

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE MEDICINA



TESIS DOCTORAL

Estudio de perfil de expresión genética en micosis fungoide como marcador pronóstico

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Vanessa Gargallo Moneva

DIRECTORES

Pablo Luis Ortiz Romero
José Luis Rodríguez Peralto

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE MEDICINA



TESIS DOCTORAL

**ESTUDIO DE PERFIL DE EXPRESIÓN GENÉTICA EN
MICOSIS FUNGOIDE COMO MARCADOR PRONÓSTICO**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTORA

PRESENTADA POR

Vanessa Gargallo Moneva

DIRECTORES

Pablo Luis Ortiz Romero y José Luis Rodríguez Peralto

TESIS DOCTORAL

**ESTUDIO DE PERFIL DE EXPRESIÓN GENÉTICA EN
MICOSIS FUNGOIDE COMO MARCADOR PRONÓSTICO**



Memoria para optar al grado de DOCTORA

PRESENTADA POR
Vanessa Gargallo Moneva

DIRECTORES
Pablo Luis Ortiz Romero y José Luis Rodríguez Peralto

Madrid, 2022

El trabajo descrito en esta memoria para optar al grado de doctor en la Universidad Complutense de Madrid, ha sido realizado en los Servicios de Dermatología y Anatomía patológica del Hospital Universitario 12 de Octubre. Así como con la colaboración de del laboratorio del Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas (CNIO), el laboratorio de Anatomía Patológica de la Fundación Jiménez Díaz y el laboratorio de Investigación del Hospital Puerta de Hierro.

Este trabajo ha sido financiado gracias a la ayuda de la fundación para la Investigación Biomédica Hospital Universitario 12 de Octubre.

AGRADECIMIENTOS

AGRADECIMIENTOS

A mis directores los doctores Ortiz Romero y Rodríguez Peralto por su guía, su apoyo incondicional y su ayuda ante cualquier adversidad.

Gracias a la Dra. Sánchez Beato por la amabilidad con la que siempre ha compartido su conocimiento. A David Lora Pablos por su ayuda, disponibilidad y paciencia con la estadística. Al Dr. Piris Pinilla por su capacidad para señalarme en mejor camino a seguir y a su compañera la Dra. Rodríguez Moreno por el gran trabajo aportado y su disposición.

Por último, gracias a mis amigos, en especial Ainara por escucharme y compartir su sabiduría. A mi familia, mis padres Antonio y Toñi, mi hermana María y mi pareja Jose por ser mi mayor apoyo.

ÍNDICE

ÍNDICE

AGRADECIMIENTOS	5
ÍNDICE	7
ABREVIATURAS	10
RESUMEN	15
RESUMEN	16
ABSTRACT	28
INTRODUCCIÓN	39
<i>MICOSIS FUNGOIDE</i>	40
Definición	40
Evolución histórica	42
Epidemiología	43
Clasificación	44
Características clínicas de la MF	46
Etiopatogenia	48
Histología	62
Diagnóstico	64
Estadificación y factores pronósticos	68
Tratamiento	72
ARRAYS DE ADN COMPLEMENTARIO	80
NANOSTRING	84
PROCESAMIENTO DE DATOS	86
Normalización	86
Análisis de diferenciación de expresión	86
Falsos positivos	88
Análisis de predicción de clases	89
Análisis de descubrimiento de clases: Agrupaciones de datos en clusters o grupos de genes/pacientes.	89
Análisis de enriquecimiento	90
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	92
HIPÓTESIS	92
OBJETIVO PRINCIPAL	92
OBJETIVOS SECUNDARIOS	92
MATERIAL Y MÉTODOS	94
MUESTRA	94
TRATAMIENTO DE LAS MUESTRAS BIOLÓGICAS	95
VARIABLES CLÍNICAS	95
Base de datos	97
VARIABLES GENÉTICAS	97
CONSIDERACIONES ÉTICAS	97
HISTOLOGÍA	97
PROCESAMIENTO DE LAS MUESTRAS	98
Aislamiento de ARN	99
MICROARRAY	101
VALIDACIÓN	102
Preparación del ARN	103
Estudio de expresión genética mediante NanoString	103
ANÁLISIS ESTADÍSTICO	103
Estadística descriptiva	104
Estadística analítica	104
Análisis de agrupación	104

