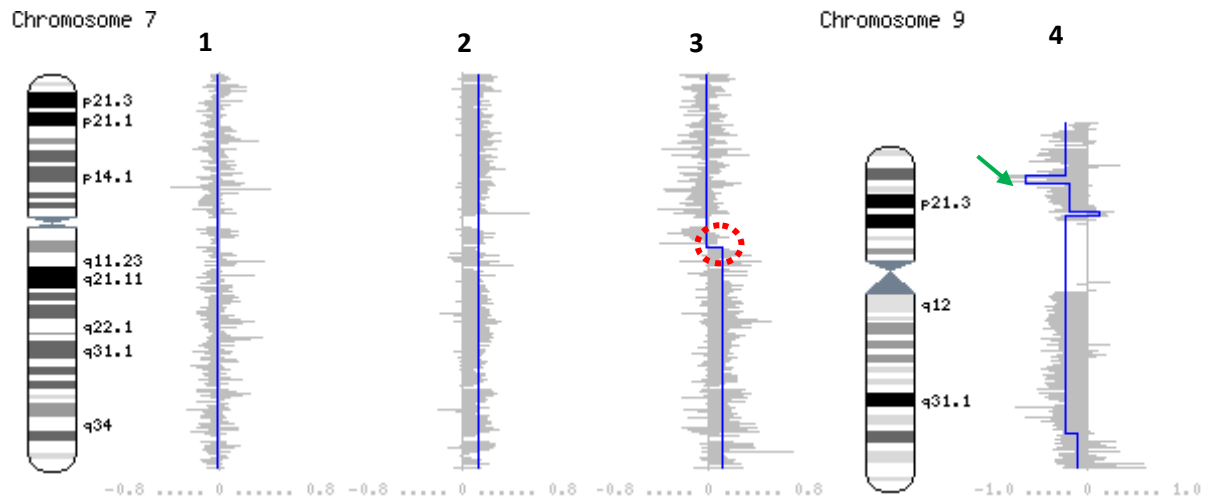




Figura 17. Ejemplo de la cuantificación de alteraciones para el análisis de inestabilidad genética en la MFt. (a) Idiograma y gráficos correspondientes a tres pacientes diferentes para el cromosoma 7. El paciente 1 presenta un cromosoma 7 normal, mientras que los pacientes 2 y 3 muestran una ganancia completa y parcial (7q) respectivamente. El  indica lo que se cuantifica como rotura cromosómica. (b) Idiograma y perfil del cromosoma 9 para el paciente 4. La () indica lo que se consideraría como delección homocigota de la región 9p21.3, uno de los parámetros que se cuantifican en el análisis de inestabilidad.

2.3 Hibridación *in situ* fluorescente

La técnica de hibridación *in situ* fluorescente (FISH, del inglés *fluorescence in situ hybridization*) se empleó para la confirmación de los resultados obtenidos a partir de la técnica de oligoarrayCGH y se realizó sobre tejido incluido en parafina.

Siempre que fue posible se utilizaron sondas comerciales (Abbott Molecular). En el caso de no disponer de sonda comercial, se procedió al diseño y elaboración de sondas no comerciales de BACs.

2.3.1 Elaboración de una sonda no comercial

El proceso para la elaboración de una sonda no comercial se resume a continuación:

- **Selección de BACs:** Para la elección del BAC existen numerosos navegadores del genoma (*o genome browsers*) que nos permiten visualizar la zona del genoma de interés y los clones existentes en dicha región. Los diferentes *genome browsers* que se pueden consultar se detallan en la tabla 5.

Tabla 5. *Genome browsers* más comúnmente utilizados para la búsqueda de BACs.

<i>Genome browser</i>	Institución	Uso
http://projects.tcag.ca/humandup/	Universidad de Toronto	Público
http://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgGateway	Universidad de San Francisco	Público
http://davinci.crg.es	Centro de regulación genómica (Barcelona)	Restringido

- **Cultivo:** El cultivo se realiza con medio Luria-Bertoni (LB) o bien medio 2xYT (del inglés, *Yeast Tryptone*) (más rico que el medio LB). Dicho cultivo se puede realizar o bien en agar sólido o bien en suspensión obteniendo un rendimiento similar.
- **Extracción del ADN:** Para el aislamiento del BAC/plásmido existen distintos kits comerciales que se basan en la separación del ADN cromosómico y plasmídico bajo unas condiciones de pH y salinidad concretas (lisis alcalina).
- **Marcaje del ADN:** El marcaje del ADN se puede realizar de manera directa (fluorocromos) o bien de manera indirecta (biotina y digoxigenina). El método más extendido actualmente es el marcaje directo del ADN mediante la reacción de *Nick*

Translation. En esta reacción se emplean dos enzimas una ADNasa y una ADN polimerasa I obtenida de la *E. coli*.

- **Comprobación de la localización del BAC:** Una vez marcado ADN, se verifica la correcta localización del BAC y se descarta un posible mosaicismo (cohibridación de la sonda en otras regiones del genoma) de la sonda diseñada mediante una FISH sobre extensiones normales.

Los detalles técnicos se resumen en la figura 18 y se describen a continuación.



Figura 18. Diagrama de las etapas a seguir para la elaboración de una sonda no comercial de BACs.

2.3.2 Selección y cultivo de BACs

Los BACs utilizados en este trabajo proceden de la biblioteca genómica *Human 32K BAC Re-Array* del *Children's Hospital Oakland Research Institute* (CHORI) ubicada en el Laboratorio de Citogenética Molecular del Hospital del Mar.

Reactivos

Extracto de levadura (Y) (Laboratorios Conda S.A., Barcelona, España)

Triptona (T) (Laboratorios Conda S.A.)

Cloruro sódico (Merck)

Cloranfenicol (Sigma)

Etanol absoluto (Merck)

Glicerol (Merck)

Plasmid MIDI Kit (Qiagen)

Soluciones

Medio de cultivo 2xYT: 16g de triptona + 10g de extracto de levadura + 5g de cloruro sódico (NaCl). Disolver en 1 l de agua destilada en agitación. Ajustar a pH 7. Autoclavar.
Cloranfenicol (20mg/ml): Disolver 100 mg en 5 ml de etanol absoluto. Preparar alícuotas de 500 µl. Conservar a -20°C. Añadir la alícuota de antibiótico en el medio autoclavado antes de su primer uso.

Nota: Para cada 500ml de medio 2xYT se añade una alícuota de 500 µl (20mg/ml). La concentración final de cloranfenicol en el medio 2xYT de 20µg/ml.

Procedimiento

Selección de los BACs

1. Para la identificación del BAC de interés se consultó el *genome browser*: davinci.crg.es.
2. Para ubicar la posición del BAC en la biblioteca genómica se consultó la página: <http://bacpac.chori.org/genomicRearrays.php>.

Cultivo

3. Rascar el pocillo donde esta ubicado el BAC de interés con una punta de pipeta estéril.
4. Introducir la punta de pipeta en un falcon de 15 ml que contenga 3 ml de medio 2xYT.
5. Incubar en agitación (300 rpm) durante 15-17 horas a 37°C.

Subcultivo y criopreservación

6. Realizar un subcultivo del BAC en erlenmeyer de 250 ml siguiendo la siguiente proporción:
 - 500 µl del cultivo
 - 50 ml de 2xYTIncubar en agitación (300 rpm) durante 15-17 horas a 37°C.
7. Criopreservar en glicerol parte del cultivo. En un criotubo de 2 ml añadir:
 - 300 µl glicerol 87%
 - 1700 µl del cultivo

Mezclar mediante vórtex y conservar a -80°C.

2.3.3 Aislamiento del plásmido y precipitación del ADN

El aislamiento del plásmido y del ADN se realizó con el kit comercial *Plasmid MIDI Kit* (Qiagen). Este kit contiene unas columnas de resina de intercambio iónico que permiten la unión del ADN del plásmido bajo unas condiciones de baja salinidad y pH adecuado. Se basa en el fenómeno de la lisis alcalina, un método para la separación del ADN plasmídico y del ADN bacteriano que se fundamenta en las distintas propiedades de desnaturalización y renaturalización de dichas moléculas.

Reactivos

Plasmid MIDI Kit (Qiagen) incluye:

- *Columnas Qiagen*
- *Tampón P1 (Tris-EDTA)*
- RNase
- *Tampón P2 (200 Mm NaOH, 1% SDS)*
- *Tampón P3 (Acetato potásico 3 mM, pH 5,5)*
- *Tampón QBT*
- *Tampón QC*
- *Tampón QF*

Isopropanol (Merck)

Etanol 70% (Merck)

Procedimiento

1. Pasar el volumen del erlenmeyer a un falcon de 50 ml.
2. Centrifugar a 4.000 rpm durante 15 min.
3. Decantar el sobrenadante.
4. Deshacer el pellet cuidadosamente con 3 ml de tampón P1.
5. Añadir 3 ml de tampón P2. Mezclar por inversión unas 5-10 veces. Incubar a temperatura ambiente durante 5 min.
6. Añadir 3 ml de tampón P3. Mezclar por inversión unas 5-10 veces. Incubar en hielo durante 10 min.
7. Centrifugar a 4.000 rpm durante 45 min a 4°C.
8. Equilibrar las columnas con 3 ml de tampón QBT.
9. Recoger el sobrenadante y pasarlo a la columna.
10. Dejar pasar todo el volumen y seguidamente hacer un lavado con 5 ml de tampón QC.
11. Colocar la columna en un falcon de 15 ml nuevo y eluir con 2 ml de tampón QF precalentado a 65°C.

Precipitación del ADN

12. Preparar 2 tubos estériles de 2 ml en los que añadimos:

- 1 ml de ADN
 - 700 µl de isopropanol
13. Mezclar por inversión e incubar de 1-2h a -80°C.
 14. Centrifugar a 13.000 rpm durante 45 min.
 15. Decantar y lavar con 100 µl de etanol al 70% frío.
 16. Centrifugar a 10.000 rpm durante 10 min.
 17. Decantar y dejar secar el pellet en la estufa a 37°C.
 18. Resuspender con 25 µl de agua destilada cada pellet y juntar los dos volúmenes en un mismo tubo estéril de 1,5 ml.

2.3.4 Marcaje de ADN

Para el marcaje del ADN se utilizó el *kit* comercial *Nick Translation kit* (Abbott Molecular) siguiendo las instrucciones del fabricante con mínimas modificaciones. La enzima que presenta este *kit* tiene actividad ADNasa (provoca roturas del ADN de cadena sencilla en presencia de Mg) y polimerasa (con doble actividad, exonucleasa y polimerasa) que incorpora los fluoroforos unidos a uracilo (*Spectrum Green d-UTP* o *Spectrum Red d-UTP*) (AbbottMolecular) en presencia de nucleotidos en exceso.

Reactivos

Nick Translation Kit (Abbott Molecular):

- *Nick translation enzyme* (DNA polymerase I, DNase I en glycerol 50%, 20 nM Tris-HCL, pH 7,2, 10 mM MgSO₄, 0,1 mM DDT, 0,5 mg/ml nuclease-free BSA)
- *10x nick translation buffer* (500 mM Tris-HCl, pH7,2, 100 mM MgSO₄, 1 mM DDT)
- dTTP (0,3 mM dTTP)
- dCTP (0,3 mM dCTP)
- dATP (0,3 mM dATP)
- dGTP (0,3 mM dGTP)
- *Nuclease-free water*

Spectrum Green-dUTP (50 nmol) (Abbott Molecular)

Spectrum Red-dUTP (50 nmol) (Abbott Molecular)

Acetato sódico trihidratado (Merck)

Acido acético glacial (100%) (Merck)

Human Cot-1 DNA 1 µg/µl (Roche)

Soluciones

0,1 mM dNTP mix: 10 µl de 0,3mM dATP + 10 µl de 0,3mM dCTP + 10 µl de 0,3mM dGTP.

0,1 mM dTTP mix: 10 µl de 0,3mM dTTP + 20 µl de agua *nuclease-free*.

0,5 mM *Spectrum Red*-dUTP (solución madre): Resuspender con 100 µl de agua *nuclease-free* el vial liofilizado *Spectrum Red*-dUTP.

1 mM *Spectrum Green*-dUTP (solución madre): Resuspender con 50 µl de agua *nuclease-free* el vial de *Spectrum Green*-dUTP liofilizado.

0,1 mM *Spectrum Red*-dUTP (solución de trabajo): 10 µl de 0,5 mM *Spectrum Red*-dUTP + 40 µl de agua *nucleasa-free*.

0,2 mM *Spectrum Green*-dUTP (solución de trabajo): 10 µl de 1 mM *Spectrum Red*-dUTP + 40 µl de agua *nuclease-free*.

Acetato sódico 3M (100 ml): Disolver 40,8 gr de acetato sódico trihidratado en 100 ml de agua destilada. Ajustar el pH a 5,2 con ácido acético glacial.

Procedimiento

1. Se parte de 1000 ng de ADN diluido en un volumen de 17,5 µl de agua *nuclease-free*.
2. Añadir a cada BAC los siguientes reactivos:
 - 10 µl de 0,1 mM dNTP
 - 5 µl de 10x *nick translation buffer*
 - 5 µl de 0,1 mM dTTP
 - 2,5 µl de 0,2 mM *Spectrum Green*-dUTP o 0,1 mM *Spectrum Red*-dUTP
 - 5 µl de *nick translation enzyme*Incubar en baño a 15-17°C durante 3 horas.
3. Parar la reacción incubando a 70°C durante 10 min.

Precipitación ADN

4. Para precipitar el ADN se añaden los siguientes reactivos siguiendo el orden:

- 10 µl de *Human Cot-1 DNA*
- 10 µl de acetato sódico 3M (pH 5,2)
- 250 µl de etanol absoluto (frío)

Incubar la mezcla a -80°C durante 1-2 h o a -20 °C durante toda la noche.

5. Centrifugar a 13.000 rpm durante 30 min.
6. Decantar el sobrenadante.
7. Añadir 250 µl de etanol 70% (frío).
8. Centrifugar a 10.000 rpm durante 10 min.
9. Decantar sobrenadante y dejar secar el pellet en estufa a 37°C.
10. Resuspender el pellet con 11 µl de agua precalentada a 70°C.
11. Conservar a -20°C hasta su uso.

2.3.5 Comprobación localización: Hibridación *in situ* fluorescente sobre metafases

Para verificar la correcta localización del BAC, se realizó una FISH en una extensión de metafases normales de muestras procedentes del Laboratorio de Citogenética del Hospital del Mar. El proceso de desnaturalización de las muestras se realizan con formamida para mantener la estructura de los cromosomas lo más conservada posible.

Reactivos

Formamida (Merck)

Etanol (Merck)

Hybridization buffer (Abbott Molecular)

20xSSC

Igepal (NP40) (Sigma)

Soluciones

20xSSC: 88,23g/l de Citrato Trisódico (C₆H₅Na₃O₇) + 175,32 g/l Cloruro Sódico (NaCl) + 1000 ml de agua destilada. Ajustar a pH 6,2-6,3. Conservar a temperatura ambiente.

Formamida 70%: 70 ml formamida + 10 ml de 20xSSC + 20 ml de agua destilada + 3 gotas de HCl puro. Conservar a 4°C un máximo de 2 semanas.

Formamida 50%: 125 ml de Formamida + 100 ml de agua destilada + 25 ml de 20xSSC + 6 gotas de HCl puro. Conservar a 4°C un máximo de 2 semanas.

2xSSC/0,1% NP40: 499,5 ml de 2xSSC + 0,5 ml de NP40. Conservar a 4°C.

Procedimiento

Obtención de la muestra

1. Hacer extensiones del material fijado.
2. Dejar a temperatura ambiente overnight. Si no fuera posible, dejar un mínimo de 2-3 horas

Desnaturalización y deshidratación de las metafases

3. Antes de comenzar precalentar los coplins de formamida 70% en un baño a 75°C.
4. Incubar los portaobjetos durante 5 minutos.
5. Incubar durante 1 min en una serie creciente de etanoles fríos:
 - Etanol 70%
 - Etanol 80%
 - Etanol 100%

Dejar secar el portaobjetos hasta que no queden gotas de etanol.

Desnaturalización de la sonda

6. Preparar la mezcla de hibridación siguiendo las siguientes proporciones:
 - 4,5 µl de *hybridization buffer*
 - 0,5 µl de BAC marcado
7. Incubar en un baño a 75°C durante 5 min.

Hibridación

8. Colocar los 5 μ l de la mezcla de hibridación sobre el portaobjetos donde está la muestra problema (extensión de metafases control).
9. Tapar con un cubreobjetos limpio de 20x20 mm y sellar con parafilm.
10. Colocar los portaobjetos en una cámara húmeda e incubar a 37°C durante toda la noche

Lavados de posthibridación (con Formamida)

11. Retirar el parafilm y colocar los portabobjetos en el primer baño de Formamida 50% a 45°C.
12. Realizar un total de 3 lavados en solución de formamida 50% a 45°C durante 10 min.
13. Realizar 1 lavado en solución de 2xSSC a 45°C durante 10 min.
14. Realizar 1 lavado en solución de 2xSSC/0.1% NP40 a 45°C durante 5 min.
15. Dejar secar los portas en la oscuridad.

Contratinción

16. Colocar 7 μ l de DAPI II en el área hibridada y cubrir con un cubre de 24x24mm.
17. Mantener las preparaciones a -20°C en una caja oscura hasta su observación al microscopio de fluorescencia.

2.4 Hibridación *in situ* fluorescente sobre núcleos interfásicos en suspensión

El protocolo realizado para la realización de la FISH sobre núcleos en interfase se realizó con la placa calefactora *HYbrite* (Abbott Molecular). Los reactivos y soluciones empleadas son las mismas que para el protocolo del apartado 2.3.5.

Procedimiento

Obtención de la muestra

1. Hacer extensiones del material fijado.

2. Dejar a temperatura ambiente overnight. Si no fuera posible, dejar un mínimo de 2-3 horas

Preparación de la sonda y de la muestra para colocarlas en la placa

3. Si la sonda no viene preparada para la hibridación directa mezclar en un eppendorf a temperatura ambiente:
 - 3,5 μ l de tampón de hibridación
 - 0,5 μ l de sonda
 - 1 μ l de agua destilada dentro de un eppendorf estéril
4. Hacer un spin de la mezcla.
5. Colocar los 5 μ l de la mezcla de la sonda sobre el portaobjetos.
6. Tapar con un cubreobjetos limpio de 20x20 mm y sellar con parafilm.

Desnaturalización-Hibridación

7. Encender el hibridador.
8. Seleccionar el programa que se quiera utilizar. Utilizaremos las siguientes temperaturas:
 - Melting: 75°C, 1'.
 - Hybridization: 37°C, 30 h.
9. Colocar en las ranuras de los lados del hibridador papel húmedo para mantener la humedad durante el proceso de hibridación.
10. Colocar el portaobjetos en la superficie (vigilar que los portaobjetos queden bien colocados y toquen en toda su superficie la placa).
11. Cerrar la tapa y poner en marcha el programa.
12. Esperar a que el proceso de desnaturalización y posterior hibridación tenga lugar (desde cuatro horas a toda la noche).

Lavados de posthibridación

13. Retirar el parafilm y colocar los portabobjetos en el primer baño de Formamida 50% a 45°C.
14. Realizar un total de 3 lavados en solución de formamida 50% a 45°C durante 10 min.

15. Realizar 1 lavado en solución de 2xSSC a 45°C durante 10 min.
16. Realizar 1 lavado en solución de 2xSSC/0.1% NP40 a 45°C durante 5 min.
17. Dejar secar los portas en la oscuridad.

Contratinción

18. Colocar 7 µl de DAPI II en el área hibridada y cubrir con un cubre de 24x24mm.
19. Mantener las preparaciones a -20°C en una caja oscura hasta su observación al microscopio de fluorescencia.

2.5 Hibridación in situ fluorescente sobre tejido incluido en parafina

Reactivos

- Xilol (Prolabo)
- Etanol (Merck)
- EDTA 100x (Biosystems)
- Citrato trisódico (C₆H₅Na₃O₇) (Merck)
- Cloruro sódico (NaCl) (Merck)
- HCl 35% (Prolabo)
- Pepsina (Sigma)
- MgCl₂ (Merck)
- PBS 10x (Roche)
- Tampón de hibridación (Abbott Molecular)
- Formamida (Merck)
- DAPI II (Abbott Molecular)

Soluciones

EDTA 1X: 1 ml de EDTA 100X + 100 ml de agua destilada. Conservar a 4°C.

20xSSC: 88,23 g de Citrato Trisódico (C₆H₅Na₃O₇) + 175,32 g Cloruro Sódico (NaCl) + 1000 ml de agua destilada. Ajustar a pH 6,2-6,3. Conservar a temperatura ambiente.

Solución de pepsina en HCl 0,1mM: 10 ml H₂O + 100 µl HCl 37% + 5 µl pepsina (100 mg/ml). Descartar una vez usado.

MgCl₂: 20,33 g de MgCl₂ + 100 ml agua destilada.

Solución Stop: 50 ml PBS 1x + 2,5 ml Mg₂Cl 1M. Descartar una vez usado.

Procedimiento

Preparación del corte

1. Cortar el bloque de estudio en secciones de 2-4µm y montarlos sobre un portaobjetos silanizado cargado positivamente para que se adhiera la muestra al cristal.
2. Colocar los portaobjetos de media hora (mínimo) a toda la noche (máximo) en estufa a 65°C para deshacer la parafina.

Desparafinar e hidratar los portas

3. Para eliminar los restos de parafina realizar 3 lavados con xilol durante 10 min.
4. Para hidratar el tejido realizar 5 lavados en una serie decreciente de etanoles:
 - Etanol 100% 5 min (2 veces)
 - Etanol 80% 5 min
 - Etanol 70% 5 min
 - Agua destilada 5 min
5. Conservar los portaobjetos en agua destilada hasta realizar el pretratamiento (si no se va a realizar inmediatamente conservar en nevera a 4°C).

Pretratamiento EDTA-Microondas

6. Colocar los portaobjetos en un recipiente con tampón EDTA 1x e incubar durante 3 tandas de 7 – 5 – 7 min en microondas a máxima potencia.
7. Evitar que la solución EDTA 1x hierva para no deteriorar las muestras. En ese caso, parar el microondas y dejar enfriar. Continuar con los minutos restantes de incubación cuando la solución se haya enfriado.

NOTA: El tiempo de EDTA se ha de ajustar al microondas utilizado.

Digestión del tejido

8. Precalentar la cámara húmeda a 37°C y preparar la solución de pepsina y la solución *STOP*.
9. Colocar 40 µl de la solución de pepsina sobre cada corte. Cubrir los cortes e incubar 30 min en cámara húmeda a 37°C.

NOTA: El tiempo se puede alargar hasta 45 minutos si no se consigue una buena digestión.

10. Parar la reacción introduciendo los portaobjetos en la solución *STOP* durante 5 min.
11. Realizar un lavado de los portaobjetos en agua destilada. Secar los portaobjetos.

Hibridación

12. Preparar la sonda siguiendo la siguiente proporción: 3,5 µl de tampón de hibridación, 0,5 µl de sonda y 1 µl de agua destilada dentro de un eppendorf estéril.

NOTA: En el caso de utilizar sondas no comerciales, se añadirán 4,5 µl de tampón de hibridación y 0,5 µl de sonda.

13. Centrifugar la mezcla de 1 a 3 seg.
14. Colocar los 5 µl de la mezcla de la reacción de hibridación sobre el portaobjetos.
15. Tapar con un cubreobjetos de 20x20 mm y sellar con parafilm.

Desnaturalización-Hibridación

16. Encender la placa de hibridación *HYbrite* (Abbott Molecular).
17. Seleccionar el programa a utilizar:
 - *Melting*: 80°C, 5 min.
 - *Hybridization*: 37°C, 30 h.
18. Colocar en las ranuras de los lados un papel de filtro húmedo para mantener la humedad en la placa durante la hibridación.
19. Colocar los portaobjetos sobre la placa.
20. Esperar que el proceso de desnaturalización y posterior hibridación tenga lugar (desde 4 horas a toda la noche).

Lavados de posthibridación (con formamida)

21. Retirar el pegamento (o parafilm) de sellado de los cubres uno a uno y colocarlos en el primer baño de formamida 50%.
22. Realizar 3 lavados en solución de formamida 50% a 45° durante 10 min.
23. Realizar 1 lavado en solución de 2xSSC a 45°C durante 10 min.
24. Realizar 1 lavado en solución de 2xSSC/0.1% NP40 a 45°C durante 5 min.

Contratinción

25. Colocar 7 µl de DAPI II en el área hibridada y cubrir con un cubreobjetos de 24x24mm.
26. Mantener las preparaciones a –20°C en una caja oscura durante un mínimo de 20-30 minutos antes de su observación al microscopio de fluorescencia.

2.6 Análisis estadístico

La asociación entre los datos genéticos y clínicos se realizó con los test de *U Mann-Whitney*, *t* de *Student* o Chi cuadrado dependiendo de la naturaleza de los datos.

Para analizar si la inestabilidad genética se asociaba a un patrón característico de alteraciones genéticas se empleó un test de comparaciones múltiples *Pomelo Cluster* (<http://pomelo.bioinfo.cnio.es>) con el cual se procedió a comparar el estatus genómico de las MfT con todas las alteraciones recurrentes halladas en el análisis por oligoarrayCGH. Para el análisis de supervivencia se empleó el método de Kaplan-Meier y el test de log Rank para el análisis univariado mientras que para el multivariado se utilizó la Regresión de Cox. El valor de $p \leq 0,05$ fue considerado estadísticamente significativo. Los análisis mencionados se realizaron con los paquetes estadísticos SPSS v.15 (SPSS Inc, Chicago, IL, EEUU). Tanto las comparaciones realizadas como los datos de supervivencia se detallan en cada uno de los apartados de resultados (pag. 80).

Resultados

TRABAJO 1: Caracterización genómica y definición de marcadores pronóstico en la micosis fungoide tumoral

1. INTRODUCCIÓN

La caracterización genética de la micosis fungoide (MF) se ha realizado principalmente mediante la técnica de CGH (Karenko *et al.* 1999; Fischer *et al.* 2004; Prochazkova *et al.* 2007) y ha permitido la descripción de marcadores pronósticos de esta enfermedad. Sin embargo, el bajo número de pacientes incluidos y la alta heterogeneidad de las series en las que se incluían y analizaban pacientes diagnosticados de distintos LCPCT (MF, SS, LCACG-CD30+ y PL) y en distintos estadios, no han permitido obtener resultados concluyentes.

A diferencia de otros síndromes linfoproliferativos, los estudios mediante arrayCGH de LCPCT, y más concretamente de MF, son muy escasos (Mao *et al.* 2003a; Carbone *et al.* 2008; van Doorn *et al.* 2009). El objetivo principal de este estudio fue analizar una serie homogénea de MF tumoral (MFt) para asegurar la presencia de población tumoral con una plataforma comercial de microarrays de oligonucleótidos que contiene 44.000 sondas que cubren todo el genoma con una resolución de 75 kb.

2. MATERIAL Y MÉTODOS

2.1 Descripción de pacientes y muestras

Se incluyeron 41 pacientes diagnosticados de MFt y recogidos de siete centros europeos participantes en el *EORTC Cutaneous Lymphoma Group* (España: Hospital del Mar, Hospital Universitari de Bellvitge, Hospital Clínic, Hospital de Sant Pau, Hospital 12 de Octubre; Holanda: *Leiden University Medical Center*; Suiza: *University Hospital*

Zürich). Los pacientes procedentes del grupo holandés habían sido estudiados previamente mediante la técnica de BACarrayCGH (van Doorn *et al.* 2009). Todos los pacientes se diagnosticaron siguiendo los criterios de la clasificación OMS/EORTC (Willemze *et al.* 2005). Los datos clínicos y de seguimiento se encuentran resumidos en la tabla 6.