<i>Análisis de diferenciación de genes</i>	105
<i>Análisis de expresión genética</i>	107
RESULTADOS	109
<i>ESTADÍSTICA DESCRIPTIVA</i>	110
<i>ANÁLISIS DE DIFERENCIACIÓN DE GENES</i>	124
<i>Análisis de grupos</i>	128
<i>ANÁLISIS DE ENRIQUECIMIENTO GSEA</i>	131
<i>Rutas y genes diferencialmente expresados. Grupo 1</i>	131
<i>Rutas y genes diferencialmente expresados. Grupo 2</i>	134
<i>RESULTADOS DE LA VALIDACIÓN</i>	137
DISCUSIÓN	144
<i>EPIDEMIOLOGÍA</i>	145
<i>RESULTADOS DEL ESTUDIO GSEA</i>	146
1. <i>Vías relacionadas con expresión de citocinas y sus receptores</i>	146
2. <i>Vías de ciclo celular, proliferación y supervivencia</i>	150
3. <i>Poblaciones celulares</i>	154
4. <i>Reparación ADN</i>	155
5. <i>Otros</i>	155
<i>RESULTADOS ADICIONALES DEL ESTUDIO DE VALIDACIÓN</i>	156
1. <i>Interleuquinas, quimiocinas y sus receptores</i>	156
2. <i>Poblaciones celulares</i>	157
CONCLUSIONES	160
ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS	162
<i>ÍNDICE DE FIGURAS</i>	163
<i>ÍNDICE DE TABLAS</i>	165
BIBLIOGRAFÍA	167
ANEXOS	195
<i>ANEXO I</i>	196
<i>ANEXO II</i>	204
<i>ANEXO III</i>	209
<i>ANEXO IV</i>	210
<i>ANEXO V</i>	213

ABREVIATURAS

ABREVIATURAS

4E-BP1	Eukaryotic translation initiation factor 4E-binding protein 1
ABCB1	ATP binding cassette subfamily B member
ADN	Ácido desoxiribonucleico
ADNc	Ácido desoxiribonucleico complementario
AGAP2	ArfGAP with GTPase domain, ankyrin repeat and PH domain 2
ARID1A	AT-rich interactive domain-containing protein 1A
ARN	Ácido ribonucleico
ARNa	Ácido ribonucleico amplificado
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
ATF3	Activating transcription factor 3
ATM	Ataxia telangiectasia mutated
ATP6V1F	ATPase H ⁺ transporting V1 subunit F
UVA	Ultravioleta A
UVB	Ultravioleta B
BAD	BCL2 associated agonist of cell death
BAK1	Brassinosteroid-insensitive 1 (BRI1) associated receptor kinase 1
BCOR	BCL-6 corepressor
BCAR1	Breast cancer anti-estrogen resistance protein 1
BMP2	Bone morphogenetic protein 2
CARD11	Caspase recruitment domain family member 11
CARMIL2	Capping protein regulator and myosin 1 linker 2
CASP9	Caspase 9
CCDC32	Coiled-coil domain containing 32
CCL2	C-C motif chemokine ligand 2
CCL3L1	C-C motif chemokine ligand 3 like 1
CCL4	C-C motif chemokine ligand 4
CCL5	C-C motif chemokine ligand 5
CCL11	C-C motif chemokine ligand 11
CCL14	C-C motif chemokine ligand 14
CCL21	C-C motif chemokine ligand 21
CCL22	C-C motif chemokine ligand 22
CCNE1	Ciclina E1
CCR4	C-C motif chemokine receptor 4
CCR7	C-C motif chemokine receptor 7
CDC34	Cell division cycle 34, ubiquitin conjugating enzyme
CDC5	Cell division cycle 5
CDK	Cyclin dependent kinase
CDKN1C	Cyclin dependent kinase inhibitor 1C
CDKN2A	Cyclin dependent kinase-inhibitor 2A
CEBPG	CCAAT Enhancer binding protein gamma
CHKA	Choline kinase alpha
CHOP	Ciclofosfamida, doxorubicina, vincristina, prednisona
CIT	Citron rho-interacting serine/threonine kinase
CTLA-4	Cytotoxic T-lymphocyte associated protein 4
CXCL2	C-X-C motif chemokine ligand 2
CXCL6	C-X-C motif chemokine ligand 6
CXCL9	C-X-C motif chemokine ligand 9
CXCL10	C-X-C motif chemokine ligand 10
CXCL11	C-X-C motif chemokine ligand 11
CXCL12	C-X-C motif chemokine ligand 12
CXCL13	C-X-C motif chemokine ligand 13
CXCR3	C-X-C motif chemokine receptor 3
CXCR4	C-X-C motif chemokine receptor 4
CXCR5	C-X-C motif chemokine receptor 5
CXCR7	C-X-C motif chemokine receptor 7