Las muestras que se incluyeron en el experimento de oligoarrayCGH fueron muestras de ADN procedente de tejido congelado incluido en OCT. Por otra parte, para la validación de los resultados obtenidos, las muestras de estudio fueron cortes histológicos de biopsias cutáneas incluidas en parafina procedentes de los mismos pacientes estudiados por oligoarrayCGH.

Tabla 6. Características clínicas de los 41 pacientes afectos de MFt analizados mediante oligoarrayCGH

Características	Nº de pacientes
Nº total de pacientes	41
Edad (rango)	63 (17-48)
Sexo	
Hombre	22
Mujer	19
Lesiones	
Única	1
Localizada	16
Multifocal	24
Terapia inicial	
Tratamiento tópicos	24
Inmunomoduladores	5
Poliquimioterapia	1
Combinación diferentes tto	10
No disponible	1
Respuesta inicial	
Remisión completa	10
Remisión parcial	16
Enfermedad progresiva	7
No disponible	8
Recaída	
Cutánea	13
Sistémica	3
Seguimiento (meses)	
Mediana (rango)	43 (5-216)
Último seguimiento	
No evidencia de enfermedad	3
Vivo con lesiones	16
Exitus por linfoma	22

***Lesiones:** Única, presencia de una sola lesión; Localizada, múltiples lesiones limitadas a una región corporal o dos contiguas; Multifocal, múltiples lesiones en dos regiones corporales no contiguas

2.2 Métodos

En el presente trabajo se han utilizado las plataformas de oligonucleótidos (oligoarrayCGH) *Human Genome CGH 44K microarrays* y *Human Genome CGH 4x44K microarrays* (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, EEUU). Los detalles técnicos y el análisis de los resultados se especifican en el apartado Material y Métodos (pag. 47).

Para la validación de los resultados obtenidos a partir del análisis de arrayCGH se aplicaron las sondas comerciales *LSI CDKN2A SpectrumOrange/CEP 9 SpectrumGreen* (AbbottMolecular), *LSI TP53 (17p13)/CEP 17* (AbbottMolecular), *IGH/MYC/CEP 8 Tri-Color Dual Fusion FISH probe* (AbbottMolecular) y la sonda de BAC, RP11-757A18 para la región 10p14 (*GATA3*).

Respecto al análisis de supervivencia, se definió la supervivencia global (SG) como el tiempo transcurrido desde la fecha del diagnóstico de la MF a la fecha de exitus o último seguimiento. Para determinar la asociación entre las variables genómicas y las variables clínicas y biológicas con la supervivencia global se empleó el método de Kaplan-Meier para estimar la distribución de la supervivencia global, y las diferencias entre los dos grupos se analizaron con el test del Log-Rank. El análisis multivariado de las variables que resultaron ser significativas en el análisis univariado se realizó con el modelo de regresión de Cox. Para la comparación entre dos grupos se emplearon los tests de U Mann-Whitney o χ^2 de Pearson. Todos los valores estadísticos fueron considerados estadísticamente significativos con una $p \leq 0,05$, y fueron realizados con el paquete estadístico SPSS 15.0.

3. RESULTADOS

3.1 Descripción de las alteraciones genéticas detectadas por arrayCGH

La técnica de arrayCGH ha detectado que en 32 de los 41 pacientes analizados (78%) se observaron alteraciones genéticas mientras que nueve casos (22%) fueron considerados normales. Se detectaron un total de 373 regiones genómicas afectadas y las pérdidas genómicas (n=236) fueron más frecuentes que las ganancias (n=137) (63,3% vs. 36,7%). La media de alteraciones observadas por paciente fueron 3,3 ganancias (rango, 0-14) y 5,7 pérdidas (rango, 0-30). En la figura 19 se representan todas las ganancias y pérdidas detectadas mediante la técnica de arrayCGH.

Respecto a las regiones mínimas comúnmente alteradas (RMC), se hallaron un total de 306 RMCs, de las cuales 103 correspondieron a regiones ganadas y 203 correspondían a regiones perdidas. Las alteraciones más frecuentemente detectadas en orden decreciente fueron las ganancias de las regiones 7q33.3q35, 17q21.1, 8q24.21, 9q34qter y 10p14 mientras que las pérdidas más comunes se hallaron en las regiones 9p21.3, 9q31.2, 17p13.1, 13q14.11, 6q21.3, 10p11.22, 16q23.2 y 16q24.3. Los detalles de las regiones, la frecuencia de detección y los genes relacionados con cáncer localizados en ellas se resumen en la tabla 7.

Tabla 7. Resumen de las alteraciones más frecuentemente detectadas en las MfT y posibles genes candidatos.

Tipo de alteración	Gen o clon inicial	Región	Tamaño (Mb)	% pacientes	Genes candidatos
Ganancias	BG495318	7q33.3q35	14,2	55	<i>PTN, HIPK2, BRAF, TRPV6, TRPV5, PIP, EPHA1, EZH2</i>
	SMARCE1	17q21.1	4,7	37	<i>STAT5A, STAT5B, STAT3</i>
	M13930	8q24.21	0,75	32	<i>MYC</i>
	SLC2A8	9q34	11	17	<i>NOTCH1, TRAF2, CARD9</i>
	chr10: 004083817	10p14	8,9	17	<i>GATA3, IL2R</i>
	chr1: 195487682	1q31.2q32.2	7,7	15	<i>KIF14</i>
Pérdidas	MTAP	9p21.3	0,2	42	<i>MTAP, CDKN2A, CDKN2B</i>
	SLC35D2	9q31.2	3,9	30	<i>CDC14B, XPA, NR4A3</i>
	DULLARD	17p13.1	1,02	27,5	<i>TP53, TNK1</i>
	chr13: 047357604	13q14.11	2,22	20	<i>RB</i>
	CDC2L6	6q21.3	1,2	17	No genes candidatos
	chr10: 031132968	10p11.22	1,5	17	<i>TCF8</i>
	BQ189302	16q23.2	6,7	17	<i>CDH13</i>
	ZNF469	16q24.3	0,78	17	No genes candidatos



Figura 19. Perfil genómico de los 41 pacientes con MFT. Las líneas verdes situadas a la izquierda de los cromosomas representan las regiones pérdidas mientras que la líneas rojas situadas a la izquierda representa las ganancias de material genómico.

Entre las alteraciones detectadas mediante arrayCGH destaca la presencia de cinco deleciones homocigotas: 5q15q22 (n=1), 5q22 (n=1), 9p21.3 (n=6), 10q13.31 (n=1) y 11p12.3p12.2 (n=1), y cinco regiones amplificadas: 1p36.23p36.22 (n=1), 5q23.1q31.2 (n=1), 8p11.23p11.21 (n=1), 8q24.21 (n=2), y 10p15.2p14 (n=1). Las características de estas regiones y los posibles genes candidatos presentes en las mismas se detallan en la tabla 8.

Tabla 8. Deleciones homocigotas y amplificaciones detectadas en MfT mediante la técnica de oligoarrayCGH.

Tipo de alteración	Gen o clon inicial	Región	Tamaño (Mb)	Nº de pacientes	Genes candidatos
Deleciones homocigotas	chr5:091122155	5q15q22.1	20,6	1	<i>EFNA5</i>
	chr5:114420427	5q22	1,2	1	No genes candidatos
	MTAP	9p21.3	0,2	6	<i>MTAP, CDKN2A, CDKN2B</i>
	LIPF	10q13.31	0,5	1	<i>LIPF, LIPL3, FAS, CH25H</i>
	FLJ14213	11p12.3p12.2	3,4	1	<i>TRAF6, RAG1, RAG2</i>
Amplificación	GPR157	1p36.23p36.22	4	1	<i>PIK3CD, MAD2L2, TNFRSF8</i>
	RAPGEF6	5q23.1q31.2	9	1	<i>CSF2, IL5, RAD50, IL13, IL4, CXCL14, IL9, LECT2, TGFBI, SMAD5, NME5, CDC25C, PACAP, NRG2</i>
	KCNU1	8p11.23p11.21	3,1	1	<i>ZNF703, SPFH2, BRF2, RAB11FIP1, TACC1, ADAM9</i>
	chr8:122932538	8q24.21	0,1	2	<i>MYC</i>
	chr10:004083817	10p15.2p14	4,7	1	<i>GATA3, IL2R</i>

Para la validación de los resultados obtenidos por arrayCGH se realizó la técnica de FISH sobre tejido parafinado de las regiones 9p21.3, 8q24.21, 17p13 y 10p14 en tres pacientes diferentes (Figura 20).

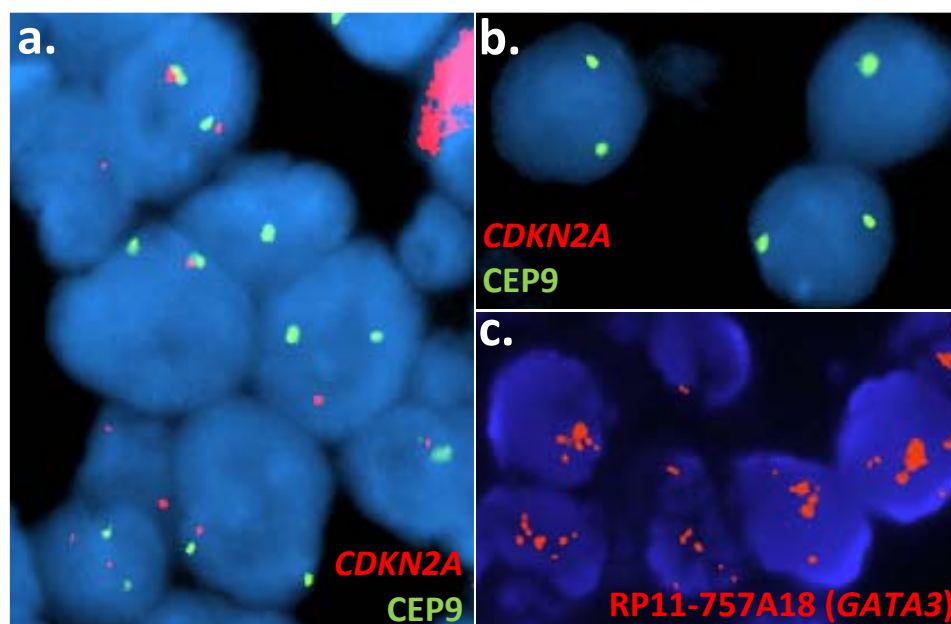


Figura 20. Validación de los resultados obtenidos mediante oligoarrayCGH en tres pacientes afectados de MFt. (a) Deleción heterocigota de la región 9p21 (*CDKN2A*), (b) deleción homocigota de la región 9p21 (*CDKN2A*) y (c) amplificación de la región 10p14 (*GATA3*).

3.2 Análisis de inestabilidad genética

El análisis de inestabilidad genética permitió segregar a los pacientes en dos grupos, un grupo denominado genéticamente estable y otro grupo genéticamente inestable. El primer grupo incluía 18 pacientes que se caracterizaron por la presencia de pocos cambios genéticos (0-5), un número bajo de roturas cromosómicas (0(0;3)) y la ausencia de pérdidas homocigotas y/o amplificaciones. El segundo grupo constaba de 23 pacientes que presentaban numerosos cambios genéticos (6-34), roturas cromosómicas (14(10;21)) y la presencia de amplificaciones y deleciones homocigotas. La información detallada de cada uno de los pacientes y las variables analizadas se representan en la figura 21 y se resume en la tabla 9.

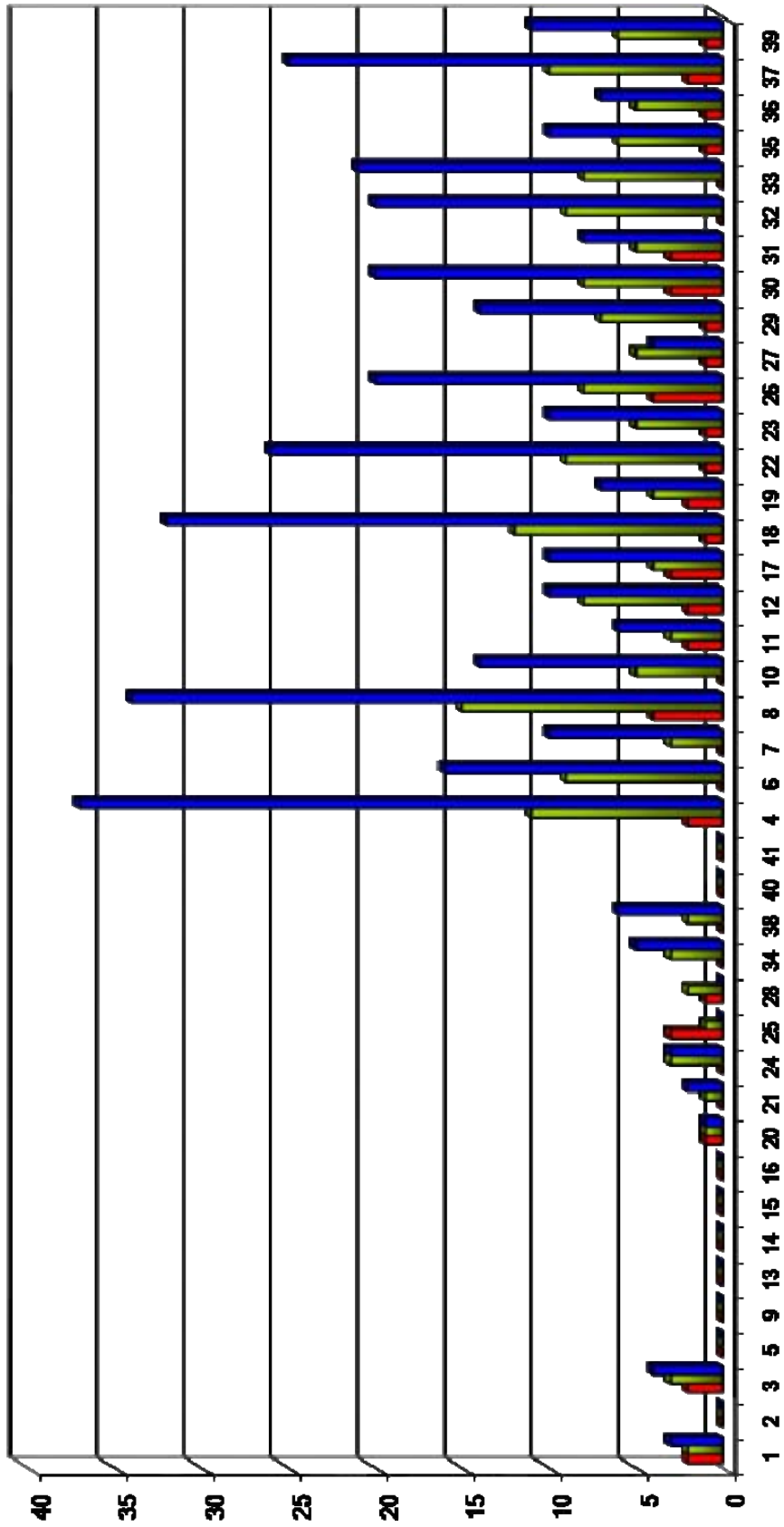


Figura 21. Análisis de inestabilidad de genética. Los parámetros representados en esta figura son: (■) número de cromosomas completos ganados y/o perdidos, (■) número de cromosomas con alteraciones estructurales y (■) número de roturas cromosómicas.

Parámetros analizados	MFt																																									Subgrupos genómicos Test de U-Mann Whitney					
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	ST	IST	P			
Subgrupo genómico	ST	ST	ST	IST	ST	IST	IST	IST	ST	IST	IST	IST	ST	ST	ST	ST	IST	IST	IST	ST	ST	IST	IST	ST	ST	IST	IST	ST	IST	IST	IST	IST	IST	IST	ST	IST	IST	ST	ST	ST	ST	ST	18	23	-		
Roturas de ADN	3	0	4	37	0	16	10	34	0	14	6	10	0	0	0	0	10	32	7	1	2	26	10	3	0	20	4	0	14	20	8	20	21	5	10	7	25	6	11	0	0	0(0;3)	14(10;21)	<.0001			
Nº de regiones GANADAS (>5 sondas)	3	0	1	8	0	7	4	14	0	0	1	7	0	0	0	0	9	5	3	2	0	7	5	1	2	9	4	1	3	9	4	4	3	1	1	4	7	2	5	0	0	0(0;1.25)	5(3;7)	<.0001			
Nº de regiones PERDIDAS (>5 sondas)	1	0	4	17	0	10	1	31	0	7	4	7	0	0	0	0	7	15	5	1	1	19	5	3	3	9	4	3	7	14	7	11	13	2	7	2	10	1	6	0	0	0.5(0;2.25)	7(5;13)	<.0001			
Nº de cr. con amplificaciones	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0(0;0)	0(0;0)	ns		
Propenso a amplificar	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	YES	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	0(0;0)	0(0;0)	ns*
Nº de cr. con deleciones homocigotas	0	0	0	1	0	1	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0(0;0)	0(0;1)	0.003		
Nº de cr. SIN eventos	18	22	17	9	22	13	19	3	22	17	4	12	22	22	22	22	15	9	16	20	21	12	16	19	18	11	16	19	14	10	14	13	14	19	15	16	10	20	15	22	22	21.5(19;22)	14(10;16)	<.0001			
Nº de cr. con alteraciones estructurales	2	0	3	11	0	9	3	15	0	5	3	8	0	0	0	0	4	12	4	1	1	9	5	3	1	8	5	2	7	8	5	9	8	3	6	5	10	2	6	0	0	0.5(0;2)	7(5;9)	<.0001			
Nº de alteraciones de cr. completos	2	0	2	2	0	0	0	4	0	0	2	2	0	0	0	0	3	1	2	1	0	1	1	0	3	4	1	1	1	3	3	0	0	0	1	1	2	0	1	0	0	0(0;1)	1(1;2)	0.003			
Nº de cr. con >1 transición por brazo	1	0	1	8	0	4	3	7	0	5	3	3	0	0	0	0	3	11	3	0	1	7	3	1	0	6	1	0	5	5	4	6	8	2	4	2	7	2	4	0	0	0(0;1)	4(3;7)	<.0001			
Nº de cr. con ≤1 transición por brazo	21	22	21	14	22	18	19	15	22	17	19	19	22	22	22	22	19	11	0	1	0	15	2	21	4	16	21	22	17	17	18	16	14	20	18	20	15	20	18	22	22	22(20;22)	17(15;19)	<.0001			

Tabla 9. Parametros analizados para el análisis de inestabilidad genética de 41 pacientes con MFt.

* Para la comparación de dos variables cualitativas se empleó el test de

Por otra parte, el análisis de comparaciones múltiples en el que se analizó la asociación del perfil de inestabilidad con alteraciones genéticas detectadas mediante arrayCGH reveló que las alteraciones que afectaban al cromosoma 7q se observaban más frecuentemente en los pacientes que mostraron un perfil genético inestable (Figura 22).

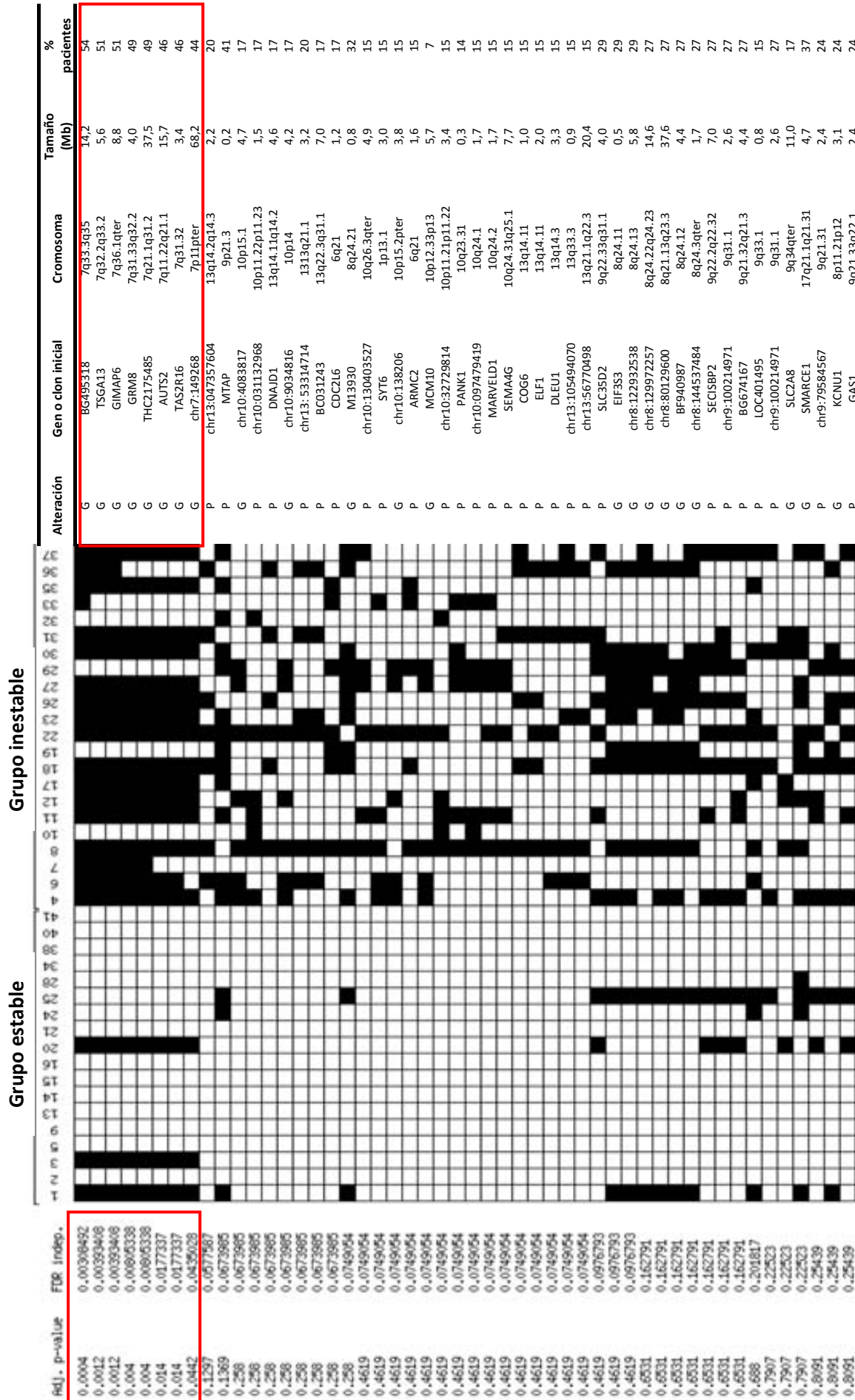


Figura 22. Resultados del análisis de comparaciones múltiples entre el estatus genómico de la MFT y las alteraciones detectadas mediante oligoarrayCGH. En rojo se indican las regiones que corresponden al brazo largo del cromosoma 7 (7q) que se asocian significativamente al perfil inestable de las MFT.

3.3 Análisis de la supervivencia

3.3.1 Asociación entre las alteraciones cromosómicas y el estatus genético con la supervivencia de los pacientes con MfT

Se analizó el valor pronóstico del estatus genético (grupo estable vs. grupo inestable) y de las alteraciones cromosómicas que presentaban una recurrencia mayor de un 15%. En el análisis univariado, el grupo genéticamente inestable mostró un peor pronóstico con una mediana de supervivencia de 43 meses a diferencia del grupo estable cuya supervivencia global fue de 88 meses ($p=0,05$). Por otra parte, teniendo en cuenta las regiones mínimas comúnmente alteradas, de todas las alteraciones analizadas tres de ellas se asociaron significativamente a una peor supervivencia. Estas alteraciones fueron las pérdidas de 9p21.3 y 10q26qter, y la ganancia de la región 8q24.21 (Figura 23).

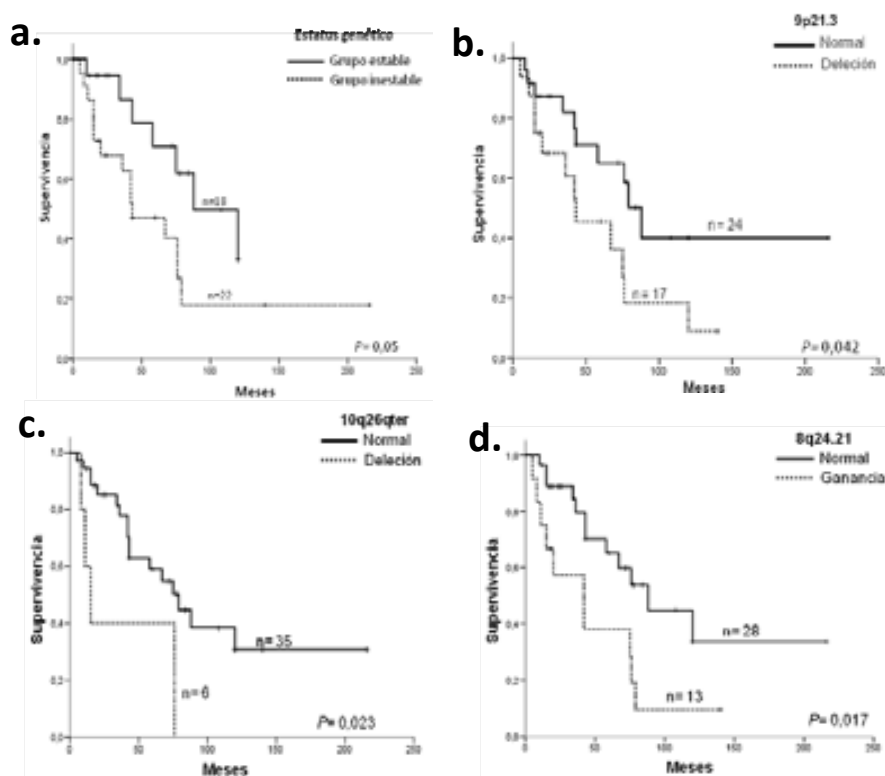


Figura 23. Diagramas de Kaplan-Meier de supervivencia para las MFT con respecto al estatus genético y las alteraciones mínimas alteradas. Los pacientes genéticamente más inestables presentaron una supervivencia global menor que los genéticamente estables. Con respecto a las regiones mínimas alteradas, las pérdidas de las regiones (b) 9p21.3 (SG: 85,5 vs. 45,7 meses), (c) 10q26qter (SG: 78 vs. 19,7 meses) y (d) las ganancias de la región 8q24.21 (SG: 89,1 vs. 41 meses) se asociaron a una peor supervivencia global cuando se compararon con los pacientes que no presentaron estas alteraciones.

3.3.2 Asociación entre las características clínicas, terapéuticas y morfológicas y la supervivencia de los pacientes con MFT

Cuando se analizó el posible valor pronóstico de las características clínicas de los pacientes, la edad avanzada (pacientes >60 años) y la presencia de lesiones en más de dos localizaciones se asociaron a una peor supervivencia global (Figura 24).

Sin embargo, no se hallaron diferencias estadísticamente significativas en la supervivencia global de los pacientes cuando se analizaron las siguientes variables clínicas e histológicas: infiltración extracutánea, presencia de ulceración, tamaño celular y presencia de epidermotropismo.

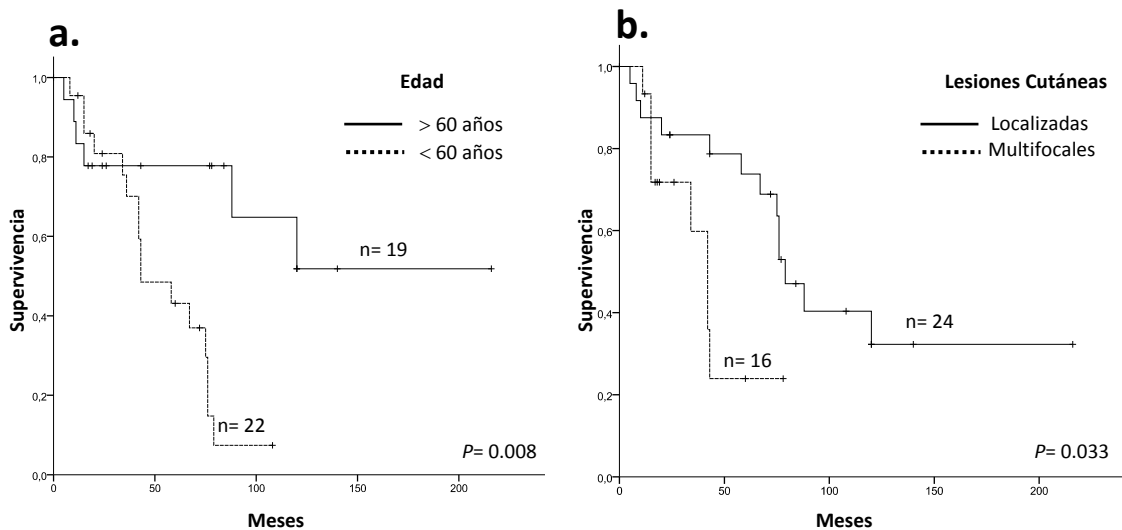


Figura 24. Diagramas de Kaplan-Meier de supervivencia para las MFt con respecto a las características clínicas. Únicamente la edad avanzada (a) y la presencia de lesiones multifocales (b) fueron consideradas como factores pronóstico.

3.3.3 Análisis multivariado

Para el análisis multivariado se consideraron como variables a analizar todas aquellas que habían resultado significativas en el análisis univariado: las deleciones de 9p21.3 y 10q26qter, la ganancia de 8q24.21, la edad avanzada (>60 años) y la presencia de tumores en más de dos localizaciones. Finalmente, ninguna de las variables analizadas pudo ser considerada como factor pronóstico independiente debido, probablemente, al bajo número de pacientes analizados.

TRABAJO 2: Análisis de las translocaciones de los genes del *TCR* (*TCRAD*, *TCRB* y *TCRG*) en linfomas cutáneos primarios de células T mediante la técnica de hibridación *in situ* fluorescente

1. INTRODUCCIÓN

Las translocaciones cromosómicas que afectan a los genes del receptor de células T (*TCR* del inglés *T-cell receptor*) se han observado frecuentemente en numerosas neoplasias linfoides de estirpe T, entre ellas la leucemia prolinfocítica de células T, las leucemias agudas linfoblásticas y menos frecuentemente en leucemias/linfomas T del adulto y linfomas T periféricos. Como resultado de estos reordenamientos cromosómicos se produce la yuxtaposición de los elementos *enhancer* de los genes del *TCR* (*TCRAD* [*TCR alpha/delta*], *TCRB* [*TCR beta*] y *TCRG* [*TCR gamma*]), principalmente *TCRAD*, con numerosos oncogenes (*TAL1*, *MYC*, *NOTCH1*, *HOX11*, *TCL1*) lo que da lugar a la expresión desregulada de estos proto-oncogenes (Geske *et al.* 2003).

Puesto que las translocaciones que afectan a los genes del *TCR* están claramente implicadas en la patogénesis de algunos linfomas T nodales, (y solo un número limitado de LCPCT han sido estudiados), el objetivo principal de este estudio fue analizar el estatus genético de los genes *TCRAD*, *TCRB* y *TCRG* mediante la técnica de FISH en una serie de linfomas cutáneos primarios de células T analizados previamente mediante técnicas de citogenética convencional y molecular (RX-FISH [del inglés, *rainbow cross-species color banding*] y oligoarrayCGH).

2. MATERIAL Y MÉTODOS

2.1 Descripción de pacientes y muestras

Se incluyeron 25 pacientes diagnosticados de MFt (n=6), LCACG-CD30+ (n=6) y SS (n=13) recogidos de cuatro centros participantes en la Xarxa de Limfomes Cutanis de Catalunya (Hospital del Mar, Hospital Universitari de Bellvitge, Hospital Clínic y Hospital de Sant Pau). Todos los pacientes se diagnosticaron siguiendo los criterios de la clasificación OMS/EORTC (Willemze *et al.* 2005) (Tabla 1).

Para los pacientes diagnosticados de SS, el análisis de FISH se realizó sobre núcleos en suspensión procedentes del cultivo de citogenética de sangre periférica, mientras que para los pacientes con MFt y LCACG-CD30+, la técnica de FISH se realizó sobre biopsias de piel incluidas en parafina. Como muestras control para establecer el *cut-off* de las sondas, se incluyeron 10 muestras de ganglios linfáticos reactivos incluidos en parafina y 10 muestras de células en suspensión de sangre periférica procedentes del cultivo de citogenética convencional.

Las muestras de MFt y LCACG-CD30+ incluidas en este estudio habían sido analizadas previamente mediante la técnica de oligoarrayCGH (MFt: Trabajo 1 [pag. 82]; LCACG-CD30+: Sánchez-Schmidt *et al.* 2011) mientras que las muestras de SS habían sido estudiadas mediante las técnicas de citogenética convencional y RX-FISH (Espinete *et al.* 2004) (Tabla 10).

Tabla 10. Características clínicas y citogenéticas de los pacientes con SS, MF y LCACG-CD30+.

n	Diagnóstico	Sexo	Edad	Técnica	Resultados
1	SS	M	75	CC	47,XX,-10,+18,+19[8]/46,XX[16]
2	SS	M	76	CC	44,X,-X,del(1)(q32),-13[20]/46,XX[16]
3	SS	M	54	CC	46,XX[20]
4	SS	H	80	CC	46,XY,t(2;12)(q23;q24)[1]/46,XY[20]
5	SS	H	27	CC	48,XY,add(1)(p36),del(3)(p14),inv(6)(p22q12),+7,der(8)t(1;8)(p36;q24),del(9)(q13q22),+del(9)(q13q22),der(15)t(9;15)(q31;q22),der(22)t(3;22)(p21;q13)[14]/46,XY[6]
6	SS	H	50	CC	41,X,-Y,del(2)(q34),+der(3),der(6)add(6)(p25)add(6)(q27),add(7)(p22),-8,-9,-10,-11,-13,-14,add(19)(q13.1),+20[6]
7	SS	H	74	CC	46,XY[20]
8	SS	M	70	CC	46,XX[20]
9	SS	H	70	CC	45,XY,add(1)(p36),del(3)(p23),-10,-17,+mar[5]/46,XY[15]
10	SS	H	68	CC	46,XY[20]
11	SS	M	73	CC	46,XX[20]
12	SS	M	78	CC	84~89,XX,-X,-X,der(1),-2,-3,+4,der(4),der(4),-5,del(6)(q23),der(7),-8,-9,-10,-10,add(11)(q24),-13,-15,-16,der(17),der(17),-22,-22,+5~10mar[cp3]/46,XX[17]
13	SS	M	58	CC	90,XX,-X,-X,-4,der(4),der(5),+i(8)(q10),-9,-10,-10,der(11),-12,-14,-15,add(16)(q22),+der(17),+18,+18,-19,+21,+5mar[2]/46,XX[13]
14	MF	M	68	OligoarrayCGH	SC
15	MF	H	43	OligoarrayCGH	SC

Tabla 10. Características clínicas y citogenéticas de los pacientes con SS, MF y LCACG-CD30+ (continuación).

16	MF	M	83	OligoarrayCGH	Ganancias: 3p12.3pter, 5q12.1, 5q23.3q31.2 (ampl), 7, 8q, 8q24 (ampl.), 9p21.3p24.2, 9q, 10p12.36p14, 10p14p15.2 (ampl.), 15q22.2q25.1, 16p13.12p13.2, 17q, 19p11p13.2 Pérdidas: 1p36.22p36.33, 1p36.11, 1p21.3p33, 1p13.1p21.1, 1q21.1q42.12, 5q12.1q14.3, 5q15q22.1 (homoz), 5q22.2, 5q23.1 (homoz), 5q23.2q23.3, 6q15q22.1, 6q22.33q27, 9p21.2p21.3, 10p11.11p12.1, 10q22.1, 10q23.31q26.3, 12, 13, 15q11.1q22.31, 15q25.1q26.3, 16q, 17p, 18, 19p13.3, 19q13.3qter, 20p11.22p13, 20q12q13.33, 21, 22
17	MF	M	67	OligoarrayCGH	SC
18	MF	H	73	OligoarrayCGH	Ganancias: 7 Pérdidas: 1p12p31.1, 9p21.3, 9q21.1q31.3, 10
19	MF	H	54	OligoarrayCGH	Ganancias: 7, 9q22.1q22.2, 9q34.11qter, 10p13pter, 11q23.2qter, 17q, 18q, 21 Pérdidas: 2q36.1q36.3, 5q33.3q34, 9q21.31q22.1, 10p11.21p13, 16q23.1q24.3, 17p, 18p
20	LCPCG-CD30+	H	58	OligoarrayCGH	Ganancias: 2, 7q21.11q21.3 Pérdidas: 7p22, 16, 17p, 19
21	LCPCG-CD30+	M	69	OligoarrayCGH	SC
22	LCPCG-CD30+	H	67	OligoarrayCGH	Ganancias: 1p13 Pérdidas: 4, 18q
23	LCPCG-CD30+	H	44	OligoarrayCGH	Ganancias: 16p11.2 Pérdidas: 7p22, 7q21.3q22.2, 13q13.3qter, 16p12.1pter, 16q22.1, 16q24.3, 17, 19
24	LCPCG-CD30+	H	45	OligoarrayCGH	Ganancias: SC Pérdidas: 7p22pter, 16p, 19
25	LCPCG-CD30+	M	78	OligoarrayCGH	Ganancias: 16p12.3p13.12, 16p13.2p13.3 Pérdidas: SC

Abreviaturas: CC: Citogenética convencional; SC: Sin cambios; LCACG-CD30+: Linfomas cutáneos primarios de células grandes-CD30+; ampl: amplificación; homoz: pérdida homocigota

2.2 Métodos

Para el análisis de las translocaciones de los genes del *TCR* se ha aplicado la técnica de FISH sobre tejido parafinado. En el presente trabajo se han utilizado las sondas de *split* comerciales: *TCRAD FISH DNA Probe, Split Signal; TCRB FISH DNA Probe, Split Signal* y

TCRG FISH DNA Probe, Split Signal (Dako) (Figura 25). Tanto las muestras como los controles se hibridaron independientemente con las tres sondas. Para el análisis de los resultados se contaron un mínimo de 100 núcleos no superpuestos. El *cut-off* para determinar la presencia de translocación se estableció a partir de los casos utilizados como control. Los detalles técnicos y el análisis de los resultados se especifican en el apartado Material y Métodos (pag. 47).

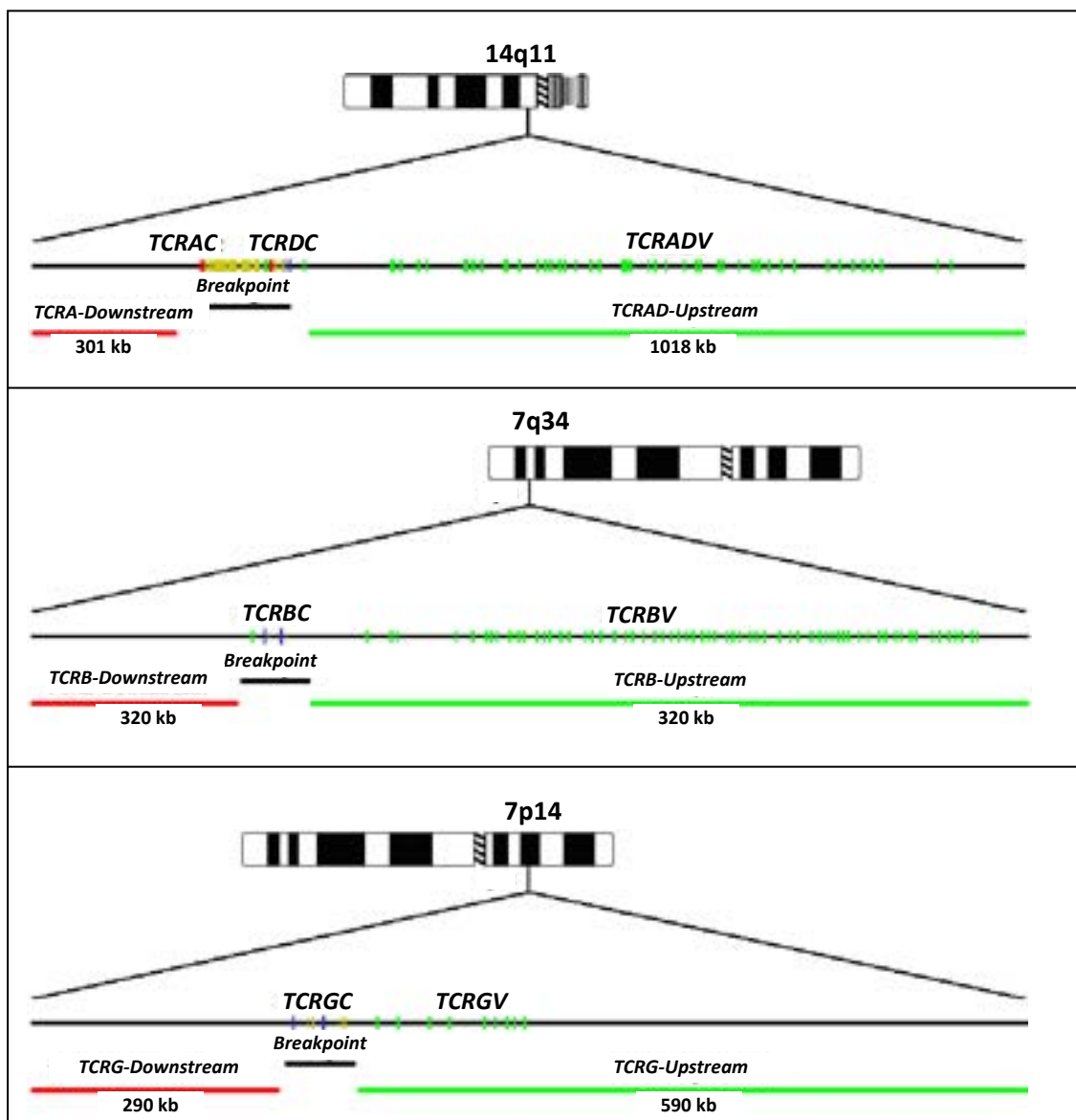


Figura 25. Diseño de las sondas de *split* para el estudio de las translocaciones de los genes *TCRAD*, *TCRB* y *TCRG* (Dako).

3. RESULTADOS

3.1 Ausencia de translocaciones cromosómicas en los loci del *TCR* en los pacientes afectos de linfomas cutáneos primarios de células T

En el presente estudio, se han analizado un total de 25 LCPCT con tres sondas de *split* comerciales para los genes de los loci del *TCR* (*TCRAD*, *TCRB* y *TCRG*). Finalmente, el análisis mediante FISH no ha permitido detectar translocaciones cromosómicas en ninguno de los casos estudiados. De la misma manera, ninguna de las muestras control (ganglios reactivos y sangre periférica de individuos sanos) mostraron translocaciones que afectaran a los genes *TCRAD*, *TCRB* y *TCRG*.

Por otra parte, se ha observado la presencia de tres y cuatro copias de los genes *TCRB* (7q34) y *TCRG* (7p14) en tres MFt y tres SS (Figura 26). Este hallazgo confirma los resultados previos obtenidos mediante las técnicas de citogenética convencional, RX-FISH y oligoarrayCGH (Tabla 10).

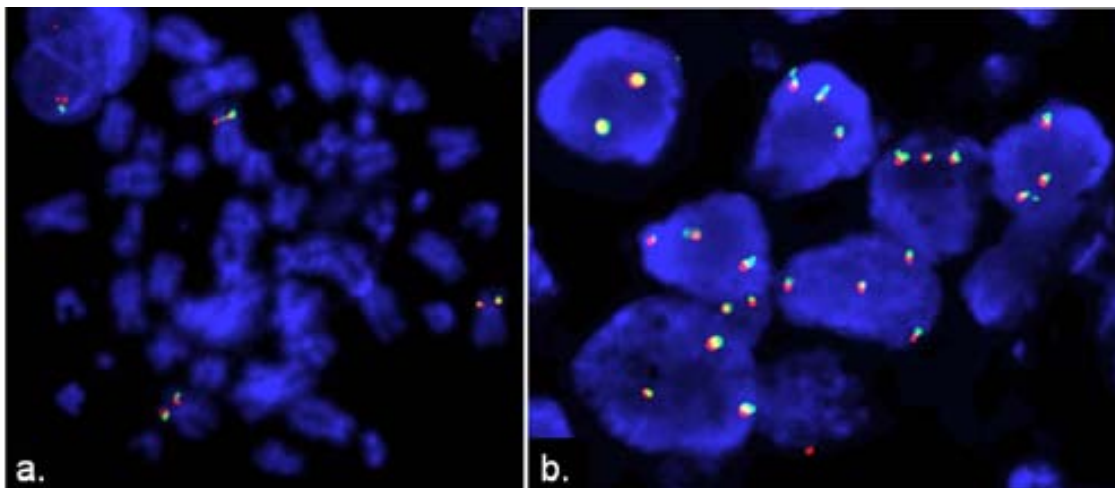


Figura 26. Resultados de la técnica de FISH. (a) Imagen de FISH que muestra 3 copias de la sonda *TCRG* (7p14) (paciente 5). (b) Imagen de FISH que muestra de 3-5 copias de la sonda *TCRB* (7q34) en una biopsia de piel incluida en parafina (paciente 17).

Discusión

1. PERFIL GENÉTICO DE LA MICOSIS FUNGOIDE TUMORAL

1.1 La MFt presenta alteraciones cromosómicas recurrentes

Numerosas técnicas citogenéticas se han empleado con el fin de caracterizar la MF. Tal y como se ha comentado en la introducción, los estudios realizados por técnicas de citogenética convencional son limitados, debido a la dificultad de obtener células en división (Harwix *et al.* 2001). Las técnicas de citogenética molecular que mejor han permitido conocer las alteraciones genéticas de la MF han sido fundamentalmente la CGH (del inglés, *comparative genomic hybridization*) y posteriormente, los microarrays genómicos.

En los primeros trabajos realizados mediante la técnica de CGH convencional, los cromosomas más frecuentemente alterados fueron los cromosomas 1, 8, 9, 10, 11, 12 y 17 (Karenko *et al.* 1999; Mao *et al.* 2002; Mao *et al.* 2003a; Fischer *et al.* 2004). Sin embargo, dichos estudios presentaban algunas limitaciones: 1) fueron realizados incluyendo series heterogéneas con distintos tipos de linfomas cutáneos de células T, en distintos estadios y por lo tanto, con una evolución clínica variable e 2) incluían un limitado número de pacientes. La primera serie homogénea estudiada mediante la técnica de CGH convencional fue la descrita por Prochazkova *et al.* (Prochazkova *et al.* 2007), en la que se incluyeron sólo 11 pacientes diagnosticados de MFt. En este trabajo, las alteraciones más frecuentes fueron las ganancias del cromosoma 7 y de las regiones 17q, 9q34qter y 8q, así como las pérdidas de 17p, 10q, 2q36qter y 9p21.

Recientemente, han surgido distintos trabajos en los que se ha aplicado la técnica de arrayCGH para estudiar el perfil genómico de la MFt. El primero de ellos fue el descrito por el grupo holandés en el cual se aplicó la técnica de BACarrayCGH en 22 pacientes diagnosticados de MFt (van Doorn *et al.* 2009). Este trabajo empleó una plataforma de BACs “no comercial” que contenía alrededor de 3.500 sondas. El objetivo principal de este estudio fue el de identificar las diferencias genómicas entre la MFt y el SS. En dicho trabajo se observó que las ganancias en distintas regiones del cromosoma 7 (7q36, 7q32q35, 7q21q22, 7q11.2, 7p13p14, 7p21p22), 1q31q32, 1p36.2, 8q24 y 17q22 así como las pérdidas en los cromosomas 5q13, 9p21 y 13q14q31 eran frecuentes en la MFt.

El presente trabajo ha incluido 41 pacientes diagnosticados de MFt, lo que constituye la serie más extensa estudiada hasta el momento. Cabe destacar que 10 de los 41 pacientes incluidos procedían del Leiden Medical Center (Holanda) y que habían sido previamente analizados por el grupo holandés (van Doorn *et al.* 2009). Las alteraciones más frecuentemente halladas fueron, por orden de frecuencia, las ganancias de 7q33.3q35, 17q21.1, 8q24.21, 9q34 y 10p14, y las pérdidas de 9p21.3, 9q31.2, 17p13.1, 13q14.11, 6q21.3, 10p11.22, 16q23.2 y 16q24.3.

Posteriormente, el grupo francés (Laharanne *et al.* 2010a) analizó 58 pacientes diagnosticados de LCPCT, 24 de los cuales diagnosticados de MFt. En dicho estudio, se observaron ganancias recurrentes en distintas regiones del cromosoma 7 (7p22p11.2, 7q21, 7q31), 1q25q31 y 17q12, así como pérdidas de 9p21, 10p11.2, 10q26 y 17p.

Cuando se comparan los resultados obtenidos en los trabajos anteriormente citados y el de la presente tesis, muchas de las alteraciones son coincidentes (Tabla 11). Son destacadas las ganancias que afectan a los cromosomas 7q, 17q, y 8q, y las pérdidas en 9p, 13q, 17p y 10q, lo que lleva a sugerir que la MFT presenta un perfil genético característico. Sin embargo, existen discrepancias entre las distintas series, como ocurre con las ganancias en 1q o las pérdidas en 5q, que se hallan más frecuentemente alteradas en los estudios realizados por el grupo holandés y francés respectivamente (van Doorn *et al.* 2009; Laharanne *et al.* 2010a). Dichas discrepancias pueden ser debidas a las distintas plataformas utilizadas, al distinto número de pacientes incluidos así como a las distintas características clínicas de estos pacientes (estadios).

Tabla 11. Resultados de las alteraciones más frecuentemente observadas en la MFT en los distintos análisis mediante la técnica de arrayCGH. Discrepancias y similitudes.

Alteraciones	Van Doorn <i>et al.</i> (BAC array) n= 22	Presente estudio (Oligo array) n= 41	Laharanne <i>et al.</i> (Oligo array) n= 24
+7p	X	X	X
+7q	X	X	X
+8q24	X	X	
+17q22	X	X	
-9p21	X	X	X
-13q14.11	X	X	
-17p13		X	X
-10q26		X	X

Una de las alteraciones que ha causado más controversia en los LCPCT ha sido la delección/translocación del gen *NAV3* (*Neuron navigator 3*) descrita por Karenko *et al.*

(Karenko *et al.* 2005). *NAV3* es uno de los tres homólogos de *unc-53*, un gen implicado en el alargamiento axonal en *Caenorhabditis elegans*. Con respecto a los procesos tumorales, se ha postulado que *NAV3* juega un papel importante en el mantenimiento de la estabilidad cromosómica. Por lo tanto, la pérdida de este gen podría contribuir a la inestabilidad genómica observado en los LCPCT (Kaltoft *et al.* 1994). La implicación de este gen se halló al mapear la translocación t(12;18)(q21;q21.2) en un caso de SS. Además, en dicho estudio se determinó que un 50% de MF incipientes y un 78% de MF en estadios avanzados presentaban delección de esta región. Posteriormente, Marty *et al.* (Marty *et al.* 2008) intentaron reproducir dichos resultados mediante FISH y arrayCGH en una serie independiente de pacientes con MF y SS, y determinar si las delecciones del gen *NAV3* eran la consecuencia de pérdidas de gran tamaño que involucraran al cromosoma 12 o si se encontraban asociadas a un punto de rotura específico que afectara a uno de los alelos de *NAV3*. Además, incluyeron pacientes en estadios avanzados para asegurar la presencia de suficiente población tumoral en las muestras estudiadas, y por lo tanto, un mayor número de casos positivos. Finalmente, ninguno de los casos analizados presentó un patrón característico de translocación que afectara al gen *NAV3*, y por consiguiente no se validaron los resultados observados por Karenko *et al.* (Karenko *et al.* 2005). Sin embargo, en este estudio se observaron delecciones del gen *NAV3*, pero en una proporción mucho menor a la observada anteriormente (8% vs. 85%) en forma de pérdidas que afectaban a todo el brazo largo del cromosoma 12. De acuerdo a lo observado por Marty *et al.* (Marty *et al.* 2008), en el trabajo que se presenta en esta tesis doctoral se ha detectado que sólo un paciente mostró pérdida de esta región debido a una delección que afectaba al cromosoma 12 completo.

1.2 Ausencia de translocaciones que afectan a los genes del TCR en la MFT

Hasta el momento, sólo se han descrito dos translocaciones recurrentes en los LCPCT. La primera de ellas fue la que afecta al gen *NAV3* (12q21q22), que como ya se ha mencionado anteriormente, no se confirmó en una serie independiente (Karenko *et al.* 2005; Marty *et al.* 2008).

La segunda de ellas es la que afecta al gen *IRF4* (*Multiple myeloma oncogene-1/interferon regulatory factor-4*, 6q25). En el año 2009, Feldman *et al.* (Feldman *et al.* 2009) describieron la implicación de este gen al mapear la translocación t(6;14)(p25;q11.2) presente en un paciente diagnosticado de un linfoma de células T periférico (LCTP). Hasta ese momento, translocaciones con afectación del gen *IRF4* habían sido descritas en mieloma múltiple y en linfomas de estirpe B (Tsuboi *et al.* 2000). Para conocer la incidencia de las translocaciones de *IRF4* en los LCTP, en dicho trabajo, se analizó el estatus del gen *IRF4* mediante la técnica de FISH en una serie de 169 LCTP (n= 72 LCTP sin especificar; n=24 linfomas anaplásicos ALK negativos; n=23 linfomas de células T angioinmunoblásticos; n=18 linfomas anaplásicos ALK positivos; n=18 otros LCTP; n=14 LCACG-CD30+). Finalmente, se observó que 12/169 presentaban translocaciones del gen *IRF4*. Cabe destacar que nueve de los 12 casos positivos para la translocación correspondían a LCACG-CD30+.

Para validar estos resultados el grupo francés estudió, mediante la técnica de FISH, la presencia de translocaciones del gen *IRF4* en una serie independiente de LCPCT con expresión del antígeno CD30 (Pham-Ledard *et al.* 2010). Observaron que en un 26% de LCACG-CD30+ y un 18,2% de las MFT con expresión del antígeno CD30 presentaban translocaciones de este gen. Recientemente, Wada *et al.* (Wada *et al.* 2011) han

ampliado el estudio del gen *IRF4* en una serie de 204 biopsias cutáneas de distintos tipos de procesos linfoproliferativos T, incluyendo tanto linfomas nodales como extranodales. En dicho trabajo observaron translocación del gen *IRF4* en 9/45 (20%) LCACG-CD30+ y en 1/32 PL. Con respecto al resto de linfomas T estudiados, ninguno mostró translocación de este gen. Finalmente, sugieren que la presencia de la translocación de *IRF4* podría ser útil para el diagnóstico diferencial de los procesos linfoproliferativos T cutáneos CD30+.

Por lo tanto, a pesar de los estudios mediante las técnicas de citogenética convencional y *spectral karyotyping* (Batista *et al.* 2006; Padilla-Nash *et al.* 2007), en los LCPCT en general, y en la MF en particular, no se ha observado ninguna de las dos alteraciones descritas. Probablemente, la resolución de estas técnicas puede llevar a obviar reordenamientos crípticos ya sea por la complejidad de los cariotipos observados, por la presencia de inversiones o por el resultado de un cariotipo normal que enmascare al clon patológico.

Por otra parte, y en lo que a translocaciones se refiere, los genes del *TCR* (*TCRAD*, *TCRB* y *TCRG*) tienen importancia diagnóstica en distintas neoplasias de estirpe T como son la leucemia prolinfocítica de células T y la leucemia aguda linfoblástica T. Con respecto a linfomas de células T, se han observado translocaciones de los genes *TCRAD* y *TCRB* en una baja proporción de leucemias/linfomas T linfoblásticos y de linfomas de células T periféricos (Geske *et al.* 2003; Feldman *et al.* 2008). Sin embargo, los estudios que analizan el estatus de los genes del *TCR* en los LCPCT son escasos. En el trabajo realizado por Geske *et al.* (Geske *et al.* 2003) se estudió el estatus de los genes *TCRAD* y *TCRB* mediante la técnica de FISH en una serie de 82 linfomas de estirpe T entre los

que se incluyeron seis MF y seis SS. En ninguna de las muestras de MF y SS analizadas se hallaron alteraciones en dichos genes.

Para ampliar el número de pacientes estudiados hasta el momento, en nuestra aproximación se analizaron 25 LCPCT: 13 SS, seis MF y seis LCACG-CD30+. Además se incluyó la sonda del *TCRG*, hasta ahora nunca estudiada en LCPCT. Finalmente, y de acuerdo con lo hallado por Gesk *et al.* (Gesk *et al.* 2003), ninguno de los pacientes analizados mostró translocaciones en ninguno de los loci analizados lo que sugiere que ésta no es una característica genética recurrente en la MFt, ni en ninguno de los otros tipos de LCPCT incluidos en la serie. Por lo tanto, las translocaciones que afectan a los genes del *TCR* no son frecuentes en los LCPCT. Sin embargo no se puede descartar su papel patogénico en este tipo de linfomas a través de otros mecanismos.

1.3 Perfil de inestabilidad genómica

Se ha sugerido que las alteraciones en aquellos procesos que mantienen la integridad del genoma podrían contribuir a la aparición de distintos tipos de aberraciones genéticas (Lengauer *et al.* 1998; Blaveri *et al.* 2005). Estas alteraciones serían la ganancia total o parcial de un cromosoma, la presencia de regiones amplificadas, la presencia de pérdidas homocigotas y el número de roturas cromosómicas. Se han realizado análisis de inestabilidad genómica en distintos tipos de tumores humanos como por ejemplo el cáncer de vejiga, cáncer de mama, neuroblastoma, sarcoma de Ewing y linfomas de células B (Blaveri *et al.* 2005; Fridlyand *et al.* 2006; Ferreira *et al.* 2008a; Ferreira *et al.* 2008b) en los que se han podido establecer distintos grupos en

base a sus características genéticas y correlacionar la inestabilidad genómica con un peor pronóstico.

En el presente estudio, la aplicación de la técnica de oligoarrayCGH ha permitido definir el perfil de inestabilidad genómica en la MFt. En este sentido, la conjunción entre las distintas herramientas bioinformáticas empleadas ha permitido cuantificar dichas alteraciones. A partir de los datos obtenidos se han definido dos grupos: uno de ellos caracterizado por presentar pocas alteraciones cromosómicas (0-5) y al que se ha denominado genéticamente estable, y un segundo grupo denominado inestable ya que presenta un alto número de alteraciones cromosómicas (>5). Además, se ha observado que el grupo inestable tiene una peor supervivencia global que el grupo genéticamente inestable. Estos datos son similares a los propuestos por Fischer *et al.* (Fischer *et al.* 2004). En dicho trabajo, el objetivo principal fue el de analizar las aberraciones genéticas mediante la técnica de CGH convencional y describir factores genéticos de mal pronóstico. Una de las conclusiones de este estudio fue que presentar cinco o más alteraciones genéticas se asociaba a una peor supervivencia a los 5 años, tal y como se ha observado en el trabajo descrito en la presente tesis. Sin embargo, a diferencia del estudio del grupo alemán en el cual se incluyen distintos tipos de LCPCT (MF, LCACG-CD30+, SS, linfomas cutáneos T pleomórficos, LCPCT-CD8+), nuestro trabajo se centra exclusivamente en casos de MFt.

Otro de los hallazgos que ha aportado la realización de este análisis de inestabilidad es que, entre todas las alteraciones genéticas halladas, sólo la ganancia del cromosoma 7q se asoció a una presencia mayor de inestabilidad. Tanto la ganancia del cromosoma

7 como la presencia de isocromosomas 7q es una característica relativamente frecuente de distintos tipos de linfomas T agresivos como el linfoma de células T hepatoesplénicos (Wlodarska *et al.* 2002; Tamaska *et al.* 2006), el linfoma extranodal de células T/NK, tipo nasal y el linfoma anaplásico de célula grande ALK- (Feldman *et al.* 2008). La presencia de numerosos genes en 7q (*BRAF*, *EZH2*, entre otros) implicados en la patogénesis de distintos tipos de tumores humanos así como la asociación con un perfil más inestable, sugiere un papel patogénico de esta región en las MFT.

1.4 Alteraciones genéticas y pronóstico

Uno de los principales objetivos del presente trabajo fue la descripción de alteraciones genéticas como marcadores de mal pronóstico. Previamente, en el estudio realizado por Fischer *et al.* (Fischer *et al.* 2004) se asociaron alteraciones genéticas concretas con una peor supervivencia de una serie de LCPCT. Concretamente, la presencia de pérdidas en los cromosomas 6q y 13q, y las ganancias en la región 8q, así como la presencia de más de cinco alteraciones genéticas, se asociaron a una peor supervivencia a los 5 años. Sin embargo, la información que se obtiene de dicho trabajo es limitada, ya que como se ha mencionando anteriormente, la serie incluyó distintos tipos de linfomas cutáneos T.

Recientemente, van Doorn *et al.* (van Doorn *et al.* 2009) describieron que las ganancias en 8q24.21 y 1q21q22, y las pérdidas de 9p21.3 se asociaban a una supervivencia global disminuida. Por otra parte, en el estudio realizado por el grupo francés

(Laharanne *et al.* 2010a), ni la ganancia de 8q24 ni la pérdida de 9p21 se asoció significativamente a una peor supervivencia global.

En el presente estudio, se han hallado tres alteraciones que se asocian a una peor supervivencia global de los pacientes: las deleciones de 9p21.3 y 10q26qter y la ganancia en 8q24.21. De la misma forma que van Doorn *et al.* (van Doorn *et al.* 2009), se ha observado una asociación significativa entre la pérdida de 9p21.3 y la ganancia de 8q24.21 y una peor supervivencia global. Por lo tanto, se confirman dichos resultados en una serie más extensa, lo que sugiere un importante papel de los genes que se localizan en estas dos regiones en la patogénesis de la MFt.

La aplicación de distintas plataformas además del distinto número de pacientes podrían explicar las diferencias observadas con respecto a las regiones discrepantes, la ganancia de 1q21q22 (van Doorn *et al.* 2009) y la pérdida de 10q26qter (descrita en la presente tesis doctoral).

Los posibles genes candidatos que se localizan en cada una de estas tres regiones se detallan a continuación:

1.4.1 Deleción de la región 9p21.3

La mínima región delecionada en 9p21.3 hallada en el estudio de nuestro grupo abarcó solamente 200 Kb e implicaba principalmente a los genes supresores de tumores *CDKN2A*, *CDKN2B* y *MTAP*. A diferencia de van Doorn *et al.* (van Doorn *et al.* 2009), cuya región mínima comprendía 2 Mb, la aplicación de la plataforma de

oligonucleótidos y de las herramientas bioinformáticas nos ha permitido delinear con mayor precisión la región mínima alterada. Además, hemos observado que de todos los pacientes que presentaron afectada esta región (n=17), seis presentaron delección homocigota, una característica genética no descrita hasta la observación de nuestro trabajo y posteriormente confirmada por Laharanne *et al.* (Laharanne *et al.* 2010a; Laharanne *et al.* 2010b).

Los genes *CDKN2A* (*Cyclin-dependent kinase inhibitor 2A*) y *CDKN2B* (*Cyclin-dependent kinase inhibitor 2B*) codifican para las proteínas p16^{INK4A} y p15^{INK4B}, las cuales son capaces de inducir un paro del ciclo celular en la fase G1 inhibiendo la fosforilación de Rb. Se ha descrito que los genes *CDKN2A* y *CDKN2B* están implicados en la patogénesis de la MF. Navas *et al.*, (Navas *et al.* 2000; Navas *et al.* 2002) demostraron que el fenómeno genético más frecuente que alteraba la función de estos genes era la hipermetilación de la región promotora y no la mutación ni la pérdida de heterocigosidad. Recientemente, se ha estudiado el estatus genético y de metilación de ambos genes en una serie de 24 MFT, 16 SS y 18 LCACG-CD30+ mediante las técnicas de FISH, arrayCGH, PCR cuantitativa y técnicas de bisulfito (Laharanne *et al.* 2010b). En este estudio se ha demostrado que son las pérdidas de la región 9p21, ya sean homocigotas o heterocigotas, lo que se observa frecuentemente en MFT y SS, y que se correlacionan con una peor supervivencia global, tal y como ya se había descrito anteriormente (van Doorn *et al.* 2009).

Por otro lado, el gen *MTAP* (*Methylthioadenosine phosphorylase*) codifica para una enzima esencial para la actividad normal de la síntesis de adenina y metionina. Se ha

postulado que este gen tiene función de gen supresor de tumores en distintos tipos de cánceres (Nobori *et al.* 1996; Dreyling *et al.* 1998; Subhi *et al.* 2004; Marce *et al.* 2006; Mirebeau *et al.* 2006; Worsham *et al.* 2006) y se inactiva debido a la pérdida de la región 9p21.3. La proximidad de *MTAP* a los bien definidos genes supresores tumorales *CDKN2A* y *CDKN2B*, ha llevado a pensar que la pérdida de este gen es incidental. Sin embargo, recientemente se ha demostrado en un modelo murino *knockout* para *MTAP* que los ratones con genotipo homocigoto adquirirían un fenotipo embrionario letal mientras que los ratones con genotipo heterocigoto desarrollaron un linfoma primario de estirpe T (Kadariya *et al.* 2009). Estos hallazgos apoyan no sólo la función del gen *MTAP* como gen supresor de tumores, sino que también sugieren un posible papel patogénico en el desarrollo de la MFt.

1.4.2 Ganancia de la región 8q24.21

Las ganancias parciales o completas del cromosoma 8 ya habían sido descritas previamente en la MFt (Fischer *et al.* 2004; Prochazkova *et al.* 2007; van Doorn *et al.* 2009). En el presente estudio se observó que esta ganancia es frecuente (31,4%), de acuerdo con lo descrito por van Doorn *et al.* (van Doorn *et al.* 2009). Además, dos pacientes de nuestra serie presentaron amplificación de la mínima región alterada 8q24.21 (750 Kb), implicando al oncogén *MYC* (*v-myc myelocytomatosis viral oncogene homolog*). El gen *MYC* es un oncogén implicado en la regulación de la proliferación, crecimiento, diferenciación y apoptosis (Meyer *et al.* 2006; Vita and Henriksson 2006) y juega un papel importante en la etiología de numerosas neoplasias hematológicas (Dalla-Favera *et al.* 1982; Klapproth and Wirth 2010). Recientemente, la función alterada de *MYC* también ha sido descrita en el SS (Vermeer *et al.* 2008). Vermeer *et*

al. (Vermeer *et al.* 2008) estudiaron el perfil genético de 20 SS mediante técnicas de microarrays (expresión y BACarrayCGH). En dicho trabajo se detectó una ganancia frecuente de la región 8q24 donde se localiza *MYC* así como una expresión aumentada de éste y una disminución de la expresión de sus antagonistas: *MXI1* y *MNT*. Estudios recientes en modelos murinos que presentaban pérdida de *Mnt* y *Mxi1* mostraban una mayor capacidad proliferativa y por lo tanto facilitaba la tumorigénesis, dando lugar a un desarrollo anómalo de las células T y finalmente al desarrollo de un linfoma T (Dezfouli *et al.* 2006). Estos datos, por tanto, sugieren un papel importante no sólo en la patogénesis de la MFt sino también de otros LCPCT agresivos como el SS.

1.4.3 Deleción de la región 10q26qter

Las alteraciones en el cromosoma 10 han sido descritas en la MFt y el SS mediante técnicas de citogenética convencional, CGH y marcadores de microsatélites (Limon *et al.* 1995; Karenko *et al.* 1997; Karenko *et al.* 1999; Scarisbrick *et al.* 2000; Scarisbrick *et al.* 2001; Mao *et al.* 2002; Espinet *et al.* 2004; Fischer *et al.* 2004; Wain *et al.* 2005; Prochazkova *et al.* 2007;). Con la aplicación de las técnicas de oligoarrayCGH hemos conseguido definir la región 10q26qter como la región delecionada más frecuente en la MFt. El tamaño de esta alteración es de alrededor de 700 Kb y contiene 31 genes. Entre estos genes, cabe destacar la presencia de dos genes supresores tumorales: *MGMT* y *EBF3*. El silenciamiento del gen *MGMT* (*O*-6-methylguanine-DNA methyltransferase) por mecanismos de metilación ha sido estudiado en numerosos cánceres humanos incluidos los LCPCT (Gallardo *et al.* 2004; van Doorn *et al.* 2005). El gen *MGMT* codifica para una enzima reparadora de ADN que protege a las células de los agentes alquilantes y se ha sugerido que puede participar en la protección a la

carcinogénesis. Con respecto a la MFt, aunque inicialmente se observó que la metilación de *MGMT* era una característica frecuente de esta patología (Gallardo *et al.* 2004), en un segundo estudio realizado por el grupo holandés (van Doorn *et al.* 2005) se observó que la metilación del promotor de *MGMT* es un fenómeno que ocurre no solo en LCPCT sino también en muestras sanas. Por lo tanto, el estatus de metilación de este gen queda descartado como marcador de malignidad. Por otra parte, la reciente descripción del gen *EBF3* (*Early B-cell factor 3*) como un gen supresor tumoral implicado en la interrupción del ciclo celular y apoptosis (Zhao *et al.* 2006), sugiere una posible función patogénica en la MFt.

2. COMPARACIÓN DEL PERFIL GENÉTICO DE LA MFt CON OTROS LCPCT: SINDROME DE SÉZARY Y LINFOMAS CUTÁNEOS ANAPLÁSICOS DE CÉLULA GRANDE CD30+

2.1 Comparación con el Síndrome de Sézary: ¿son entidades relacionadas?

A diferencia de la MF, el SS es el subtipo de LCPCT más estudiado por técnicas de citogenética convencional ya que la célula patológica, el linfocito CD4+, se halla circulando por sangre periférica. Los estudios citogenéticos muestran que más del 50% de los pacientes con SS presentan numerosas alteraciones, mayoritariamente en forma de cariotipos complejos (Sole *et al.* 1995; Thangavelu *et al.* 1997; Mao *et al.* 2003b; Espinet *et al.* 2004; Batista *et al.* 2006). Las alteraciones más frecuentes son las pérdidas del cromosoma 10, deleciones de 1p, isocromosoma 17q, adiciones en 17p y 19p y translocaciones que afectan a 1p, 10q y 14q (Mao *et al.* 2003; Espinet *et al.* 2004).

Recientemente, Vermeer *et al.* (Vermeer *et al.* 2008) han realizado un estudio de alteraciones cromosómicas en 20 SS utilizando la tecnología de arrayCGH. Este trabajo ha delineado una serie de regiones frecuentemente alteradas, como las ganancias en 17q23q25 y 8q24.1q24.3, y las pérdidas en 17p13.1 y 10q25 empleando una plataforma “casera” de unos 3.500 BACs. En un análisis posterior realizado por el grupo italiano (Caprini *et al.* 2009) se estudiaron 28 pacientes con SS utilizando dos microarrays comerciales: *GeneChip Human Mapping 10K* (Affymetrix) y *Human Genome CGH Microarray kit 44B* (Agilent Technologies), ambas plataformas con una resolución superior al array empleado previamente (Vermeer *et al.* 2008). En dicho estudio, observaron muchas alteraciones similares a las detectadas por Vermeer *et al.*

(Vermeer *et al.* 2008) como las ganancias que afectan a regiones de 8q y 17q, y las pérdidas en 17p y 10q. Sin embargo, también han hallado diferencias, no sólo en regiones cromosómicas concretas que afectan al cromosoma 10q y 17q, sino también en las frecuencias en las que se detectan dichas alteraciones. Dichas discrepancias observadas entre ambos estudios podrían ser debidas a las distintas plataformas empleadas en cada uno de los estudios. Finalmente, un tercer estudio publicado por Laharanne *et al.* (Laharanne *et al.* 2010a), el cual incluyó 16 SS, reprodujo los resultados hallados en los estudios anteriormente mencionados lo que sugiere que el SS se caracteriza por una elevada inestabilidad cromosómica, con ganancias y pérdidas recurrentes. Las alteraciones más frecuentes así como las plataformas utilizadas se resumen en la tabla 12.

Tabla 12. Resumen de los resultados de las series de SS analizadas mediante las técnicas de arrays genómicos

Publicación	n	Técnica aplicada	Alteraciones recurrentes
Vermeer <i>et al.</i> Can Res, 2008	20	BACarrayCGH	Ganancias: 17q23, 17q24q24, 8q24.1q24.3, 17q25, 8q22q23 Pérdidas: 17p13.1p13.3, 10q24q26, 5q14.3
Caprini <i>et al.</i> Clin Can Res, 2009	28	OligoarrayCGH y SNParrays	Ganancias: 17p11.2q25.3, 8p23.3q24.3, 10p15.3p12.2 Pérdidas: 17p13.2p11.2, 10p12.1q26.3, 9q13q21.33
Laharanne <i>et al.</i> J Invest Dermatol, 2010	16	OligoarrayCGH	Ganancias: 8q23q24.3, 17q23q24 Pérdidas: 9p21, 10p12.11.2, 10q22q24, 10q25q26, 17p13q11.1

Con respecto a la MFt, en el trabajo publicado por van Doorn *et al.* (van Doorn *et al.* 2009) cuyo objetivo fue el de comparar los perfiles genéticos de la MFt y el SS,

concluyeron que ambas entidades presentan alteraciones muy diferentes (Tabla 13) y postularon que son entidades independientes. Con respecto a los resultados obtenidos en la presente tesis, entre todas las alteraciones detectadas se observó que muchas de ellas eran similares a las halladas en el SS (Vermeer *et al.* 2008; Caprini *et al.* 2009; Laharanne *et al.* 2010), como las ganancias de 17q21.1 y 8q24.21, y las pérdidas en 17p13.1. Aunque estas alteraciones han sido detectadas en un menor número de pacientes, cabe destacar que los tres pacientes que presentaban infiltración en sangre periférica presentaron pérdida de 17p13.1 y ganancia en 17q21.1. En uno de dichos pacientes se detectó asimismo pérdida de 10p11.22 y en otro paciente se observó la ganancia de 8q24.21. Por lo tanto, aunque en nuestro estudio el patrón genómico de la MFt es diferente al descrito para el SS, se detectaron alteraciones similares en aquellos pacientes que presentaron infiltración a sangre periférica lo que indica que podría existir una relación entre ellas. Futuros estudios cuyo objetivo sea analizar y comparar los perfiles genómicos de estos dos tipos de patologías (SS *de novo* vs. SS desarrollado en pacientes con MF) permitirán conocer las diferencias y similitudes de estas entidades.

Tabla 13. Diferencias en las alteraciones genéticas de la MFt y el SS (adaptada de van Doorn *et al.* 2008).

Banda citogenética	Alteracion	MFt afectados (%)	SS afectados (%)
Micosis Fungoide			
7q36	Ganancia	59	15
7q21-7q22	Ganancia	55	20
7q32-7q35	Ganancia	55	10
7q11.2	Ganancia	50	15
1p36.2	Ganancia	45	15
1q31-1q32	Ganancia	45	0
5q13	Pérdida	45	40
7p22-7p21	Ganancia	45	20
7p14-7p13	Ganancia	45	15
1q21-1q22	Ganancia	41	5
Síndrome de Sézary			
17q23	Ganancia	32	85
17q22-17q23	Ganancia	32	80
17q24-17q25	Ganancia	27	80
8q24.1-8q24.2	Ganancia	23	75
8q24.2-8q24.3	Ganancia	27	75
8q22-8q23	Ganancia	18	70
17p13	Pérdida	9	70
17q25	Ganancia	32	70
8q12-8q21.1	Ganancia	18	65
8q11.2-8q12	Ganancia	18	60

2.2 Comparación con los linfomas cutáneos anaplásicos de célula grande CD30+

Como sucede en la MF, existen escasos estudios de citogenética convencional en los linfomas cutáneos anaplásicos de célula grande CD30+ (LCACG-CD30+) debido a las mismas razones técnicas (dificultad de obtener células en división, etc.), pero con el agravante de que la prevalencia de este subtipo de LCPCT es muy inferior a la de la MF. A diferencia de sus equivalentes nodales, los LCACG-CD30+ no presentan la $t(2;5)(p23;q35)$ (DeCoteau *et al.* 1996) que afecta a los genes *ALK* (2p23) y *NPM* (5q35).

Con respecto a los estudios de CGH convencional, los tres estudios con series de pacientes de LCACG-CD30+ publicadas hasta el momento actual son los trabajos de Mao *et al.* (Mao *et al.* 2003c), Prochazkova *et al.* (Prochazkova *et al.* 2003), y Zettl *et al.* (Zettl *et al.* 2004). En el primer estudio, Mao *et al.* (Mao *et al.* 2003c) analizaron 15 pacientes y detectaron alteraciones citogenéticas en el 53% de los casos, principalmente ganancias de 1/1p, 5, 6, 7, 8/8p y 19. Posteriormente, Prochazkova *et al.* (Prochazkova *et al.* 2003) en un estudio de nueve casos de LCACG-CD30+ observaron que las regiones más frecuentemente alteradas fueron las ganancias en 9q33q34 y las pérdidas en 6q21 y 18p11.3. Finalmente, Zettl *et al.* (Zettl *et al.* 2004), publicaron una serie de 79 pacientes con linfomas T, en la cual se incluyeron 11 pacientes con LCACG-CD30+. En este trabajo no se detectaron alteraciones recurrentes. Por lo tanto, los resultados de CGH que se han comunicado hasta el momento han sido muy dispares, debido a la ausencia de estudios en series amplias de pacientes.

Recientemente, se han realizado tres trabajos en los que se ha estudiado el perfil genómico de este tipo de linfomas mediante las técnicas de arrayCGH. En el primero de ellos, realizado por el grupo holandés (van Kester *et al.* 2010), se analizaron 11 pacientes y observaron que las alteraciones más frecuentemente observadas en este tipo de linfomas eran las pérdidas en 6q16q21 y 13q34, y las ganancias en 7q31. Posteriormente, el grupo francés (Laharanne *et al.* 2010a) estudió 18 pacientes con LCACG-CD30+ y aunque algunas de las alteraciones eran similares a las encontradas por van Kester *et al.* como las pérdidas que afectaban a los cromosomas 6q y 13q, se observaron discrepancias no sólo en las alteraciones halladas sino también en la

frecuencia de las mismas. Finalmente, en el trabajo realizado por nuestro grupo, (Sanchez-Schmidt *et al.* 2011) en el cual se incluyeron 19 pacientes, se observaron como anomalías recurrentes las pérdidas de las regiones 13q34 y 16q22.1. Sin embargo no se observó afectación del cromosoma 7 tal y como había observado previamente por van Kester *et al.* Los resultados hallados en estos tres trabajos así como las regiones concretas afectadas se detallan en la Tabla 14.

Tabla 14. Resumen de los resultados de las series de LCACG-CD30+ analizadas mediante las técnicas de arrays genómicos

Publicación	n	Técnica aplicada	Alteraciones recurrentes
Van Kester <i>et al.</i> J Invest Dermatol, 2009	11	BACarrayCGH	Ganancias: 7q31, 1p36.2, 7q21, 7q32q34, 7q34, 17q12q21, 21q22 Pérdidas: 6q16q21, 13q34, 6q25q27, 8p22p21, 13q12q14
Laharanne <i>et al.</i> J Invest Dermatol, 2010	18	OligoarrayCGH	Ganancias: 7q21q31 Pérdidas: 7p11.1p11.2, 8p23, 13q34, 16p11.2p11.1, 6q27, 1p36.3 y 20p11.1q11.2
Sánchez-Schmidt <i>et al.</i> J Invest Dermatol, 2011	19	OligoarrayCGH	Ganancias: 16p13.3pter, 1p36.32pter, 1p36.31 Pérdidas: 16q12.1, 16q22.1, 16q24.3, 16q11.2, 16q21, 16q22.1, 16q24.3, 13q33.3, 13q14.3, 13q21.32, 16q13.13, 16q13.12, 17p13.1, 20q13.3

Por lo tanto, a diferencia de la MFt y el SS, los LCACG-CD30+ muestran un patrón genético heterogéneo con numerosas discrepancias entre las distintas series publicadas (van Kester *et al.* 2010; Laharanne *et al.* 2010a; Sanchez-Schmidt *et al.* 2011). Otro dato de interés es que las alteraciones más frecuentemente observadas en dichos trabajos no coinciden con las encontradas para la MFt y el SS, lo que parece una consecuencia lógica de las diferencias clínicas, histológicas y evolutivas entre dichas entidades.

Conclusiones

1. La técnica de oligoarrayCGH ha permitido definir el perfil de ganancias y pérdidas de regiones cromosómicas en la MFt. Las alteraciones más frecuentemente observadas fueron las ganancias que afectan a los cromosomas 7q, 17q, 8q, 9q, 10p y 1q, y las pérdidas que afectan a los cromosomas 9p, 9q, 17p, 13q, 6q, 10p y 16q, por orden de frecuencia. Dichas alteraciones han sido asimismo detectadas en otras series publicadas recientemente en la literatura, lo que confirmaría la existencia de un perfil genético característico de esta entidad.
2. Las alteraciones estructurales de los loci del *TCR* no son una característica genética de los LCPCT. Sin embargo, la ausencia de alteraciones estructurales de estos loci no excluye que puedan tener una función relevante en la patogénesis de los LCPCT.
3. Se ha definido el perfil de inestabilidad genético de la MFt y se ha observado la presencia de dos grupos claramente diferenciados: uno de ellos denominado genéticamente estable, que se caracteriza por la presencia de pocas alteraciones genéticas, y un segundo grupo denominado genéticamente inestable caracterizado por la presencia de numerosos cambios genéticos. Asimismo, se ha observado una asociación significativa de la ganancia del cromosoma 7q con el perfil genéticamente inestable, lo que sugiere un importante papel patogénico en este subgrupo de MFt.

4. Se han observado alteraciones genéticas y características clínicas que se asocian a una peor supervivencia:

4.1 Respecto a las alteraciones genéticas, las pérdidas de las regiones 9p21.3 y 10q26qter, así como la ganancia de la región 8q24.21, y el hecho de pertenecer al grupo genéticamente inestable se han asociado a un pronóstico desfavorable.

4.2 Respecto a las características clínicas, la edad superior a los 60 años en el momento del diagnóstico y el hecho de presentar lesiones cutáneas en más de dos localizaciones también se han asociado a una peor supervivencia

5. Al comparar los perfiles genéticos de la MFt con los de otros LCPCT se ha observado que las MFt que presentaban infiltración en sangre periférica, presentaban alteraciones similares a las halladas en el SS en estudios previos. Estos hallazgos sugiere la existencia de una firma genética común para los SS *de novo* y los SS con una MF previa. Con respecto a los LCACG-CD30+, se confirma que ambas entidades son diferentes, no sólo en sus características clínicas sino también en sus perfiles genéticos.

Bibliografía

- Anagnostopoulos I, Hummel M, Kaudewitz P, *et al.* 1996. Low incidence of Epstein-Barr virus presence in primary cutaneous T-cell lymphoproliferations. *Br J Dermatol* 134:276-281.
- Bachelez H, Bioul L, Flageul B, *et al.* 1995. Detection of clonal T-cell receptor gamma gene rearrangements with the use of the polymerase chain reaction in cutaneous lesions of mycosis fungoides and Sezary syndrome. *Arch Dermatol* 131:1027-1031.
- Ballanger F, Bressollette C, Volteau C, *et al.* 2009. Cytomegalovirus: its potential role in the development of cutaneous T-cell lymphoma. *Exp Dermatol* 18:574-576.
- Barba G, Matteucci C, Girolomoni G, *et al.* 2008. Comparative genomic hybridization identifies 17q11.2 approximately q12 duplication as an early event in cutaneous T-cell lymphomas. *Cancer Genetics Cytogenetics* 184:48-51.
- Batista DA, Vonderheid EC, Hawkins A, *et al.* 2006. Multicolor fluorescence in situ hybridization (SKY) in mycosis fungoides and Sezary syndrome: search for recurrent chromosome abnormalities. *Genes Chromosomes Cancer* 45:383-391.
- Bekkenk MW, Geelen FA, van Voorst Vader PC, *et al.* 2000. Primary and secondary cutaneous CD30(+) lymphoproliferative disorders: a report from the Dutch Cutaneous Lymphoma Group on the long-term follow-up data of 219 patients and guidelines for diagnosis and treatment. *Blood* 95:3653-3661.
- Beljaards RC, Kaudewitz P, Berti E, *et al.* 1993. Primary cutaneous CD30-positive large cell lymphoma: definition of a new type of cutaneous lymphoma with a favorable prognosis. A European Multicenter Study of 47 patients. *Cancer* 71:2097-2104.
- Bernengo MG, Novelli M, Quaglino P, *et al.* 2001. The relevance of the CD4+ CD26-subset in the identification of circulating Sezary cells. *Br J Dermatol* 144:125-135.
- Birren BW, Tachi-iri Y, Kim UJ, *et al.* 1996. A human chromosome 22 fosmid resource: mapping and analysis of 96 clones. *Genomics* 34:97-106.
- Blaveri E, Brewer JL, Roydasgupta R, *et al.* 2005. Bladder cancer stage and outcome by array-based comparative genomic hybridization. *Clin Cancer Res* 11:7012-7022.
- Bonin S, Tothova SM, Barbazza R, *et al.* 2010. Evidence of multiple infectious agents in mycosis fungoides lesions. *Exp Mol Pathol* 89:46-50.
- Cabanillas F, Armitage J, Pugh WC, *et al.* 1995. Lymphomatoid papulosis: a T-cell dyscrasia with a propensity to transform into malignant lymphoma. *Ann Intern Med* 122:210-217.
- Caprini E, Cristofolletti C, Arcelli D, *et al.* 2009. Identification of key regions and genes important in the pathogenesis of sezary syndrome by combining genomic and expression microarrays. *Cancer Res* 69:8438-8446.

Carbone A, Bernardini L, Valenzano F, *et al.* 2008. Array-based comparative genomic hybridization in early-stage mycosis fungoides: recurrent deletion of tumor suppressor genes BCL7A, SMAC/DIABLO, and RHOV. *Genes Chromosomes Cancer* 47:1067-1075.

Cherny S, Mraz S, Su L, *et al.* 2001. Heteroduplex analysis of T-cell receptor gamma gene rearrangement as an adjuvant diagnostic tool in skin biopsies for erythroderma. *J Cutan Pathol* 28:351-355.

Conde L, Montaner D, Burguet-Castell J, *et al.* 2007 ISACGH: a web-based environment for the analysis of Array CGH and gene expression which includes functional profiling. *Nucleic Acids Res.* 35(Web Server issue):W81-85.

Cordel N, Lenormand B, Courville P, *et al.* 2005. Usefulness of cutaneous T-cell clonality analysis for the diagnosis of cutaneous T-cell lymphoma in patients with erythroderma. *Arch Pathol Lab Med* 129:372-376.

Criscione VD and Weinstock MA. 2007. Incidence of cutaneous T-cell lymphoma in the United States, 1973-2002. *Arch Dermatol* 143:854-859.

Curco N, Servitje O, Lluçia M, *et al.* 1997. Genotypic analysis of cutaneous T-cell lymphoma: a comparative study of Southern blot analysis with polymerase chain reaction amplification of the T-cell receptor-gamma gene. *Br J Dermatol* 137:673-679.

Dalla-Favera R, Bregni M, Erikson J, *et al.* 1982. Human c-myc onc gene is located on the region of chromosome 8 that is translocated in Burkitt lymphoma cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 79:7824-7827.

DeCoteau JF, Butmarc JR, Kinney MC, *et al.* 1996. The t(2;5) chromosomal translocation is not a common feature of primary cutaneous CD30+ lymphoproliferative disorders: comparison with anaplastic large-cell lymphoma of nodal origin. *Blood* 87:3437-3441.

Dezfouli S, Bakke A, Huang J, *et al.* 2006. Inflammatory disease and lymphomagenesis caused by deletion of the Myc antagonist Mnt in T cells. *Mol Cell Biol* 26:2080-2092.

Diamandidou E, Cohen PR, Kurzrock R. 1996. Mycosis fungoides and Sezary syndrome. *Blood* 88:2385-2409.

Dreus R, Samel A, Kadin ME. 2000. Lymphomatoid papulosis and anaplastic large cell lymphomas of the skin. *Semin Cutan Med Surg* 19:109-117.

Dreyling MH, Roulston D, Bohlander SK, *et al.* 1998. Codeletion of CDKN2 and MTAP genes in a subset of non-Hodgkin's lymphoma may be associated with histologic transformation from low-grade to diffuse large-cell lymphoma. *Genes Chromosomes Cancer* 22:72-78.

el-Azhary RA, Gibson LE, Kurtin PJ, *et al.* 1994. Lymphomatoid papulosis: a clinical and histopathologic review of 53 cases with leukocyte immunophenotyping, DNA flow cytometry, and T-cell receptor gene rearrangement studies. *J Am Acad Dermatol* 30:210-218.

Espinet B, Salido M, Pujol RM, *et al.* 2004. Genetic characterization of Sezary's syndrome by conventional cytogenetics and cross-species color banding fluorescent in situ hybridization. *Haematologica* 89:165-173.

Feldman AL, Law M, Grogg KL, *et al.* 2008. Incidence of TCR and TCL1 gene translocations and isochromosome 7q in peripheral T-cell lymphomas using fluorescence in situ hybridization. *Am J Clin Pathol* 130:178-185.

Feldman AL, Law M, Remstein ED, *et al.* 2009. Recurrent translocations involving the IRF4 oncogene locus in peripheral T-cell lymphomas. *Leukemia* 23:574-580.

Ferenczi K, Fuhlbrigge RC, Pinkus J, *et al.* 2002. Increased CCR4 expression in cutaneous T cell lymphoma. *J Invest Dermatol* 119:1405-1410.

Ferreira BI, Alonso J, Carrillo J, *et al.* 2008a. Array CGH and gene-expression profiling reveals distinct genomic instability patterns associated with DNA repair and cell-cycle checkpoint pathways in Ewing's sarcoma. *Oncogene* 27:2084-2090.

Ferreira BI, Garcia JF, Suela J, *et al.* 2008b. Comparative genome profiling across subtypes of low-grade B-cell lymphoma identifies type-specific and common aberrations that target genes with a role in B-cell neoplasia. *Haematologica* 93:670-679.

Fink-Puches R, Zenahlik P, Back B, *et al.* 2002. Primary cutaneous lymphomas: applicability of current classification schemes (European Organization for Research and Treatment of Cancer, World Health Organization) based on clinicopathologic features observed in a large group of patients. *Blood* 99:800-805.

Fischer TC, Gellrich S, Muche JM, *et al.* 2004. Genomic aberrations and survival in cutaneous T cell lymphomas. *J Invest Dermatol* 122:579-586.

Fridlyand J, Snijders AM, Ylstra B, *et al.* 2006. Breast tumor copy number aberration phenotypes and genomic instability. *BMC Cancer* 6:96.

Gallardo F, Esteller M, Pujol RM, *et al.* 2004. Methylation status of the p15, p16 and MGMT promoter genes in primary cutaneous T-cell lymphomas. *Haematologica* 89:1401-1403.

Gerhard DS, Kawasaki ES, Bancroft FC, *et al.* 1981. Localization of a unique gene by direct hybridization in situ. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 78:3755-3759.

Gesk S, Martin-Subero JI, Harder L, *et al.* 2003. Molecular cytogenetic detection of chromosomal breakpoints in T-cell receptor gene loci. *Leukemia* 17:738-745.

Goeldel AL, Cornillet-Lefebvre P, Durlach A, *et al.* 2010. 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* 162:822-829.

Greisser J, Palmedo G, Sander C, *et al.* 2006. Detection of clonal rearrangement of T-cell receptor genes in the diagnosis of primary cutaneous CD30 lymphoproliferative disorders. *J Cutan Pathol.* 33:711-715.

Gresham D, Dunham MJ, Botstein D. 2008. Comparing whole genomes using DNA microarrays. *Nat Rev Gen* 9:291-302.

Gunnarsson R, Staaf J, Jansson M, *et al.* 2008. Screening for copy-number alterations and loss of heterozygosity in chronic lymphocytic leukemia--a comparative study of four differently designed, high resolution microarray platforms. *Genes Chromosomes Cancer* 47:697-711.

Gupta RK, Ramble J, Tong CY, *et al.* 2006. Cytomegalovirus seroprevalence is not higher in patients with mycosis fungoides/Sezary syndrome. *Blood* 107:1241-1242.

Harper ME and Saunders GF. 1981. Localization of single copy DNA sequences of G-banded human chromosomes by in situ hybridization. *Chromosoma* 83:431-439.

Harris NL, Jaffe ES, Stein H, *et al.* 1994. A revised European-American classification of lymphoid neoplasms: a proposal from the International Lymphoma Study Group. *Blood* 84:1361-1392.

Harwix S, Gunzl HJ, Blaschke V, *et al.* 2001. Inability to culture the dominant T-cell clone from the skin of primary cutaneous T-cell lymphoma as proven by TCR gamma-chain gene sequencing. *Arch Dermatol Res* 293:139-146.

Herne KL, Talpur R, Breuer-McHam J, *et al.* 2003. Cytomegalovirus seropositivity is significantly associated with mycosis fungoides and Sezary syndrome. *Blood* 101:2132-2136.

Jones KW. 1970. Chromosomal and nuclear location of mouse satellite DNA in individual cells. *Nature* 225:912-915.

Kadariya Y, Yin B, Tang B, *et al.* 2009. Mice heterozygous for germ-line mutations in methylthioadenosine phosphorylase (MTAP) die prematurely of T-cell lymphoma. *Cancer research* 69:5961-5969.

Kadin ME. 1991. Lymphomatoid papulosis, Ki-1+ lymphoma, and primary cutaneous Hodgkin's disease. *Seminars in dermatology* 10:164-171.

Kakinuma T, Sugaya M, Nakamura K, *et al.* 2003. Thymus and activation-regulated chemokine (TARC/CCL17) in mycosis fungoides: serum TARC levels reflect the disease activity of mycosis fungoides. *J Am Acad Dermatol* 48:23-30.

Kallinich T, Muche JM, Qin S, *et al.* 2003. Chemokine receptor expression on neoplastic and reactive T cells in the skin at different stages of mycosis fungoides. *J Invest Dermatol* 121:1045-1052.

Kallioniemi A, Kallioniemi OP, Sudar D, *et al.* 1992. Comparative genomic hybridization for molecular cytogenetic analysis of solid tumors. *Science* 258:818-821.

Kaltoft K, Hansen BH, Thestrup-Pedersen K. 1994. Cytogenetic findings in cell lines from cutaneous T-cell lymphoma. *Dermatol Clin* 12:295-304.

Karenko L, Hahtola S, Paivinen S, *et al.* 2005. Primary cutaneous T-cell lymphomas show a deletion or translocation affecting NAV3, the human UNC-53 homologue. *Cancer Res* 65:8101-8110.

Karenko L, Hyytinen E, Sarna S, *et al.* 1997. Chromosomal abnormalities in cutaneous T-cell lymphoma and in its premalignant conditions as detected by G-banding and interphase cytogenetic methods. *J Invest Dermatol* 108:22-29.

Karenko L, Kahkonen M, Hyytinen ER, *et al.* 1999. Notable losses at specific regions of chromosomes 10q and 13q in the Sezary syndrome detected by comparative genomic hybridization. *J Invest Dermatol* 112:392-395.

Kempf W and Sander CA. 2010. Classification of cutaneous lymphomas - an update. *Histopathology* 56:57-70.

Kim EJ, Hess S, Richardson SK, *et al.* Immunopathogenesis and therapy of cutaneous T cell lymphoma. *J Clin Invest* 115:798-812.

Klapproth K and Wirth T. 2010. Advances in the understanding of MYC-induced lymphomagenesis. *BrJ Haematol* 149:484-497.

Koch SE, Zackheim HS, Williams ML, *et al.* 1987. Mycosis fungoides beginning in childhood and adolescence. *J Am Acad Dermatol* 17:563-570.

Kuzel TM, Roenigk HH, Jr, Rosen ST. 1991. Mycosis fungoides and the Sezary syndrome: a review of pathogenesis, diagnosis, and therapy. *J Clin Oncol* 9:1298-1313.

Laharanne E, Oumouhou N, Bonnet F, *et al.* 2010a. Genome-wide analysis of cutaneous T-cell lymphomas identifies three clinically relevant classes. *J Invest Dermatol* 130:1707-1718.

Laharanne E, Chevret E, Idrissi Y, *et al.* 2010b. CDKN2A-CDKN2B deletion defines an aggressive subset of cutaneous T-cell lymphoma. *Mod Pathol* 23:547-558.

Lengauer C, Kinzler KW, Vogelstein B. 1998. Genetic instabilities in human cancers. *Nature* 396:643-649.

Liehr T, Weise A, Heller A, *et al.* 2002. Multicolor chromosome banding (MCB) with YAC/BAC-based probes and region-specific microdissection DNA libraries. *Cytogenet Genome Res* 97:43-50.

Limon J, Nedoszytko B, Brozek I, *et al.* 1995. Chromosome aberrations, spontaneous SCE, and growth kinetics in PHA-stimulated lymphocytes of five cases with Sezary syndrome. *Cancer Genetics Cytogenetics* 83:75-81.

Lu D, Duvic M, Medeiros LJ, *et al.* 2001. The T-cell chemokine receptor CXCR3 is expressed highly in low-grade mycosis fungoides. *Am J Clin Pathol* 115:413-421.

Manca N, Piacentini E, Gelmi M, *et al.* 1994. Persistence of human T cell lymphotropic virus type 1 (HTLV-1) sequences in peripheral blood mononuclear cells from patients with mycosis fungoides. *J Exp Med* 180:1973-1978.

Mao X, Lillington D, Scarisbrick JJ, *et al.* 2002. Molecular cytogenetic analysis of cutaneous T-cell lymphomas: identification of common genetic alterations in Sezary syndrome and mycosis fungoides. *Br J Dermatol* 147:464-475.

Mao X, Orchard G, Lillington DM, *et al.* 2003a. Amplification and overexpression of JUNB is associated with primary cutaneous T-cell lymphomas. *Blood* 101:1513-1519.

Mao X, Lillington DM, Czepulkowski B, *et al.* 2003b. Molecular cytogenetic characterization of Sezary syndrome. *Genes Chromosomes Cancer* 36:250-260.

Mao X, Orchard G, Lillington DM, *et al.* 2003c. Genetic alterations in primary cutaneous CD30+ anaplastic large cell lymphoma. *Genes Chromosomes Cancer* 37:176-185.

Marce S, Balague O, Colomo L, *et al.* 2006. Lack of methylthioadenosine phosphorylase expression in mantle cell lymphoma is associated with shorter survival: implications for a potential targeted therapy. *Clin Cancer Res* 12:3754-3761.

Mark HF, Wyandt H, Huang XL, *et al.* 2005. Delineation of a supernumerary marker chromosome utilizing a multimodal approach of G-banding, fluorescent in situ hybridization, confirmatory P1 artificial chromosome fluorescent in situ hybridization, and high-resolution comparative genomic hybridization. *Clin Genet* 68:146-151.

Marty M, Prochazkova M, Laharanne E, *et al.* 2008. Primary cutaneous T-cell lymphomas do not show specific NAV3 gene deletion or translocation. *J Invest Dermatol* 128:2458-2466.

Massone C, Crisman G, Kerl H, *et al.* 2008. The prognosis of early mycosis fungoides is not influenced by phenotype and T-cell clonality. *Br J Dermatol* 159:881-886.

Meyer N, Kim SS, Penn LZ. 2006. The Oscar-worthy role of Myc in apoptosis. *Sem Cancer Biol* 16:275-287.

Mirebeau D, Acquaviva C, Suciú S, *et al.* 2006. The prognostic significance of CDKN2A, CDKN2B and MTAP inactivation in B-lineage acute lymphoblastic leukemia of childhood. Results of the EORTC studies 58881 and 58951. *Haematologica* 91:881-885.

Morales-Suarez-Varela MM, Olsen J, Johansen P, *et al.* 2004. Occupational risk factors for mycosis fungoides: a European multicenter case-control study. *J Occup Environ Med.* 46:205-211.

Morales-Suarez-Varela MM, Olsen J, Johansen P, *et al.* 2006. Occupational sun exposure and mycosis fungoides: a European multicenter case-control study. *J Occup Environ Med.* 48:390-393.

Natkunam Y, Warnke RA, Haghighi B, *et al.* 2000. Co-expression of CD56 and CD30 in lymphomas with primary presentation in the skin: clinicopathologic, immunohistochemical and molecular analyses of seven cases. *J Cutan Pathol* 27:392-399.

Navas IC, Algara P, Mateo M, *et al.* 2002. p16(INK4a) is selectively silenced in the tumoral progression of mycosis fungoides. *Lab Invest* 82:123-132.

Navas IC, Ortiz-Romero PL, Villuendas R, *et al.* 2000. p16(INK4a) gene alterations are frequent in lesions of mycosis fungoides. *Am J Pathol* 156:1565-1572.

Neri A, Fracchiolla NS, Roscetti E, *et al.* 1995. Molecular analysis of cutaneous B- and T-cell lymphomas. *Blood* 86:3160-3172.

Nobori T, Takabayashi K, Tran P, *et al.* 1996. Genomic cloning of methylthioadenosine phosphorylase: a purine metabolic enzyme deficient in multiple different cancers. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:6203-6208.

Novelli M, Merlino C, Ponti R, *et al.* 2009. Epstein-Barr virus in cutaneous T-cell lymphomas: evaluation of the viral presence and significance in skin and peripheral blood. *J Invest Dermatol* 129:1556-1561.

Olsen E, Vonderheid E, Pimpinelli N, *et al.* 2007. 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* 110:1713-1722.

Ott G, Katzenberger T, Siebert R, *et al.* 1998. Chromosomal abnormalities in nodal and extranodal CD30+ anaplastic large cell lymphomas: infrequent detection of the t(2;5) in extranodal lymphomas. *Genes Chromosomes Cancer* 22:114-121.

Padilla-Nash HM, Wu K, Just H, *et al.* 2007. Spectral karyotyping demonstrates genetically unstable skin-homing T lymphocytes in cutaneous T-cell lymphoma. *Exp Dermatol* 16:98-103.

Pancake BA, Zucker-Franklin D, Coutavas EE. 1995. The cutaneous T cell lymphoma, mycosis fungoides, is a human T cell lymphotropic virus-associated disease. A study of 50 patients. *J Clin Invest* 95:547-554.

Pardue ML and Gall JG. 1969. Molecular hybridization of radioactive DNA to the DNA of cytological preparations. *Proc Natl Acad Sci U S A* 64:600-604.

Peters K, Knoll JH, Kadin ME. 1995. Cytogenetic findings in regressing skin lesions of lymphomatoid papulosis. *Cancer Genetics Cytogenetics* 80:13-16.

Pham-Ledard A, Prochazkova-Carlotti M, Laharanne E, *et al.* 2010. IRF4 gene rearrangements define a subgroup of CD30-positive cutaneous T-cell lymphoma: a study of 54 cases. *J Invest Dermatol* 130:816-825.

Pinkel D, Segraves R, Sudar D, *et al.* 1998. High resolution analysis of DNA copy number variation using comparative genomic hybridization to microarrays. *Nat Genet* 20:207-211.

Ponti R, Quaglino P, Novelli M, *et al.* 2005. T-cell receptor gamma gene rearrangement by multiplex polymerase chain reaction/heteroduplex analysis in patients with cutaneous T-cell lymphoma (mycosis fungoides/Sezary syndrome) and benign inflammatory disease: correlation with clinical, histological and immunophenotypical findings. *Br J Dermatol* 153:565-573.

Prochazkova M, Chevret E, Beylot-Barry M, *et al.* 2003. Chromosomal imbalances: a hallmark of tumour relapse in primary cutaneous CD30+ T-cell lymphoma. *J Pathol* 201:421-429.

Prochazkova M, Chevret E, Mainhaguet G, *et al.* 2007. Common chromosomal abnormalities in mycosis fungoides transformation. *Genes Chromosomes Cancer* 46:828-838.

Ranki A, Niemi KM, Nieminen P, *et al.* 1990. Antibodies against retroviral core proteins in relation to disease outcome in patients with mycosis fungoides. *Arch Dermatol Res* 282:532-538.

Sanchez-Schmidt JM, Salgado R, Servitje O, *et al.* 2011. Primary cutaneous CD30+ anaplastic large-cell lymphomas show a heterogeneous genomic profile: an oligonucleotide arrayCGH approach. *J Invest Dermatol* 131:269-271.

Scarlsbrick JJ. 2006. Staging and management of cutaneous T-cell lymphoma. *Clin Exp Dermatol* 31:181-186.

Scarlsbrick JJ, Woolford AJ, Russell-Jones R, *et al.* 2001. Allelotyping in mycosis fungoides and Sezary syndrome: common regions of allelic loss identified on 9p, 10q, and 17p. *J Invest Dermatol* 117:663-670.

Scarlsbrick JJ, Woolford AJ, Russell-Jones R, *et al.* 2000. Loss of heterozygosity on 10q and microsatellite instability in advanced stages of primary cutaneous T-cell lymphoma and possible association with homozygous deletion of PTEN. *Blood* 95:2937-2942.

Shimakage M, Sasagawa T, Kawahara K, *et al.* 2001. Expression of Epstein-Barr virus in cutaneous T-cell lymphoma including mycosis fungoides. *Int J Cancer* 92:226-231.

Sole F, Woessner S, Vallespi T, *et al.* 1995. Cytogenetic abnormalities in seven patients with the Sezary syndrome]. *Sangre* 40:431-433.

Solinas-Toldo S, Lampel S, Stilgenbauer S, *et al.* 1997. Matrix-based comparative genomic hybridization: biochips to screen for genomic imbalances. *Genes Chromosomes Cancer* 20:399-407.

Speicher MR and Carter NP. 2005. The new cytogenetics: blurring the boundaries with molecular biology. *Nat Rev Genet* 6:782-792.

Subhi AL, Tang B, Balsara BR, *et al.* 2004. Loss of methylthioadenosine phosphorylase and elevated ornithine decarboxylase is common in pancreatic cancer. *Clin Cancer Res* 10:7290-7296.

Swerdlow SH and International Agency for Research on Cancer. 2008. WHO Classification of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues. 4th edn. Lyon: International Agency for Research on Cancer.

Tamaska J, Adam E, Kozma A, *et al.* 2006. Hepatosplenic gammadelta T-cell lymphoma with ring chromosome 7, an isochromosome 7q equivalent clonal chromosomal aberration. *Virchows Arch* 449:479-483.

Thangavelu M, Finn WG, Yelavarthi KK, *et al.* 1997. Recurring structural chromosome abnormalities in peripheral blood lymphocytes of patients with mycosis fungoides/Sezary syndrome. *Blood* 89:3371-3377.

Tothova SM, Bonin S, Trevisan G, *et al.* 2006. Mycosis fungoides: is it a *Borrelia burgdorferi*-associated disease? *Br J Cancer* 94:879-883.

Tsuboi K, Iida S, Inagaki H, *et al.* 2000. MUM1/IRF4 expression as a frequent event in mature lymphoid malignancies. *Leukemia* 14:449-456.

Tsuchiya D, Matsumoto A, Covert SF, *et al.* 2002. Physical mapping of plasmid and cosmid clones in filamentous fungi by fiber-FISH. *Fungal Genet Biol* 37:22-28.

van Doorn R, van Kester MS, Dijkman R, *et al.* 2009. Oncogenomic analysis of mycosis fungoides reveals major differences with Sezary syndrome. *Blood* 113:127-136.

van Doorn R, Zoutman WH, Dijkman R, *et al.* 2005. Epigenetic profiling of cutaneous T-cell lymphoma: promoter hypermethylation of multiple tumor suppressor genes including BCL7a, PTPRG, and p73. *J Clin Oncol* 23:3886-3896.

van Kester MS, Tensen CP, Vermeer MH, *et al.* 2010. Cutaneous anaplastic large cell lymphoma and peripheral T-cell lymphoma NOS show distinct chromosomal alterations and differential expression of chemokine receptors and apoptosis regulators. *J Invest Dermatol* 130:563-575.

Vermeer MH, van Doorn R, Dijkman R, *et al.* 2008. Novel and highly recurrent chromosomal alterations in Sezary syndrome. *Cancer Res* 68:2689-2698.

Vita M and Henriksson M. 2006. The Myc oncoprotein as a therapeutic target for human cancer. *Semin Cancer Biol* 16:318-330.

von Deimling F, Scharf JM, Liehr T, *et al.* 1999. Human and mouse RAD17 genes: identification, localization, genomic structure and histological expression pattern in normal testis and seminoma. *Hum Genet* 105:17-27.

Wada DA, Law ME, Hsi ED, *et al.* 2011. Specificity of IRF4 translocations for primary cutaneous anaplastic large cell lymphoma: a multicenter study of 204 skin biopsies. *Mod Pathol* 24:596-605.

Wain EM, Mitchell TJ, Russell-Jones R, *et al.* 2005. Fine mapping of chromosome 10q deletions in mycosis fungoides and sezary syndrome: identification of two discrete regions of deletion at 10q23.33-24.1 and 10q24.33-25.1. *Genes Chromosomes Cancer* 42:184-192.

Weinstock MA and Gardstein B. 1999. Twenty-year trends in the reported incidence of mycosis fungoides and associated mortality. *Am J Public Health* 89:1240-1244.

Willemze R. 1995. New concepts in the classification of cutaneous lymphomas. *Arch Dermatol* 131:1077-1080.

Willemze R, Jaffe ES, Burg G, *et al.* 2005. WHO-EORTC classification for cutaneous lymphomas. *Blood* 105:3768-3785.

Wlodarska I, Martin-Garcia N, Achten R, *et al.* 2002. Fluorescence in situ hybridization study of chromosome 7 aberrations in hepatosplenic T-cell lymphoma: isochromosome 7q as a common abnormality accumulating in forms with features of cytologic progression. *Genes Chromosomes Cancer* 33:243-251.

Wood GS, Hong SR, Sasaki DT, *et al.* 1990. Leu-8/CD7 antigen expression by CD3+ T cells: comparative analysis of skin and blood in mycosis fungoides/Sezary syndrome relative to normal blood values. *J Am Acad of Dermatol* 22:602-607.

Worsham MJ, Chen KM, Tiwari N, *et al.* 2006. Fine-mapping loss of gene architecture at the CDKN2B (p15INK4b), CDKN2A (p14ARF, p16INK4a), and MTAP genes in head and neck squamous cell carcinoma. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 132:409-415.

Zettl A, Rudiger T, Konrad MA, *et al.* 2004. Genomic profiling of peripheral T-cell lymphoma, unspecified, and anaplastic large T-cell lymphoma delineates novel recurrent chromosomal alterations. *Am J Pathol* 164:1837-1848.

Zhao LY, Niu Y, Santiago A, *et al.* 2006. An EBF3-mediated transcriptional program that induces cell cycle arrest and apoptosis. *Cancer Res* 66:9445-9452.

Anexo: Publicaciones

1. PUBLICACIONES RELACIONADAS CON LA TESIS DOCTORAL

Las publicaciones a las que ha dado lugar la presente tesis doctoral se detallan a continuación:

Autores (por orden de firma): **Salgado R**, Servitje O, Gallardo F, Vermeer MH, Ortiz-Romero PL, Karpova MB, Zipser MC, Muniesa C, García-Muret MP, Estrach T, Salido M, Sánchez-Schmidt J, Herrera M, Romagosa V, Suela J, Ferreira BI, Cigudosa JC, Barranco C, Serrano S, Dummer R, Tensen CP, Solé F, Pujol RM, Espinet B.

Título: Oligonucleotide array-CGH identifies genomic subgroups and prognostic markers for tumor stage mycosis fungoides.

Revista: J Invest Dermatol 2010; 130(4):1126-35.

Autores (por orden de firma): **Salgado R**, Gallardo F, Servitje O, Estrach T, García-Muret MP, Romagosa V, Florensa L, Serrano S, Salido M, Solé F, Pujol RM, Espinet B.

Título: Absence of TCR loci chromosomal translocations in cutaneous T-cell lymphomas.

Revista: Cancer Genetics (Aceptado).

Oligonucleotide Array-CGH Identifies Genomic Subgroups and Prognostic Markers for Tumor Stage Mycosis Fungoides

Rocío Salgado^{1,2,3}, Octavio Servitje⁴, Fernando Gallardo⁵, Maarten H. Vermeer⁶, Pablo L. Ortiz-Romero⁷, Maria B. Karpova⁸, Marie C. Zipser⁸, Cristina Muniesa⁹, María P. García-Muret¹⁰, Teresa Estrach¹¹, Marta Salido^{1,3}, Júlia Sánchez-Schmidt⁵, Marta Herrera⁷, Vicenç Romagosa¹², Javier Suela¹³, Bibiana I. Ferreira¹⁴, Juan C. Cigudosa¹⁴, Carlos Barranco¹, Sergio Serrano¹, Reinhard Dummer⁸, Cornelis P. Tensen⁶, Francesc Solé^{1,3}, Ramon M. Pujol⁵ and Blanca Espinet^{1,3}

Mycosis fungoide (MF) patients who develop tumors or extracutaneous involvement usually have a poor prognosis with no curative therapy available so far. In the present European Organization for Research and Treatment of Cancer (EORTC) multicenter study, the genomic profile of 41 skin biopsies from tumor stage MF (MfT) was analyzed using a high-resolution oligo-array comparative genomic hybridization platform. Seventy-six percent of cases showed genomic aberrations. The most common imbalances were gains of 7q33.3q35 followed by 17q21.1, 8q24.21, 9q34qter, and 10p14 and losses of 9p21.3 followed by 9q31.2, 17p13.1, 13q14.11, 6q21.3, 10p11.22, 16q23.2, and 16q24.3. Three specific chromosomal regions, 9p21.3, 8q24.21, and 10q26qter, were defined as prognostic markers showing a significant correlation with overall survival (OS) ($P=0.042$, 0.017 , and 0.022 , respectively). Moreover, we have established two MfT genomic subgroups distinguishing a stable group (0–5 DNA aberrations) and an unstable group (>5 DNA aberrations), showing that the genomic unstable group had a shorter OS ($P=0.05$). We therefore conclude that specific chromosomal abnormalities, such as gains of 8q24.21 (*MYC*) and losses of 9p21.3 (*CDKN2A*, *CDKN2B*, and *MTAP*) and 10q26qter (*MGMT* and *EBF3*) may have an important role in prognosis. In addition, we describe the MfT genomic instability profile, which, to our knowledge, has not been reported earlier.

Journal of Investigative Dermatology (2010) **130**, 1126–1135; doi:10.1038/jid.2009.306; published online 17 September 2009

¹Laboratori de Citogenètica Molecular, Servei de Patologia, IMIM-Hospital del Mar, Barcelona, Spain; ²Departament de Biologia Animal, Biologia Vegetal i Ecologia, Facultat de Biociències, Universitat Autònoma de Barcelona, Bellaterra, Spain; ³Grup de Recerca Translacional en Neoplàsies Hematològiques, IMIM-Hospital del Mar, Barcelona, Spain; ⁴Servei de Dermatologia, Servei de Patologia, Hospital Universitari de Bellvitge-IDIBELL, L'Hospitalet de Llobregat, Barcelona, Spain; ⁵Servei de Dermatologia, IMIM-Hospital del Mar, Barcelona, Spain; ⁶Department of Dermatology, Leiden University Medical Center, Leiden, The Netherlands; ⁷Servicio de Dermatología, Hospital 12 de Octubre, Madrid, Spain; ⁸Department of Dermatology, University Hospital Zürich, Zürich, Switzerland; ⁹Servei de Dermatologia, Hospital de Viladecans, Barcelona, Spain; ¹⁰Servei de Dermatologia, Hospital de Sant Pau, Barcelona, Spain; ¹¹Servei de Dermatologia, Hospital Clinic-IDIBAPS, Universitat de Barcelona, Barcelona, Spain; ¹²Servei de Patologia, Hospital Universitari de Bellvitge-IDIBELL, L'Hospitalet de Llobregat, Barcelona, Spain; ¹³NIMGenetics, R&D Department, Tres Cantos, Madrid, Spain and ¹⁴Grupo de Citogenètica Molecular, Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas, Madrid, Spain

This work was performed in Barcelona, Spain.

Correspondence: Dr B Espinet, Laboratori de Citogenètica Molecular, Servei de Patologia, IMIM-Hospital del Mar, Passeig Marítim, 25–29, Barcelona 08003, Spain. E-mail: bespinet@imas.imim.es

Abbreviations: BAC, bacterial artificial chromosome; CGH, comparative genomic hybridization; DB, DNA breaks; FISH, fluorescence in situ hybridization; HD, homozygous deletion; HLA, high level amplification; MfT, tumor stage mycosis fungoides; OS, overall survival

Received 18 June 2009; revised 27 July 2009; accepted 2 August 2009; published online 17 September 2009

INTRODUCTION

Mycosis fungoides (MF) is a low-grade mature T-cell neoplasm of malignant CD4-positive helper T lymphocytes with a marked affinity for the skin, particularly the epidermis. It is the most frequent type of cutaneous T-cell lymphoma with an annual incidence close to 0.9 per 100,000 individuals in the United States (Criscione and Weinstock, 2007). MF has a long natural evolution over the years or sometimes decades and develops in a multistep process from patches to more infiltrated plaques and eventually tumors (tumor stage MFs, MfT). Although patients with patch or plaque disease normally have a long survival, those cases developing tumors or extracutaneous involvement usually have a poor prognosis with no curative therapy available so far.

To characterize the genetic profile and to identify prognostic markers for MfT, several comparative genomic hybridization (CGH) studies (Karenko *et al.*, 2003; Mao *et al.*, 2002; Mao *et al.*, 2003; Fischer *et al.*, 2004; Prochazkova *et al.*, 2007) have been reported. Although conventional CGH allows the identification of chromosomal imbalances, the identification of specific genes involved in the prognosis remains elusive because of the low resolution of this technique (5–10 Mb). In addition, most of the prognostic

markers in MF identified by different CGH studies have a limited discriminatory power because of the fact that the number of patients in this specific stage is too small. Furthermore, the different series studied are heterogeneous (Karenko *et al.*, 2002; Mao *et al.*, 2002; Mao *et al.*, 2003; Fischer *et al.*, 2004), including a mixture of patients belonging to different cutaneous lymphoma entities (MF, Sezary syndrome (SS), primary cutaneous anaplastic large cell lymphoma, and lymphomatoid papulosis), which actually have very different clinical outcomes making it very difficult to analyze the prognostic implication of the results. The development of genome-wide analysis techniques (Solinas-Toldo *et al.*, 1997; Pinkel *et al.*, 1998; Pinkel and Albertson, 2005) has allowed the characterization of more precisely several human neoplasms with the aim of providing prognostic markers and targets for directed therapeutic intervention. More recently, van Doorn *et al.* (2009) reported a bacterial artificial chromosome (BAC)arrayCGH study in which genomic differences between SS and MFt were identified. Although BACarrayCGH allows the identification of DNA copy number changes, it does not offer a straightforward and reliable detection of small alterations because of the larger-sized BAC probes. Thus, the identification of specific genes that are involved could remain a challenge (Gunnarsson *et al.*, 2008).

The aim of this study was to analyze genetic abnormalities in MFt patients using a 60-mer 44K oligonucleotide-arrayCGH platform to characterize this entity in a large series of patients. Furthermore, we evaluated whether specific genetic alterations may provide prognostic information.

RESULTS

Array CGH results and genomic instability profile

Among the 41 MF patients, 32 (78%) showed aberrant profiles by arrayCGH analysis, whereas no chromosomal

abnormalities were detected in nine cases (22%). All the alterations detected are summarized in Supplementary Table S1. Losses were more frequently observed than gains (63.3 vs 36.7%) and the mean chromosomal imbalances per case were 3.3 gains (range 0–14) and 5.7 losses (range 0–30). The most frequent alterations are presented in Table 1. Regarding chromosomal aberrations, the highest frequency of gains was detected on 7q33.3q35 followed by 17q21.1, 8q24.21, 9q34qter, and 10p14. The most frequent deletions were observed on chromosome 9p21.3 followed by 9q31.2, 17p13.1, 13q14.11, 6q21.3, 10p11.22, 16q23.2, and 16q24.3 (Table 1). Global results are summarized in Figure 1a. Interestingly, five homozygous deletions (HDs) and five high-level amplifications (HLAs) have been detected. The sizes of the aberrations mentioned and of the candidate genes mapped in these regions are given in Supplementary Table S2. Certain chromosomal abnormalities detected by arrayCGH were confirmed by fluorescence *in situ* hybridization (FISH) (patients 4, 8, and 29; Figure 1b).

In addition, data obtained by (Conde *et al.*, 2007) oligonucleotide-arrayCGH and InSilico arrayCGH software provided a global genomic profile for MFt patients that was analyzed in terms of genomic instability. This analysis has allowed the segregation of MFt patients into two major subgroups. The first subgroup, called genomically stable MFt, included 18 cases. It was characterized by a low number of changes (0–5), low presence of DNA breaks (DBs) (0 (0;3)), and the absence of HLA and HD. The second group, called genomically unstable MFt, with 23 cases, displayed a higher number of genomic abnormalities. It was characterized by a high number of changes (6–34), DBs (14 (10;21)), and the presence of HLA and HD. The multiple testing between the genomic status and the most prominent smallest overlapping region of imbalances found in MFt patients has shown a significant relation between the genomic status and the gain

Table 1. Summary of the most frequent prominent alterations in MFt patients

Type of change	Start gene	Chr	Cytoband	Size (Mb)	% Patients	Candidate genes
Gains	BG495318	7	q33.3q35	14.2	55	<i>PTN, HIPK2, BRAF, TRPV6, TRPV5, PIP, EPHA1, EZH2</i>
Gains	SMARCE1	17	q21.1	4.7	37	<i>STAT5A, STAT5B, STAT3</i>
Gains	M13930	8	q24.21	0.75	32	<i>MYC</i>
Gains	SLC2A8	9	q34	11	17	<i>NOTCH, TRAF2, CARD9</i>
Gains	chr10:004083817	10	p14	4.73	17	<i>GATA3, IL2R</i>
Gains	chr1:195487682	1	q31.2q32.2	7.7	15	<i>KIF14</i>
Losses	MTAP	9	p21.3	0.2	42	<i>MTAP, CDKN2A, CDKN2B</i>
Losses	SLC35D2	9	q31.2	3.9	30	<i>CDC14B, XPA, NR4A3</i>
Losses	DULLARD	17	p13.1	1.02	27.5	<i>TP53, TNK1</i>
Losses	chr13:047357604	13	q14.11	2.22	20	<i>RB</i>
Losses	CDC2L6	6	q21.3	1.2	17	No genes related to cancer
Losses	chr10:031132968	10	p11.22	1.5	17	<i>TCF8</i>
Losses	BQ189302	16	q23.2	6.7	17	<i>CDH13</i>
Losses	ZNF469	16	q24.3	0.78	17	No genes related to cancer

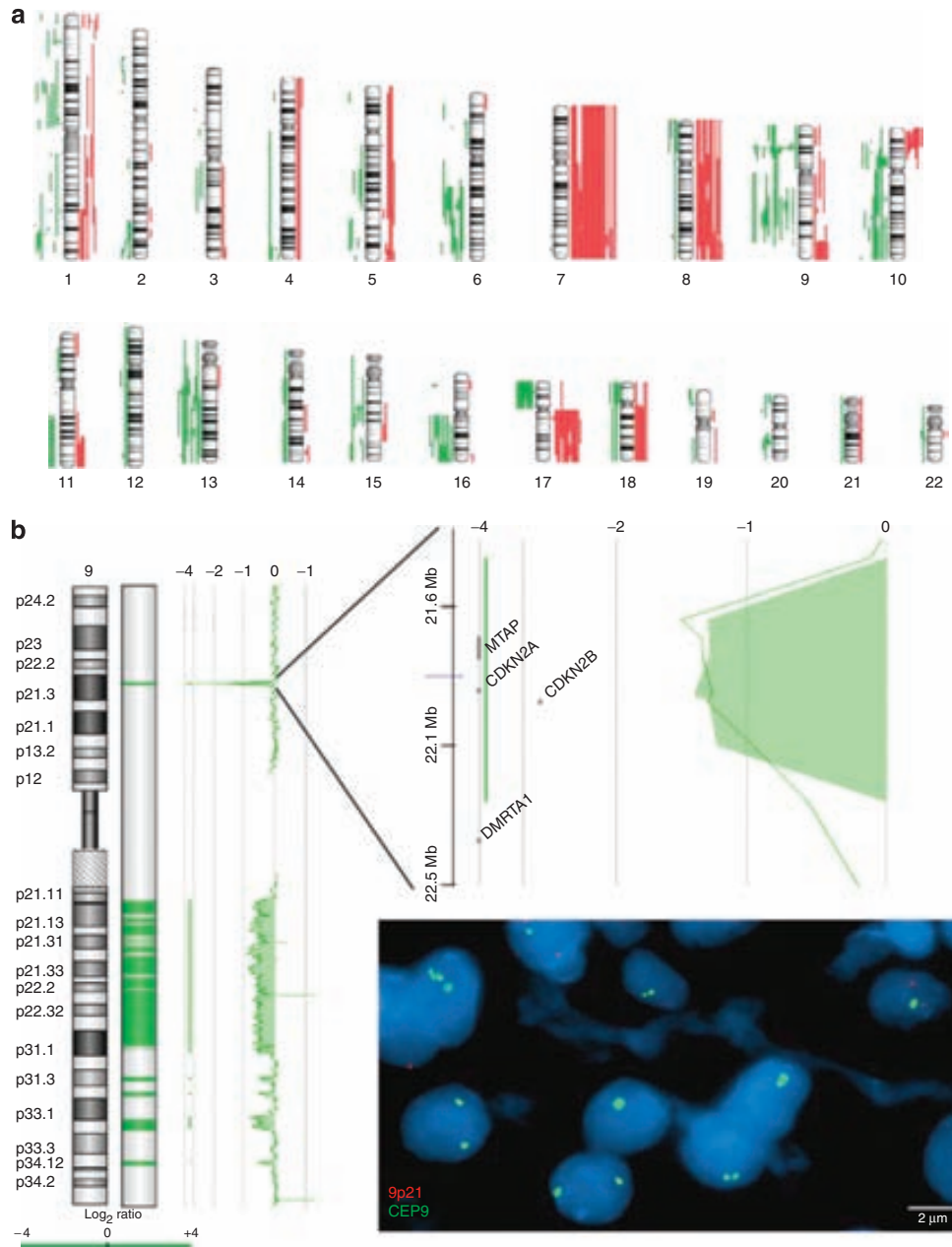


Figure 1. Oligonucleotide arrayCGH (comparative genomic hybridization) results and fluorescence *in situ* hybridization (FISH) validation. (a) ArrayCGH was applied in 41 tumor stage mycosis fungoides (MFt) frozen tissue samples and a total of 32 patients had an aberrant genomic profile. All the abnormalities found are represented in the idiogram: the red line at the right side represents gains, whereas the green line at the left side represents losses of genomic DNA. (b) Log₂ ratio values along the chromosome are represented by a green line. The vertical line around 0 corresponds to no copy number changes. Displacement of this green line to the left or right represents genomic losses or gains, respectively. To validate the arrayCGH results and to corroborate the gain and loss thresholds, the fluorescence *in situ* hybridization (FISH) technique was applied in the paraffin-embedded tissue sections of 3 patients. All FISH results were in concordance with those found earlier by arrayCGH. A homozygous deletion of 9p21.3 is shown here. Scale bar = 2 μm.

of 7q. The genomic instability profile of MFt is summarized in Figure 2. All parameters analyzed are provided in Supplementary Table S3.

Statistical analysis

The prognostic value of the genomic instability status (stable MFt vs unstable MFt), and specific altered chromosomal regions with a frequency higher than 15% of cases was analyzed. In the univariate analysis, the genomically unstable

MFt group disclosed a worse prognosis (median overall survival, OS: 88 vs 43 months; *P*=0.05). In addition, three specific chromosomal imbalances were associated with poor outcome: gains/amplifications of 8q24.21 (median OS: 89.1 vs 41 months; *P*=0.017), as well as deletions of 9p21.3 (median OS: 85.5 vs 45.7 months; *P*=0.042) and 10q26qter (median OS: 78 vs 19.7 months; *P*=0.023) (Figure 3). Besides genomic aberrations, age older than 60 (median OS: 131.54 vs 47.5 months; *P*=0.007) and multifocal

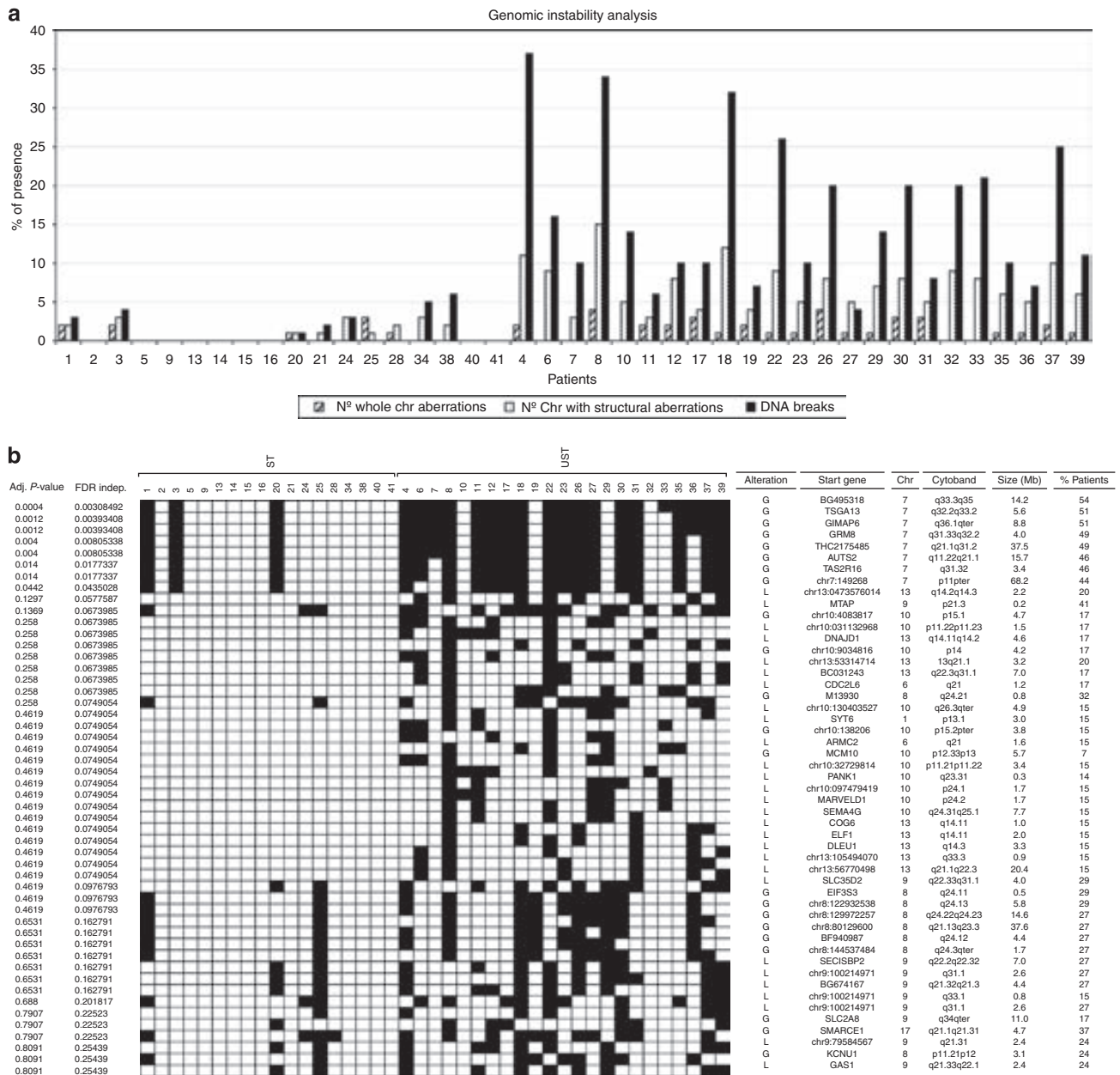


Figure 2. Genomic instability profile analysis and multiple testing. (a) The quantitative assay for genomic instability was performed considering the DNA breaks (DBs) (■), whole chromosome abnormalities (▨), and the number of DBs within a chromosome (□). It clearly distinguished between the genomic stable subgroup on the left side of the graphic and the genomic unstable subgroup on the right side, which has a higher representation for all the analyzed parameters. (b) Multiple testing was performed with Pomelo Cluster Tool 2.0 to compare the relationship between the genomic status and the smallest overlapping region of imbalances found. A significant correlation between the genomic unstable tumor stage mycosis fungoides (Mf) group and the 7q regions was observed.

localization of cutaneous lesions (>2 presentation sites) (median OS: 82.6 vs 39.2 months; $P=0.033$) were associated with shorter survival. No association between extracutaneous involvement, presence of ulceration, cell size, epidermotropism, and survival was detected. The multivariate survival analysis, taking into account the parameters considered statistically significant by the univariate analysis, did not reveal any independent prognostic factor (Table 2). This fact could arise from the low number of patients. Despite this result, it is important to mention that this study is the largest

series reported until now in MfT as it is a very infrequent disease.

DISCUSSION

We present here a DNA genomic imbalance detailed analysis of the largest series of MfT patients reported until now, including 41 patients. In addition, we describe their association with clinical data and prognosis.

Recently, van Doorn *et al.* (2009) have used a BACarrayCGH platform for the identification of genomic differences

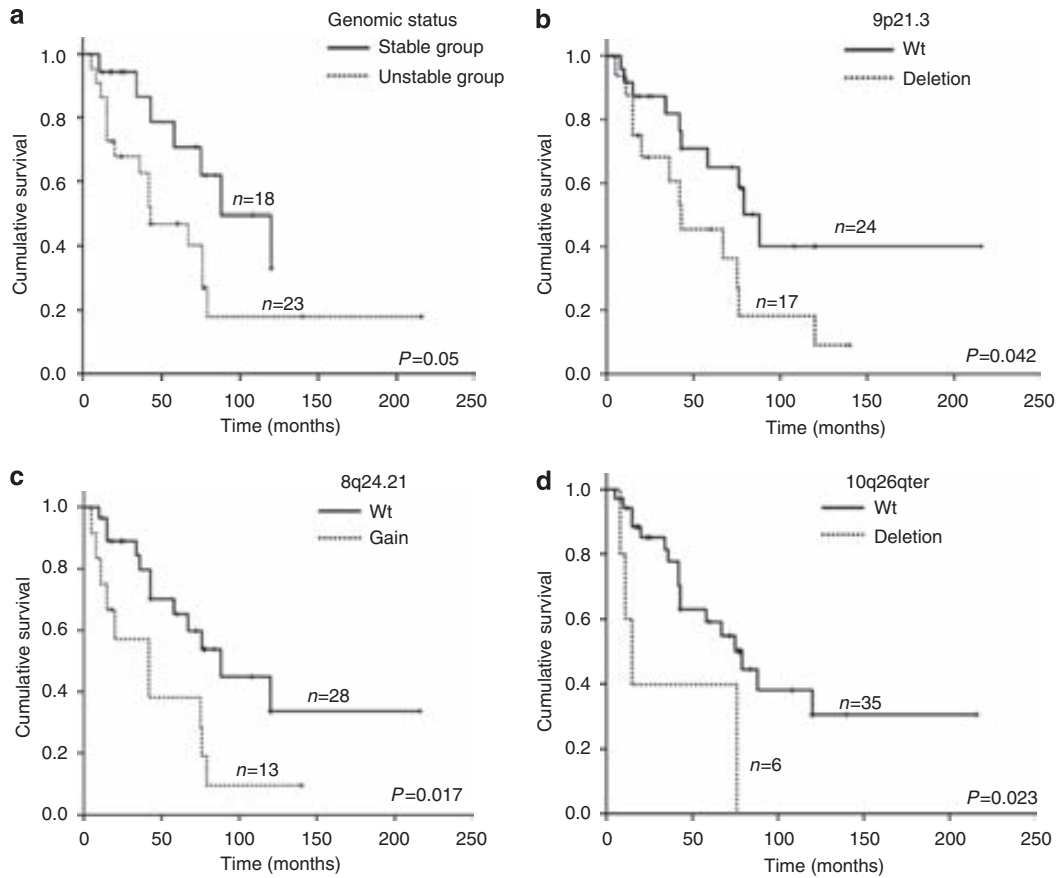


Figure 3. Impact of genomic imbalances and genomic instability groups on survival of tumor stage mycosis fungoides (MFt). A log-rank test was used to evaluate the correlation between the genomic profile and the survival of the MFt patients. (a) The Kaplan–Meier curves showed survival differences between genomic unstable MFt patients (dotted line) and genomic stable MFt patients. (b) Regarding specific lesions, a poor overall survival was observed in MFt patients with 9p21.3 deletion (dotted line), (c) gains of 8q24.21 (dotted line), and (d) 10q26qter deletion (dotted line) compared with MFt patients with no chromosomal aberrations.

Table 2. Results of the univariate and multivariate survival analysis

Variables (n=41)	Median OS (months)	Univariate analysis P-value	Multivariate analysis P-value
<i>Genetic alterations</i>			
del(9p21.3)	85 vs 46	0.04	NS
del(10q26qter)	78 vs 20	0.02	NS
+8q24.21	89 vs 41	0.02	NS
<i>Genetic status</i>			
Stable vs Unstable	88 vs 43	0.05	NS
<i>Clinicopathological parameters</i>			
Age (<60 vs ≥60 years)	131 vs 47	0.01	NS
Cutaneous localization (localized vs multifocal)	83 vs 39	0.03	NS

NS, not significant.

between SS and MFt, describing a high frequency of gains in chromosomes 1, 7, 8, and 17 and losses of chromosomes 5, 9, and 13. This study has allowed the detection of small aberrations, with the smallest abnormality reported being 1.3 Mb in size. With the genomic platform used in this study, which includes about 44,000 probes covering the whole genome at an average resolution of 75 kb, a genome-wide analysis of a large series of MFt has been performed. Ten cases from van Doorn *et al.* (2009) analysis were also analyzed with oligonucleotide-based arrayCGH to compare both platforms. The vast majority of the aberrations were detected by both BACarrays and oligonucleotide-arrays. Although the detection of gains is very similar, it is important to emphasize that we found a higher number of losses and that they were characterized by their smaller size. The combination between oligo-arrays and the InSilico arrayCGH analysis has allowed us to delineate the MFt chromosomal alterations in more detail.

In terms of chromosomal imbalances, 78% (n = 32) of our patients presented with an aberrant genomic profile. The high rate of genetically abnormal patients could be explained by the fact that all the patients have been studied at an advanced

stage and therefore the proportion of malignant T-cell lymphocytes is very high as described earlier (Mao *et al.*, 2003; Fischer *et al.*, 2004; Prochazkova *et al.*, 2007). The nine patients who did not present genomic abnormalities could present other altered genetic mechanisms, such as gene mutations, methylation, aberrant miRNA expression, or acquired uniparental disomy, which do not implicate gains or losses of DNA. Therefore, the exploration of this type of mechanism is necessary to elucidate other genetic alterations that can explain the biology of this tumor. Regarding specific alterations, losses were more frequently detected than gains (5.7 losses vs 3.3 gains), in contrast to the recent findings by Prochazkova *et al.* (2007). The analysis by Prochazkova *et al.* (2007) was performed with the conventional CGH technique (mean resolution: 5–10 Mb). With this technique, gains and losses smaller than 5 Mb were not detected. In contrast, the oligonucleotide-based array CGH platform used in this study allowed us to detect gains and losses bigger than 75–100 Kb. This could be one reason that explains the discrepancies between the most frequent gains and losses among the two studies. Moreover, the sample size analyzed in this study was bigger (41 patients vs 11 patients in Prochazkova *et al.* (2007) study). However, Prochazkova *et al.* (2007) provided additional information regarding the DNA content (mean DNA index 3.14 ± 0.38), which was not analyzed in this study.

Oligonucleotide array CGH analysis has allowed the description of MFt in the context of genomic instability. It has been suggested that failures in a number of different processes that maintain genome integrity could contribute to the wide variety of genomic alterations in solid tumors. These aberrations include the total gain or loss of whole chromosomes or parts of chromosomes, HLAs (defined as a copy number increase of a determined region of a chromosome), HDs (loss of the two copies of a specific region), and copy number transitions (number of DBs within a chromosome). Analyses of genomic instability have been reported for bladder cancer, breast tumors, neuroblastoma, B-cell lymphomas, and Ewing's tumor (Blaveri *et al.*, 2005; Fridlyand *et al.*, 2006; Ferreira *et al.*, 2008a,b). In such cases, a correlation between highly unstable genetic profile and poor prognosis has been shown. We have performed a quantitative analysis of the genomic instability in MFt patients taking into account the above mentioned parameters (Supplementary Table S3). We observed two different groups, one genomically stable MFt characterized by a low number of chromosomal abnormalities and the other genomically unstable showing a high number of chromosomal abnormalities. Moreover, the univariate survival analysis clearly showed that MF patients showing a genetic unstable pattern have a shorter survival ($P=0.05$). Therefore, the rather consistent pattern of genomic abnormalities provides reliable information to understand the genetic bases that underlie the clinical phenotypes of MFt with different survival rates.

Regarding specific abnormalities, we detected two aberrations, 9p21.3 deletion and 8q24.21 gain, that correlate with poor prognosis, in agreement with recently published data in MFt patients (van Doorn *et al.*, 2009). Our findings confirm such results in a large series of patients and suggest the

important implication of these two regions in the pathogenesis of MFt patients. Regarding 9p21.3 deletion, we have delineated a minimal region of only 200 kb comprising only three genes *CDKN2A*, *CDKN2B*, and *MTAP*. Unlike the BACarray platform used by van Doorn *et al.* (2009) who detected two contiguous 9p21-deleted regions of 2 Mb in size, the oligo-array CGH technology has allowed the definition in more detail of the 9p region and the genes enclosed in these loci. Among these three genes, *CDKN2A* and *CDKN2B* have been largely studied in MF. The most frequent alteration has been the hypermethylation, but not mutation, of loss of heterozygosity (Navas *et al.*, 2000, 2002). In this study, we have also observed a high frequency of HD, not observed until now. On the other hand, the *MTAP* gene has also been described as an important tumor suppressor gene in several cancers (Nobori *et al.*, 1996; Dreyling *et al.*, 1998; Christopher *et al.*, 2002; Subhi *et al.*, 2004; Marcé *et al.*, 2006; Worsham *et al.*, 2006; Mirebeau *et al.*, 2006) and is an essential enzyme for normal activity of the adenine and methionine synthesis. The loss of this gene is thought to be incidental because of its proximity to *CDKN2A* and *CDKN2B*. However, cells that lack *MTAP* depend on *de novo* AMP synthesis and exogenous methionine supply, and are expected to be sensitive to inhibitors of purine synthesis or methionine starvation. A better understanding of the contribution of the *MTAP* gene in all stages of MF could provide an impetus for exploration of these targets as therapeutic biomarkers in MF.

Regarding chromosome 8, partial or complete gains on 8q have been observed in earlier studies in patients with MFt and SS (Prochazkova *et al.*, 2007; Vermeer *et al.*, 2008; van Doorn *et al.*, 2009). In our study, we detected a high number of patients with altered chromosome 8 and delineated a minimal common region, 8q24.21, in 31.4% (13/41) in concordance with recent reports (van Doorn *et al.*, 2009). In addition, two patients presented with an HLA of this location involving the *MYC* oncogene. *MYC* is generally recognized as an important regulator of proliferation, growth, differentiation, and apoptosis (Meyer *et al.*, 2006; Vita and Henriksson, 2006). Interestingly, we have observed in our series a strong correlation of this abnormality with a poor outcome of patients ($P=0.017$). The recent finding of gain of *MYC* in SS (Vermeer *et al.*, 2008) and MFt (van Doorn *et al.*, 2009) and the correlation with survival could suggest an important involvement of *MYC* in the progression of a subset of MFt patients.

Abnormalities of chromosome 10 have been described earlier in MFt and SS detected by G-banding cytogenetic studies, conventional CGH, and microsatellite markers (Limon *et al.*, 1995; Karenko *et al.*, 1997, 1999; Scarisbrick *et al.*, 2000, 2001; Mao *et al.*, 2002, 2003; Espinet *et al.*, 2004; Fischer *et al.*, 2004; Wain *et al.*, 2005; Prochazkova *et al.*, 2007). We have detected 10q26qter deletion, a minimal common region, which is to our knowledge not reported earlier. This anomaly of only 0.7 Mb in size harbors a total of 31 genes. Among them, it is important to mention the presence of two tumor suppressor genes: *MGMT* and *EBF3*. Concerning the *MGMT* gene, its methylation status has been studied earlier in cutaneous T-cell lymphoma (Gallardo

et al., 2004; Van Doorn et al., 2005). However, the presence of methylation in healthy control T-cell lymphocytes led to the preclusion of its use as a marker of malignancy. On the other hand, the recent description of *EBF3* as a tumor suppressor gene that induces cell cycle arrest and apoptosis (Zhao et al., 2006) led to suggest the implication of this gene in the pathogenesis of MFt patients. Our analysis has shown a strong correlation between disease progression and deletion of this region ($P=0.021$). Thus, the genes included in 10q26qter should be studied to understand their pathogenic role in MFt patients.

Regarding chromosome 12, an interesting region is 12q21 where *NAV3* is localized. *NAV3* deletions and translocations were described as frequent genetic anomalies in MF and SS (Karenko et al., 2005). In our study, only one patient presented with a deletion of this region because of the loss of the long arm of chromosome 12. Therefore, our results are in concordance with Marty et al. (2009) who recently described that *NAV3* deletions and translocations are rare events in cutaneous T-cell lymphoma. Moreover, a high frequency of 12q24.31 deletions (involving *BCL7a*, *SMAC/DIABLO*, and *RHOF* genes) has been reported in early stage MF patients (Carbone et al., 2008). In contrast to this report, we have detected a deletion in only one patient and the loss of the entire chromosome 12 in a second one. Therefore, the validation of this finding in a selected tumoral population of the early stage MF biopsies would be necessary to confirm this anomaly. Most probably, the pathogenic mechanism related to this region in advanced stage patients was the hypermethylation of the tumor suppressor gene *BCL7a*, as reported earlier in cutaneous T-cell lymphoma patients (Van Doorn et al., 2005), but not the deletion of this area.

Among all the alterations detected in this analysis, we have observed that some of them are very similar to SS (Vermeer et al., 2008), such as gains of 17q21.1 and 8q24.21 and losses of 17p13.1 and 10p11.2. Although we have detected these alterations in less proportion and the vast majority of alterations are quite different, it is important to remark that among the three patients who presented with blood involvement, all of them had a loss of 17p13.1 and gain of 17q21.1, and one of them presented with a loss of 10p11.22 and the another one with a gain of 8q24.21. Our findings support that Sézary syndrome patients have a different genomic profile than do MFt patients (van Doorn et al., 2009). However, the presence of similar aberrations in MFt patients who present with blood involvement seems to indicate that both pathologies have a similar origin. More studies comparing these two groups of patients (SS *de novo* vs SS with an earlier MF) will provide additional information of these entities.

In summary, oligonucleotide-based arrayCGH analyses have clearly shown a high frequency of genetic imbalances and chromosomal abnormalities, not reported earlier to our knowledge in MFt, which provide a strictly genomic characterization of this entity. Moreover, we report the genomic profile of MFt patients in terms of genetic instability, which is to our knowledge not reported earlier, categorizing the patients into two MFt genomic subgroups: a stable group

(0–5 DNA aberrations) and an unstable group (>5 DNA aberrations). Furthermore, the correlation of the genomic status, as well as the deletion of 9p21.3 and 10q26qter and gain of 8q24.21 with the outcome, offers the possibility of selecting these patients to precisely adjust their clinical management. The detection of these alterations with routine techniques such as FISH and/or multiplex ligation-dependent probe amplification during the follow-up could be used to closely monitor this group of patients to identify particular subsets presenting a more aggressive clinical evolution. Validation of such genomic features represents a reasonable next step for the definition of biological prognostic factors enabling the design of optimized risk-adapted treatment strategies.

MATERIALS AND METHODS

Patients

A total of 41 patients collected from centers collaborating in the European Organization for Research and Treatment of Cancer (EORTC) Cutaneous Lymphoma Group were included in the study. They comprised 22 males and 19 females with a mean age of 59 years (range, 17–84 years). All patients were diagnosed according to the World Health Organization (WHO)-EORTC classification for cutaneous lymphoma criteria (Willemze et al., 2005; Olsen et al., 2007). Clinical and follow-up data are summarized in Tables 2 and 3. Ten patients were earlier studied using a BACarrayCGH platform (van Doorn et al., 2009). The approval for the study was provided by the Comitè Ètic d'Investigació Clínica from l'Institut Municipal d'Assistència Sanitària (CEIC-IMAS) and written informed consent was obtained from all patients, according to the Declaration of Helsinki Principles.

DNA extraction

To ensure the high quality of the DNA analyzed, 20 × 10 μm snap-frozen samples from tumoral MF lesions were included in the study. A hematoxylin-eosin staining of a frozen section from all cases was performed earlier to confirm the presence of at least 70% of tumor cells. DNA was isolated using a commercial kit, as described (DNeasy Blood & Tissue Kit; Qiagen, Hilden, Germany).

Array CGH

Genome-wide analysis of patient samples was conducted using the Human Genome CGH 44K microarrays (G4410B and G4426B) (Agilent Technologies, Palo Alto, CA). The hybridization process was performed according to the manufacturer's protocols. Commercial pools of healthy female DNA (Promega, Madison, WI) were used as controls. For extraction of raw data and visualization of results, Feature Extraction v.8.1 and CGH Analytics v3.2.25 softwares were used (Agilent Technologies). Data analysis and chromosome segmentation were performed with InSilico Array CGH software smoothing methods (Conde et al., 2007) included in GEPAS (<http://gepas.bioinfo.cipf.es>). This software provided a copy number value that allowed the establishment of cutoff values at 0.3 and –0.5 for considering gains and losses, respectively. For HLAs and HDs, the cutoff values were set at 0.6 and 1, respectively. Recurrent regions involved in genomic imbalances were defined as a sequence of at least five consecutive altered probes common to a set of array CGH profiles and the smallest overlapping region of imbalance as the

Table 3. Clinical characteristics of patients with tumor stage MF (Mft)

Characteristics	Mft patients
Total no. of patients	41
Age, years	
Median	63
Range	17–84
Sex	
Male	22
Female	19
Cutaneous lesions ¹	
Solitary	1
Localized	16
Multifocal	24
Not available	1
Initial therapy, no.	
SDT	24
Immunomodulators	5
Polychemotherapy	1
Combination of different treatments	10
Not available	1
Response to initial therapy, no.	
CR	10
PR	16
PD	7
Not available	6
Relapse	
Skin only	13
Systemic	3
Follow-up, months	
Median	43
Range	5–216
Status at last follow-up, no.	
No evidence of disease	3
Alive with disease	16
Died as a result of lymphoma	22

CR, complete response was defined as the clinical and histological (when possible) disappearance of all lesions; PD, progressive disease was defined as the appearance of new lesions representing 25% over pre-existing lesions, or infiltration of 25% or more of pre-existing lesions; PR, partial response was defined as a 50% or greater decrease in the number and size of pre-existing lesions; SDT, skin directed treatment.

¹Cutaneous localization: solitary, solitary skin involvement; localized, multiple lesions limited to 1 body region of 2 contiguous body regions; Multifocal, multiple lesions involving two noncontiguous body regions.

minimal common region detected in at least two patients (Rouveirol *et al.*, 2006). Genomic aberrations in known copy number polymorphisms were not considered as alterations.

Moreover, we have applied a genomic stability assay to evaluate the genetic status of this type of tumor. Total gain or loss of whole chromosomes or parts of chromosomes, HLAs (defined as a copy number increase of a determined region of a chromosome), HDs, and copy number transitions (the number of DBs within a chromosome) were quantified (Supplementary Table S3). A multiple testing tool (Pomelo Cluster; <http://pomelo.bioinfo.cnio.es>) was used to compare the genomic Mft patient status with all smallest overlapping region of imbalances found applying Fisher's test.

Fluorescence *in situ* hybridization

Fluorescence *in situ* hybridization was performed to confirm chromosomal abnormalities detected earlier by arrayCGH in those cases in which a paraffin-embedded tissue biopsy was available. The FISH probes used are summarized in Supplementary Table S4.

Statistical analysis

Overall survival was calculated as the time elapsed from the first date of diagnosis of MFs to death of the lymphoma or to last follow-up. The Kaplan–Meier method was used to estimate the distribution of OS. Differences in survival between groups were assessed using the log-rank test. Multivariate Cox proportional hazards regression was performed. The following clinical, morphological, and genetic parameters were evaluated to identify risk factors in a univariate analysis for OS: age (< 60 years against > 60 years), sex, localization of cutaneous lesions, extracutaneous involvement, response to therapy, presence of large cells, genomic instability status, and presence of recurrent genomic abnormalities (more than 15% of cases). For comparison of two groups, the Mann–Whitney *U*-test and Pearson χ^2 -test were used. Statistical computations were performed using the SPSS v.15 software (SPSS, Chicago, IL). A *P*-value of ≤ 0.05 was considered statistically significant.

CONFLICT OF INTEREST

The authors state no conflict of interest.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank M^a Jesus Artiga, Esther Villalba, and Erika Torres from Tissue Bank from IMIM-Hospital del Mar, CNIO, and Hospital Universitario de Bellvitge, respectively, for their excellent technical support and "Xarxa Temàtica de Bancs de Tumors de Catalunya". We also thank Lara Nonell for her excellent statistical support. This work has been supported by Fondo de Investigación Sanitaria, Spanish Ministry of Health Grant no. PI051827, and Red Temática de Investigación Cooperativa en Cáncer (RTICC) Grants no. RD07/0020/2004 and RD06/0020/0076 from the Spanish Ministry of Science and Innovation.

SUPPLEMENTARY MATERIAL

Supplementary material is linked to the online version of the paper at <http://www.nature.com/jid>

REFERENCES

- Blaveri E, Brewer JL, Roydasgupta R, Fridlyand J, DeVries S, Koppie T *et al.* (2005) Bladder cancer stage and outcome by array-based comparative genomic hybridization. *Clin Cancer Res* 11:7012–22
- Christopher SA, Diegelman P, Porter CW, Kruger WD (2002) Methylthioadenosine phosphorylase, a gene frequently codeleted with p16(cdkN2a/ARF), acts as a tumor suppressor in a breast cancer cell line. *Cancer Res* 62:6639–44
- Carbone A, Bernardini L, Valenzano F, Bottillo I, De Simone C, Capizzi R *et al.* (2008) Array-based comparative genomic hybridization in early

- stage mycosis fungoides: recurrent deletion of tumor suppressor genes BCL7a, SMAC/DIABLO, and RHO. *Genes Chromosomes Cancer* 47:1067–75
- Conde L, Montaner D, Burguet-Castell J, Tárraga J, Medina I, Al-Shahrour F et al. (2007) ISACGH: a web-based environment for the analysis of array CGH and gene expression which includes functional profiling. *Nucleic Acids Res* 35:W81–5
- Criscione VD, Weinstock MA (2007) Incidence of cutaneous T-cell lymphoma in the United States, 1973–2002. *Arch Dermatol* 143:854–859
- Dreyling MH, Roulston D, Bohlander SK, Vardiman J, Olopade OI (1998) Codeletion of CDKN2 and MTAP genes in a subset of non-Hodgkin's lymphoma may be associated with histologic transformation from low-grade to diffuse large-cell lymphoma. *Genes Chromosomes Cancer* 22:72–8
- Espinete B, Salido M, Pujol RM, Florensa L, Gallardo F, Domingo A et al. (2004) Genetic characterization of Sézary's syndrome by conventional cytogenetics and cross-species color banding fluorescent *in situ* hybridization. *Haematologica* 89:165–73
- Ferreira BI, Alonso J, Carrillo J, Acquadro F, Largo C, Suela J et al. (2008a) Array CGH and gene-expression profiling reveals distinct genomic instability patterns associated with DNA repair and cell-cycle checkpoint pathways in Ewing's sarcoma. *Oncogene* 27:2084–90
- Ferreira BI, García JF, Suela J, Mollejo M, Camacho FI, Carro A et al. (2008b) Comparative genome profiling across subtypes of low-grade B-cell lymphoma identifies type-specific and common aberrations that target genes with a role in B-cell neoplasia. *Haematologica* 93:670–9
- Fischer TC, Gellrich S, Muche JM, Sherev T, Audring H, Neitzel H et al. (2004) Genomic aberrations and survival in cutaneous T cell lymphomas. *J Invest Dermatol* 122:579–86
- Fridlyand J, Snijders AM, Ylstra B, Li H, Olshen A, Seagraves R et al. (2006) Breast tumor copy number aberration phenotypes and genomic instability. *BMC Cancer* 6:96
- Gallardo F, Esteller M, Pujol RM, Costa C, Estrach T, Servitje O. (2004) Methylation status of the p15, p16 and MGMT promoter genes in primary cutaneous T-cell lymphomas. *Haematologica* 89:1401–3
- Gunnarsson R, Staaf J, Jansson M, Ottesen AM, Göransson H, Liljedahl U et al. (2008) Screening for copy-number alterations and loss of heterozygosity in chronic lymphocytic leukemia—a comparative study of four differently designed, high resolution microarray platforms. *Genes Chromosomes Cancer* 47:697–711
- Karenko L, Hyytinen E, Sarna S, Ranki A (1997) Chromosomal abnormalities in cutaneous T-cell lymphoma and in its premalignant conditions as detected by G-banding and interphase cytogenetic methods. *J Invest Dermatol* 108:22–9
- Karenko L, Kähkönen M, Hyytinen ER, Lindlof M, Ranki A (1999) Notable losses at specific regions of chromosomes 10q and 13q in the Sezary syndrome detected by comparative genomic hybridization. *J Invest Dermatol* 112:392–5
- Karenko L, Hahtola S, Päivinen S, Karhu R, Syrjä S, Kähkönen M et al. (2005) Primary cutaneous T-cell lymphomas show a deletion or translocation affecting NAV3, the human UNC-53 homologue. *Cancer Res* 65:8101–10
- Karenko L, Sarna S, Kähkönen M, Ranki A (2003) Chromosomal abnormalities in relation to clinical disease in patients with cutaneous T-cell lymphoma: a 5-year follow-up study. *Br J Dermatol* 148:55–64
- Limon J, Nedoszytko B, Brozek I, Hellmann A, Zajaczek S, iński J et al. (1995) Chromosome aberrations, spontaneous SCE, and growth kinetics in PHA-stimulated lymphocytes of five cases with Sezary syndrome. *Cancer Genet Cytogenet* 83:75–81
- Mao X, Lillington D, Scarisbrick JJ, Mitchell T, Czepulkowski B, Russell-Jones R et al. (2002) Molecular cytogenetic analysis of cutaneous T-cell lymphomas: identification of common genetic alterations in Sezary syndrome and mycosis fungoides. *Br J Dermatol* 147:464–75
- Mao X, Orchard G, Lillington DM, Russell-Jones R, Young BD, Whittaker SJ. (2003) Amplification and overexpression of JUNB is associated with primary cutaneous T-cell lymphomas. *Blood* 101:1513–9
- Marcé S, Balagué O, Colomo L, Martínez A, Höller S, Villamor N et al. (2006) Lack of methylthioadenosine phosphorylase expression in mantle cell lymphoma is associated with shorter survival: implications for a potential targeted therapy. *Clin Cancer Res* 12:3754–61
- Marty M, Prochazkova M, Laharanne E, Chevret E, Longy M, Jouary T et al. (2009) Primary cutaneous T-cell lymphomas do not show specific NAV3 gene deletion or translocation. *J Invest Dermatol* 128:2458–66
- Meyer N, Kim SS, Penn LZ (2006) The Oscar-worthy role of Myc in apoptosis. *Semin Cancer Biol* 16:275–87
- Mirebeau D, Acquaviva C, Suciu S, Bertin R, Dastugue N, Robert A et al. (2006) The prognostic significance of CDKN2A, CDKN2B and MTAP inactivation in B-lineage acute lymphoblastic leukemia of childhood. Results of the EORTC studies 58881 and 58951. *Haematologica* 91:881–5
- Navas IC, Algara P, Mateo M, Martínez P, García C, Rodríguez JL et al. (2002) p16(INK4a) is selectively silenced in the tumoral progression of mycosis fungoides. *Lab Invest* 82:123–32
- Navas IC, Ortiz-Romero PL, Villuendas R, Martínez P, García C, Gómez E et al. (2000) p16(INK4a) gene alterations are frequent in lesions of mycosis fungoides. *Am J Pathol* 156:1565–72
- Nobori T, Takabayashi K, Tran P, Orvis L, Batova A, Yu AL et al. (1996) Genomic cloning of methylthioadenosine phosphorylase: a purine metabolic enzyme deficient in multiple different cancers. *Proc Natl Acad Sci USA* 93:6203–8
- Olsen E, Vonderheid E, Pimpinelli N, Willemze R, Kim Y, Knobler R et al. (2007) 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* 110:1713–22
- Pinkel D, Seagraves R, Sudar D, Clark S, Poole I, Kowbel D et al. (1998) High resolution analysis of DNA copy number variation using comparative genomic hybridization to microarrays. *Nat Genet* 20:207–11
- Pinkel D, Albertson DG (2005) Array comparative genomic hybridization and its applications in cancer. *Nat Genet* 37:S11–7
- Prochazkova M, Chevret E, Mainhaguet G, Sobotka J, Vergier B, Belaud-Rotureau MA et al. (2007) Common chromosomal abnormalities in mycosis fungoides transformation. *Genes Chromosomes Cancer* 46:828–38
- Rouveiro C, Stransky N, Hupé P, Rosa PL, Viara E, Barillot E et al. (2006) Computation of recurrent minimal genomic alterations from array-CGH data. *Bioinformatics* 22:849–56
- Scarisbrick JJ, Woolford AJ, Russell-Jones R, Whittaker SJ (2000) Loss of heterozygosity on 10q and microsatellite instability in advanced stages of primary cutaneous T-cell lymphoma and possible association with homozygous deletion of PTEN. *Blood* 95:2937–42
- Scarisbrick JJ, Woolford AJ, Russell-Jones R, Whittaker SJ (2001) Allelotyping in mycosis fungoides and Sezary syndrome: common regions of allelic loss identified on 9p, 10q, and 17p. *J Invest Dermatol* 117:663–670
- Solinas-Toldo S, Lampel S, Stilgenbauer S, Nickolenko J, Benner A, Döhner H et al. (1997) Matrix-based comparative genomic hybridization: biochips to screen for genomic imbalances. *Genes Chromosomes Cancer* 1997:7:399–7
- Subhi AL, Tang B, Balsara BR, Altomare DA, Testa JR, Cooper HS et al. (2004) Loss of methylthioadenosine phosphorylase and elevated ornithine decarboxylase is common in pancreatic cancer. *Clin Cancer Res* 10:7290–6
- van Doorn R, van Kester MS, Dijkman R, Vermeer MH, Mulder AA, Szuhai K et al. (2009) Oncogenomic analysis of mycosis fungoides reveals major differences with Sezary syndrome. *Blood* 113:127–36
- van Doorn R, Zoutman WH, Dijkman R, de Menezes RX, Commandeur S, Mulder AA et al. (2005) Epigenetic profiling of cutaneous T-cell lymphoma: promoter hypermethylation of multiple tumor suppressor genes including BCL7a, PTPRG and p73. *J Clin Oncol* 23:3886–96

- Vermeer MH, van Doorn R, Dijkman R, Mao X, Whittaker S, van Voorst Vader PC *et al.* (2008) Novel and highly recurrent chromosomal alterations in Sezary syndrome. *Cancer Res* 68:2689–98
- Vita M, Henriksson M. (2006) The Myc oncoprotein as a therapeutic target for human cancer. *Semin Cancer Biol* 16:318–30
- Wain EM, Mitchell TJ, Russell-Jones R, Whittaker SJ *et al.* (2005) Fine mapping of chromosome 10q deletions in mycosis fungoides and sezary syndrome: identification of two discrete regions of deletion at 10q23.33-24.1 and 10q24.33-25.1. *Genes Chromosomes Cancer* 42:184–92
- Willemze R, Jaffe ES, Burg G, Cerroni L, Berti E, Swerdlow SH *et al.* (2005) WHO-EORTC classification for cutaneous lymphomas. *Blood* 105:3768–85
- Worsham MJ, Chen KM, Tiwari N, Pals G, Schouten JP, Sethi S *et al.* (2006) Fine-mapping loss of gene architecture at the CDKN2B (p15INK4b), CDKN2A (p14ARF, p16INK4a), and MTAP genes in head and neck squamous cell carcinoma. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 132:409–15
- Zhao LY, Niu Y, Santiago A, Liu J, Albert SH, Robertson KD *et al.* (2006) An EBF3-Mediated transcriptional program that induces cell cycle arrest and apoptosis. *Cancer Res* 66:9445–52

12/05/2011

Ms. Ref. No.: CG-D-11-00065R2

Dear Dr. Espinet,

Your manuscript, "ABSENCE OF TCR LOCI CHROMOSOMAL TRANSLOCATIONS IN CUTANEOUS T-CELL LYMPHOMAS" has been successfully revised and I am pleased to accept it for publication in Cancer Genetics. We are forwarding your paper to the publisher for processing.

Thank you for your support of the journal.

Best regards,

Jaclyn A. Biegel, Ph.D.
Editor-in-Chief
Cancer Genetics

ABSENCE OF TCR LOCI CHROMOSOMAL TRANSLOCATIONS IN CUTANEOUS T-CELL LYMPHOMAS

Rocío Salgado^{a,b}, Fernando Gallardo^c, Octavio Servitje^d, Teresa Estrach^e, M^a Pilar García-Muret^f, Vicente Romagosa^g, Lourdes Florensa^a, Sergi Serrano^a, Marta Salido^a, Francesc Solé^a, Ramon M Pujol^c, Blanca Espinet^{a,*}

^aLaboratori Citogenetica Molecular. Laboratori de Citologia Hematològica. Servei de Patologia. Hospital del Mar-Parc de Salut Mar. IMIM-Institut de Recerca de l'Hospital del Mar. Programa de Recerca en Càncer. GRETNHE. Barcelona. Spain.

^bDepartament de Biologia Animal, Biologia Vegetal i Ecologia. Facultat de Biociències. Universitat Autònoma de Barcelona. Bellaterra. Spain.

^cServei de Dermatologia. Hospital del Mar-Parc de Salut Mar. Barcelona. Spain.

^dServei de Dermatologia. Hospital Universitari de Bellvitge. L'Hospitalet. Spain

^eServei de Dermatologia. Hospital Clinic. Barcelona. Spain

^fServei de Dermatologia. Hospital de Sant Pau. Barcelona. Spain

^gServei de Patologia. Hospital Universitari de Bellvitge. L'Hospitalet. Spain

***Corresponding author:** Blanca Espinet, PhD. Laboratori de Citogenètica Molecular. Servei de Patologia. Hospital del Mar. Parc de Salut Mar. Passeig Marítim, 25-29, 08003 Barcelona, Spain. e-mail: bespinet@parcdesalutmar.cat
Phone: +34 932483521. Fax number: +34 932483131.

Running title: *TCR* translocations in CTCL

Keywords: Cutaneous T-cell lymphomas, *TCR*, Fluorescence *in situ* hybridization

ABSTRACT

Chromosomal aberrations involving T-cell receptor (*TCR*) gene loci have been described in several T-cell malignancies. In primary cutaneous T-cell lymphomas (CTCL), the frequency of these aberrations has not been well established yet. We analyzed *TCR* gene loci (*TCRAD*, *TCRB* and *TCRG*) status in CTCLs using fluorescence in situ hybridization (FISH) technique. Twenty-five CTCL patients were included in the study: 13 Sezary syndromes (SS), six mycosis fungoides (MF) and six primary cutaneous anaplastic large cell lymphomas CD30+ (cALCL-CD30+). FISH was performed using three break-apart probes flanking *TCRAD* (14q11), *TCRB* (7q34) and *TCRG* (7p14) loci in each case. *TCR* genes chromosomal rearrangements were not detected in any of the analyzed cases. Gains of *TCRB* and *TCRG* genes were observed in 23% (3/13) of SS and 50% (3/6) of MF, reflecting the presence of trisomy and/or tetrasomy of chromosome 7 already detected by conventional cytogenetics and arrayCGH techniques. In conclusion, *TCR* loci rearrangements are not frequent in CTCLs, however we can not exclude a pathogenic role in these malignancies.

INTRODUCTION

T-cell receptor (*TCR*) loci chromosomal rearrangements have been mainly observed in T-cell prolymphocytic leukemias (T-PLL) and T-cell acute lymphoblastic leukemias (T-ALL). The result of these rearrangements is the juxtaposition of enhancer elements of the *TCR* genes, principally *TCRAD*, and several oncogene promoters (i.e. *TAL1*, *MYC*, *NOTCH1*, *HOX11*, *TCL1*) leading to deregulated expression of proto-oncogenes. Moreover, the presence of such translocations is considered to be the diagnostic hallmark of these entities. Regarding T-cell lymphomas, one third of precursor T-cell lymphoblastic leukemia/lymphoma (T-LBL) cases, and a low proportion of peripheral T-cell lymphomas (PTCLs) showed *TCRAD* and *TCRB* translocations (1-2).

Cutaneous T-cell lymphomas (CTCL) are uncommon lymphoproliferative disorders characterized by the proliferation of clonal T-cells in the skin as a primary site. Scarce information about chromosomal rearrangements involving *TCR* loci in CTCLs is currently available. Several G-banding conventional cytogenetics and spectral karyotyping (SKY) studies in mycosis fungoides (MF) (3) failed to show recurrent structural chromosomal rearrangements. As far as we are concerned, no previous G-banding analyses or SKY studies in cutaneous anaplastic large cell lymphoma CD30+ (cALCL-CD30+) have been reported. Conversely, several G-banding studies focused on Sézary syndrome (SS) have demonstrated complex karyotypes and structural aberrations often involving chromosomes 1p, 10q and 14q. Moreover, the application of molecular cytogenetics techniques as SKY, multiplex FISH (M-FISH) and cross-species color banding (RxFISH) has allowed to define the following recurrent

unbalanced translocations: der(8)t(8;17), der(1)t(1;10), and der(14)t(14;15) (3,4). Recently, the genomic profile of CTCLs has been largely explored using several array comparative genomic hybridization platforms (4-8). Total or partial gains of chromosome 7, where *TCRG* and *TCRB* are located, have been observed in CTCLs. However, the most important limitation of this technique is the inability to detect balanced chromosomal rearrangements and therefore those affecting *TCR* loci could not be demonstrated.

Since *TCR* translocations have been largely implicated in the pathogenesis of other T-cell malignancies and only a few number of CTCL cases had been screened (1), the aim of the present study was to analyze the *TCRAD*, *TCRB* and *TCRG* gene status by FISH in a series of CTCL samples.

MATERIAL AND METHODS

Patient samples

The present retrospective study comprised 25 CTCL patients: 13 Sezary syndromes (SS), six cases of tumor stage mycosis fungoides (MFt) and six primary cutaneous anaplastic large cell lymphomas CD30+ (cALCL-CD30+) (Table 1). Patients were selected depending on the availability of the samples. Samples analyzed were tissue sections from paraffin-embedded skin biopsies (MF and cALCL-CD30+) and peripheral blood proceeding from conventional cytogenetics cultures (SS). In addition, 10 normal peripheral blood and 10 reactive lymph node samples from healthy donors were tested with the same FISH probes as negative controls. MFt and cALCL-CD30+ samples were previously analyzed using array comparative genomic hybridization (6,7).

G-banding conventional cytogenetics

Results of G-banding conventional cytogenetics from SS patients were reviewed retrospectively and are summarized in Table 1. These results were previously reported (4).

Fluorescence *in situ* hybridization

For SS patients, fluorescence in situ hybridization (FISH) analyses were performed on fixed nuclei from peripheral blood samples proceeding from conventional cytogenetics culture. The hybridization process was performed using the Hybrite chamber (AbbottMolecular, Abbott Park, IL, USA). On the other hand, in MFt and cALCL-CD30+ cases, FISH technique was performed in paraffin embedded tissue sections. The hybridization process was carried out using the Histology FISH Accessory Kit (DAKO, Glostrup, Denmark) as manufacturer's protocol. Both controls and patients samples were hybridized independently with three commercial break-apart FISH probes, *TCRAD* (14q11), *TCRB* (7q34) and *TCRG* (7p14), from DAKO. A minimum of 100 non-overlapping nuclei per case and probe were analyzed.

RESULTS AND DISCUSSION

TCR loci rearrangements have been frequently observed in several T-cell malignancies, mainly T-PLL and T-ALL, in which can be considered the diagnostic hallmark, and in a small number of PTCLs (1,2). CTCLs (MF, cALCL-CD30+ and SS) are relatively infrequent disorders characterized by the presence of clonal T-cells in the skin as a primary localization. The difficulty to obtain metaphases from skin biopsy specimens has limited the detection of

chromosomal rearrangements using G-banding cytogenetics in MF and cALCL-CD30+ samples. On the other hand, SS have been better cytogenetically characterized and the presence of structural aberrations is a relatively frequent event involving chromosomes 1p, 10q and 14q (3,4). However, the complexity of the karyotypes could lead to ignore cryptic translocations of the *TCR* loci among other regions.

In this study we analyzed a total of 25 CTCLs with three different commercial break-apart FISH probes for *TCR* loci (*TCRAD*, *TCRB* and *TCRG*). FISH analysis failed to show *TCRAD*, *TCRB* or *TCRG* rearrangements in any of the evaluated samples (Table 2). Moreover, any of the control samples (normal peripheral blood and reactive tonsils) showed *TCR* loci translocations. Previous *TCR* chromosomal rearrangements in PTCLs have shown that only three out of 102 cases (2.9%) and one out of 88 (1%) harbored *TCRAD* and *TCRB* translocation respectively (2). As far as we know, only one previous study by Gesk *et al.* (1) analyzed the rearrangements of the *TCR* loci in a series of 82 T-cell malignancies in which 12 of them corresponded to CTCLs (six SS and six MF). In this analysis, no translocations involving the *TCR* loci were detected. These results seemed to suggest that *TCR* translocations were not present in CTCLs.

On the other hand, this study has allowed to analyze the genetic status of chromosomes 7 and 14. We have observed two SS cases (no.12 and no. 13) in which *TCRAD* probe signals were normal (2F) whereas the karyotype showed a tetraploid component. Therefore, we expected to detect from three to four

signals of *TCRAD* probe. These karyotypes were extremely complex and only two and three metaphases were analyzed in cases no.12 and no.13, respectively. Probably, for this reason, the FISH analyses did not confirm this observation. In addition, we have observed three and four copies of *TCRB* (7q34) and *TCRG* (7p14) FISH signals in three out of six MF samples and three out of 13 SS samples (Table 2 and Supplementary Fig. 1). This observation confirmed our previous results obtained by arrayCGH and G-banding conventional cytogenetics, respectively (Table 1). Recent arrayCGH studies have demonstrated that total or partial gain of chromosome 7 is a frequent chromosomal abnormality in MF and SS (5,6). As far as we concerned, no previous FISH study analyzing the *TCR* loci status in cALCL-CD30+ have been published. Unlike MF and SS, which are characterized for presenting a complex genomic profile including gains of chromosome 7, cALCL-CD30+ show a less complex and more heterogeneous chromosomal aberrations pattern (7,8). Among the different arrayCGH analyses, van Kester et al (7) found a higher frequency of chromosome 7 abnormalities, whereas in the study by Sanchez-Schmidt (8) the proportion was very low. In the present study, only one cALCL-CD30+ patient sample presented a gain, detected by arrayCGH analysis, in 7q21.

In conclusion, our results suggest a lack of structural rearrangements of *TCRAD*, *TCRB* and *TCRG* genes detected by FISH in CTCL patients. The absence of *TCR* loci rearrangements, using FISH as a detection tool, does not exclude their involvement in CTCL pathogenesis.

Acknowledgments

The authors want to thank Esther Villalba and Erika Torres from Tissue Bank from Hospital Universitario de Bellvitge and Hospital del Mar, respectively, for their excellent technical support and “Xarxa Temàtica de Bancs de Tumors de Catalunya”. This work has been supported by Fondo de Investigación Sanitaria, Spanish Ministry of Health grant No. PI051827; Red Temática de Investigación Cooperativa en Cáncer (RTICC) grant No. RD07/0020/2004, from Spanish Ministry of Science and Innovation & European Regional Development Fund (ERDF) “Una manera de hacer Europa”, grant from DIUE de la Generalitat de Catalunya (2009 SGR 541) and DAKO.

REFERENCES

1. Gesk S, Martín-Subero JI, Harder L, et al. Molecular cytogenetic detection of chromosomal breakpoints in T-cell receptor gene loci. *Leukemia* 2003; 17:738-745.
2. Feldman AL, Law M, Grogg KL, et al. Incidence of TCR and TCL1 gene translocations and isochromosome 7q in peripheral T-cell lymphomas using fluorescence in situ hybridization. *Am J Clin Pathol* 2008;130:178-185.
3. 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;45:383-391.
4. Espinet B, Salido M, Pujol RM, et al. Genetic characterization of Sézary's syndrome by conventional cytogenetics and cross-species color banding fluorescent in situ hybridization. *Haematologica* 2004;89:165-167.
5. van Doorn R, van Kester MS, Dijkman R, et al. Oncogenomic analysis of mycosis fungoides reveals major differences with Sezary syndrome. *Blood* 2009;113:127-136.
6. 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;130:1126-1135.
7. van Kester MS, Tensen CP, Vermeer MH, et al. Cutaneous anaplastic large cell lymphoma and peripheral T-cell lymphoma NOS show distinct chromosomal alterations and differential expression of chemokine receptors and apoptosis regulators. *J Invest Dermatol* 2010;130:563-575.

8. Sánchez-Schmidt JM, Salgado R, Servitje O, et al. Primary cutaneous CD30+ anaplastic large-cell lymphomas show a heterogeneous genomic profile: an oligonucleotide arrayCGH approach. *J Invest Dermatol* 2011;131:269-271.

Table 1. Clinical and cytogenetics features of patients diagnosed of SS, MF and cALCL-CD30+

Patient	Diagnosis	Stage	Sex	Age	Technique used	Cytogenetics results
1	SS	IVB	F	75	G-CG	47,XX,-10,+18,+19[8]/46,XX[16]
2	SS	IVB	F	76	G-CG	44,X,-X,del(1)(q32),-13[20]/46,XX[16]
3	SS	IVB	F	54	G-CG	46,XX[20]
4	SS	IVB	M	80	G-CG	46,XY,t(2;12)(q23;q24)[1]/46,XY[20]
5	SS	IVB	M	27	G-CG	48,XY,add(1)(p36),del(3)(p14),inv(6)(p22q12),+7,der(8)t(1;8)(p36;q24),del(9)(q13q22),+del(9)(q13q22),der(15)t(9;15)(q31;q22),der(22)t(3;22)(p21;q13)[14]/46,XY[6]
6	SS	IVB	M	50	G-CG	41,X,-Y,del(2)(q34),+der(3),der(6)add(6)(p25)add(6)(q27),add(7)(p22),-8,-9,-10,-11,-13,-14,add(19)(q13.1),+20[6]
7	SS	IVB	M	74	G-CG	46,XY[20]
8	SS	IVB	F	70	G-CG	46,XX[20]
9	SS	IVB	M	70	G-CG	45,XY,add(1)(p36),del(3)(p23),-10,-17,+mar[5]/46,XY[15]
10	SS	IVB	M	68	G-CG	46,XY[20]
11	SS	IVB	F	73	G-CG	46,XX[20]
12	SS	IVB	F	78	G-CG	84~89,XX,-X,-X,der(1),-2,-3,+4,der(4),der(4),-5,del(6)(q23),der(7),-8,-9,-10,-10,add(11)(q24),-13,-15,-16,der(17),der(17),-22,-22,+5~10mar[cp3]/46,XX[17]
13	SS	IVB	F	58	G-CG	90,XX,-X,-X,-4,der(4),der(5),-6,-6,+i(8)(q10),-9,-10,-10,der(11),-12,-14,-15,add(16)(q22),+der(17),+18,+18,-19,+21,+5mar[2]/46,XX[13]
14	MF	IVA	F	68	ArrayCGH	NC
15	MF	IIB	M	43	ArrayCGH	NC
16	MF	IIB	F	83	ArrayCGH	Gains: 3pterp12.3, 5q12.1, 5q23.3q31.2 (ampl), 7, 8q, 8q24 (ampl.), 9p24.2p21.3, 9q, 10p14p12.36, 10p15.2p14 (ampl.), 15q22.2q25.1, 16p13.2p13.12, 17q, 19p13.2p11 Losses: 1p36.33p36.22, 1p36.11, 1p33p21.3, 1p21.1p13.1, 1q21.1q42.12, 5q12.1q14.3, 5q15q22.1 (homoz), 5q22.2, 5q23.1 (homoz), 5q23.2q23.3, 6q15q22.1, 6q22.33q27, 9p21.3p21.2, 10p12.1p11.11, 10q22.1, 10q23.31q26.3, 12, 13, 15q11.1q22.31, 15q25.1q26.3, 16q, 17p, 18, 19p13.3, 19q13.3qter, 20p13p11.22, 20q12q13.33, 21, 22
17	MF	III	F	67	ArrayCGH	NC
18	MF	IVB	M	73	ArrayCGH	Gains: 7 Losses: 1p13,1p12, 9p21.3, 9q21.1q31.3, 10
19	MF	IVA	M	54	ArrayCGH	Gains: 7, 9q22.1q22.2, 9q34.11qter, 10pterp13, 11q23.2qter, 17q, 18q, 21 Losses: 2q36.1q36.3, 5q33.3q34, 9q21.31q22.1, 10p11.21p13, 16q23.1q24.3, 17p, 18p
20	cALCL-CD30+	IIB	M	58	ArrayCGH	Gains:2, 7q21.11q21.3 Losses: 7p22, 16, 17p, 19
21	cALCL-CD30+	IIB	F	69	ArrayCGH	NC
22	cALCL-CD30+	IIB	M	67	ArrayCGH	Gains: 1p13 Losses: 4, 18q
23	cALCL-CD30+	IIB	M	44	ArrayCGH	Gains: 16p11.2 Losses: 7p22, 7q21.3q22.2, 13q13.3qter, 16pterp12.1, 16q22.1, 16q24.3, 17, 19
24	cALCL-CD30+	IIA	M	45	ArrayCGH	Gains: NC Losses: 7pterp22, 16p, 19
25	cALCL-CD30+	IIB	F	78	ArrayCGH	Gains: 16p13.12p12.3, 16p13.3p13.2 Losses: NC

Abbreviatures. SS: Sézary Syndrome. MF: Mycosis fungoides. cALCL-CD30+: Cutaneous anaplastic large cell lymphoma CD30-positive. M: Male. F: Female. NC: No change. G-CG: G-banding cytogenetics; ampl: amplification; homoz.: homozygous deletion

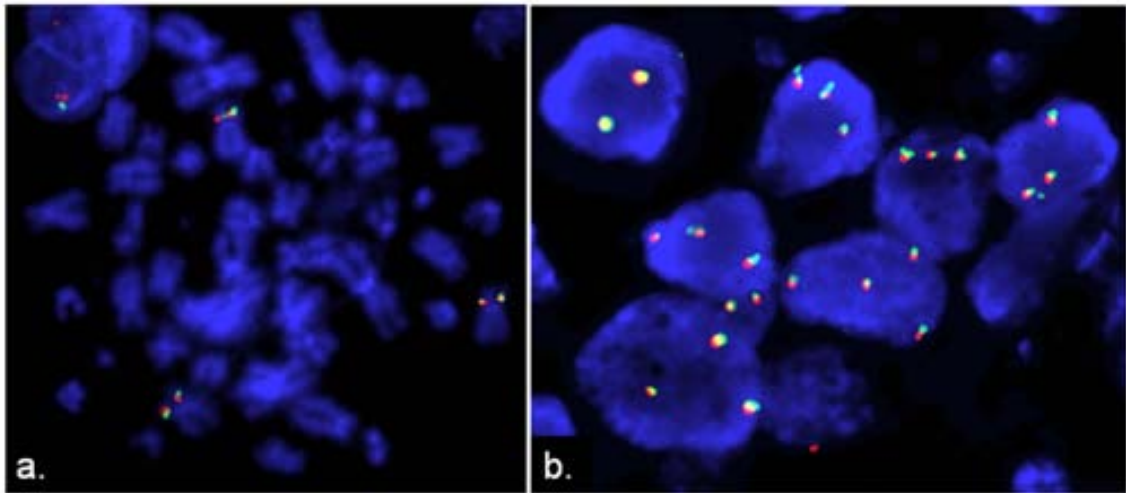
Table 2. *TCRAD*, *TCRB* and *TCRG* FISH results in SS, MF and cALCL-CD30+ patients.

n	Diagnosis	Tissue sample	FISH results		
			<i>TCRAD</i> FISH fusion signals	<i>TCRB</i> FISH fusion signals	<i>TCRG</i> FISH fusion signals
1	SS	PB	2	2	2
2	SS	PB	2	2	2
3	SS	PB	2	2	2
4	SS	PB	2	2	2
5	SS	PB	2	3-4	3-4
6	SS	PB	2	2	2
7	SS	PB	2	2	2
8	SS	PB	2	2	2
9	SS	PB	2	2	2
10	SS	PB	2	2	2
11	SS	PB	2	2	2
12	SS	PB	2	3-4	3-4
13	SS	PB	2	3-4	3-4
14	MF	Skin	2	2	2
15	MF	Skin	2	2	2
16	MF	Skin	2	3-6	3-6
17	MF	Skin	2	2	2
18	MF	Skin	2	3-6	3-6
19	MF	Skin	2	3-6	3-6
20	cALCL-CD30+	Skin	2	2	2
21	cALCL-CD30+	Skin	2	2	2
22	cALCL-CD30+	Skin	2	2	2
23	cALCL-CD30+	Skin	2	2	2
24	cALCL-CD30+	Skin	2	2	2
25	cALCL-CD30+	Skin	2	2	2

Abbreviatures. SS: Sézary Syndrome. MF: Mycosis fungoides. cALCL-CD30+: Cutaneous anaplastic large cell lymphoma CD30-positive. PB: Peripheral blood.

SUPPLEMENTARY MATERIALS

Supplementary Figure 1. Fluorescence *in situ* hybridization results. (a) FISH image that shows a metaphase with three copies of *TCRG* signals in each chromosomes 7 (patient 5). (b) FISH that shows multiple copies of *TCRB* probe in a embedded paraffined section of the skin (patient 17).



2. OTRAS PUBLICACIONES REALIZADAS DURANTE LA REALIZACIÓN DE LA TESIS DOCTORAL

Publicaciones en la que consta como autora o co-autora:

Autores (por orden de firma): **Salgado R**, Toll A, Espinet B, Gonzalez-Roca E, Barranco CL, Serrano S, Solé F, Pujol RM.

Título: Estudio de las lesiones citogenéticas en el carcinoma escamoso cutáneo mediante la técnica de arrays de hibridación genómica comparada.

Revista: Actas Dermosifiliogr. 2008; 99:199-206.

Autores (por orden de firma): **Salgado R**, Toll A, Alameda F, Baró T, Martín-Ezquerria G, Sanmartín O, Martorell-Calatayud A, Salido M, Almenar S, Solé F, Pujol RM, Espinet B.

Título: *CKS1B* amplification is a frequent event in cutaneous squamous cell carcinoma with aggressive clinical behaviour.

Revista: Genes Chromosomes Cancer 2010; 49:1054-1061.

Autores (por orden de firma): Martín-Ezquerria G, **Salgado R**, Toll A, Baró T, Mojal S, Yébenes M, Garcia-Muret MP, Solé F, Alameda Quitllet F, Espinet B, Pujol RM.

Título: CDC28 protein kinase regulatory subunit 1B (CKS1B) expression and genetic status analysis in oral squamous cell carcinoma.

Revista: Histol Histopathol 2011; 26:71-77.

Autores (por orden de firma): Sánchez-Schmidt J, **Salgado R**, Servitje O, Gallardo F, Ortiz-Romero P, Karpova MB, Zipser MC, García-Muret MP, Estrach T, Rodriguez-Pinilla Ms, Climent F, Suela J, Ferreira BI, Cigudosa Jc, Barranco C, Serrano S, Dummer R, Solé F, Pujol RM, Espinet B.

Título: Primary cutaneous CD30+ anaplastic large cell lymphomas show a heterogeneous genomic profile: an oligonucleotide arrayCGH approach.

Revista: J Invest Dermatol 2011; 131:269-271.

Autores (por orden de firma): Segura S, **Salgado R**, Toll A, Martín-Ezquerria G, Yébenes M, Sàez E, Solé F, Barranco C, Umbert P, Espinet B, Pujol RM.

Título: Identification of t(17;22)(q22;q13) (*COL1A1/PDGFB*) in dermatofibrosarcoma protuberans by fluorescence in situ hybridization in paraffin-embedded tissue microarrays. Clinical and histopathological correlation in 40 cases.

Revista: Hum Pathol 2011; 42:176-184.

Autores (por orden de firma): **Salgado R**, Llombart B, Pujol RM, Fernández-Serra A, Sanmartín O, Toll A, Rubio L, Segura S, Barranco C, Serra-Guillén C, Yébenes M, Salido M, Traves V, Monteagudo C, Sáez E, Hernández T, De Álava E, Llombart-Bosch A, Solé F, Guillén C, Espinet B, López-Guerrero Ja.

Título: Molecular diagnosis of dermatofibrosarcoma protuberans: a comparison between RT-PCR and FISH methodologies.

Revista: Genes Chromosomes Cancer 2011; 50:510-517.

Publicaciones en la que consta como colaboradora:

Autores (por orden de firma): Ferran M, Gallardo F, Ferrer AM, Salar A, Perez-Vila E, Juanpere N, **Salgado R**, Espinet B, Orfao A, Florensa L, Pujol RM.

Título: Acute myeloid dendritic cell leukaemia with specific cutaneous involvement: a diagnostic challenge.

Revista: Br J Dermatol 2008; 158:1129-1133.

Autores (por orden de firma): Costa C, Espinet B, Molina MA, **Salgado R**, Salido M, Baró T, Fusté P, Mancebo G, Carreras R, Solé F, Serrano S, Alameda F.

Título: Analysis of gene status in cervical dysplastic lesions and squamous cell carcinoma using tissue macroarrays.

Revista: Histol Histopathol 2009; 24: 821-829.

Autores (por orden de firma): Toll A, **Salgado R**, Yébenes M, Martín-Ezquerria G, Gilaberte M, Baró T, Solé F, Alameda F, Espinet B, Pujol RM.

Título: MYC gene numerical aberrations in actinic keratosis and cutaneous squamous cell carcinoma.

Revista: Br J Dermatol 2009; 161:1112-8.

Autores (por orden de firma): Romaní J, Yébenes M, Escuder O, Fernandez-Ferrer S, Espinet B, **Salgado R**, Luelmo J.

Título: Cutaneous desmoid tumor. Resolution of the surgical defect with a dermal regeneration template and an epidermal autograft.

Revista: Dermatol Surg 2009; 35:1582-1587.

Autores (por orden de firma): Toll A, **Salgado R**, Yébenes M, Martín-Ezquerria G, Gilaberte M, Baró T, Solé F, Alameda F, Espinet B, Pujol RM.

Título: Epidermal growth factor receptor gene numerical aberrations are frequent events in actinic keratoses and invasive cutaneous squamous cell carcinomas.

Revista: Exp Dermatol 2010; 19:151-153.

Autores (por orden de firma): Toll A, **Salgado R**, Espinet B, Pujol RM.

Título: Eruptive postoperative squamous cell carcinomas or Hypertrophic lichen planus-like reactions combined with infundibulocystic hyperplasia?.

Revista: J Am Acad Dermatol 2010; 63:910-911.

Autores (por orden de firma): Martín-Ezquerria G, **Salgado R**, Toll A, Gilaberte M, Baró T, Alameda-Quitllet F, Yébenes M, Solé F, Garcia-Muret MP, Espinet B, Pujol RM.

Título: Multiple genetic copy number alterations in oral squamous cell carcinoma: study of MYC, TP53, CCDN1, EGFR and ERBB2 status in primary and metastatic tumors.

Revista: Br J Dermatol 2010; 163:1028-1035.

Autores (por orden de firma): Espinet B, García-Herrera A, Gallardo F, Baró C, **Salgado R**, Servitje O, Estrach T, Colomo L, Romagosa V, Barranco C, Serrano S, Campo E, Pujol RM, Solé F.

Título: *FOXP1* molecular cytogenetics and protein expression analyses in primary cutaneous large B cell lymphoma, leg-type.

Revista: *Histol Histopathol* 2011; 26:213-221.