CSNK1A1	Casein kinase 1 alpha 1
DDP4	Dipeptidyl peptidase 4
DAG	Distrofin associated glycoprotein
DNAJB1	DnaJ heat shock protein family (Hsp40) member B1
DNMT3A	DNA methyltransferase 3 alpha
DS	Desviación estándar
DTT	Dithiothreitol
EGFR	Epidermal growth factor receptor
EGR2	Early growth response 2
eIF4E	Eukaryotic translation initiation factor 4E
EIF5	Eukaryotic translation initiation factor 5
ENO2	Enolase 2
ERK	Extracellular signal-regulated kinase
ES	Error estándar
ETS1	ETS proto-oncogene 1, transcription factor
FDR	False discovery rate
FGFR	Fibroblast growth factor receptor
FLT3	Fms related receptor tyrosine kinase 3
Fox 1	Forkhead box
FOXO	Forkhead box, sub-group O
GAL	Galanin
GBP2	Guanylate binding protein 2
GCH1	GTP cyclohydrolase 1
GHR	Growth hormone receptor
GNB1	G protein subunit beta 1
GNGT2	G protein subunit gamma transducin 2
GSEA	Gen set enrichment analysis
GSK3	Glycogen synthase kinase 3
Gy	Gray
HIF1	Hypoxia-inducible factor 1
HLADPB2	Major histocompatibility complex, class II, DP Beta 2
HR	Hazard ratio
IC	Intervalo de confianza
ICOS	Inducible T cell costimulator
IFITM1	Interferon induced transmembrane protein 1
IL6ST	Interleukin 6 cytokine family signal transducer
INFAR	Interferon alfa and beta receptor
Ig	Inmunoglobulina
IGF1R	Insulin like growth factor 1 receptor
IGFBP2	Insulin like growth factor binding protein 2
IKZF2	IKAROS family zinc finger 2
IL	Interleuquina
IL10RA	Interleukin 10 receptor subunit alpha
IL23R	Interleukin 23 receptor
IL18BP	Interleukin 18 binding protein
INF	Interferón
IRF1	Interferon regulatory factor 1
ITGA1	Integrin subunit alpha 1
ITGB1	Integrin subunit beta 1
ITK	IL2 inducible T cell kinase
JAK	Janus kinasa
JAK1	Janus kinasa 1
JAK3	Janus kinasa 3
KRAS	Kirsten rat sarcoma viral oncogene
LAT	Linker for activation of T cells
LCCT	Linfoma cutáneo de células T
LY9	Lymphocyte antigen 9
MAP2K1	Mitogen-activated protein kinase kinase 1
MAP3K7	Mitogen-activated protein kinase kinase kinasa 7

MAPK	Mitogen-activated protein kinase
MAPK1	Mitogen-activated protein kinase 1
MAPK13	Mitogen-activated protein kinase 13
MAPK14	Mitogen-activated protein kinase 14
MAPK7	Mitogen-activated protein kinase 7
MALT1	Mucosa associated lymphoid tissue lymphoma translocation protein 1
MDM2	Murine doble minute 2
MEK	MAP kinase-ERK kinase
MEV	Megaelectrón voltio
MF	Micosis fungoide
MGAT4A	Alpha-1,3-mannosyl-glycoprotein 4-beta-N-acetylglucosaminyltransferase A
mSWAT	Modified severity-weighted assessment tool
MYC	Myelocytomatosis oncogene
NCOR1	Nuclear Receptor corepressor 1
NES	Normalized enrichment score
NFAT	Nuclear factor of activated T cells
NF1	Neurofibromin 1
NFKB	Nuclear factor kappa B
NFKB2	Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated b cells
NGFB	Nerve growth factor b
NGFR	Nerve growth factor receptor
NP	No progresión
NTRK3	Neurotrophic receptor tyrosine kinase 3
NR4A1	Nuclear receptor subfamily 4 group A member 1
P	Progresión
P70S6K	p70 ribosomal protein S6 kinase
PD 1/PDCD1	Programmed cell death protein 1
PDGFRA	Platelet derived growth factor receptor alpha
PDK1	3'-phosphoinositide-dependent kinase-1
PI3K	Phosphoinositide-3-kinase
PIK3C2G	Phosphatidylinositol-4-phosphate 3-kinase catalytic subunit type 2 gamma
PIK3CA	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase catalytic subunit alpha
PIK3CD	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase catalytic subunit delta
PIK3R1	Phosphoinositide-3-kinase regulatory subunit 1
PKCtheta	Protein kinase C-theta
PLCG1	Phospholipase C gamma 1
PP2A	Serine/threonine protein phosphatase 2A
PPIF	Peptidylprolyl Isomerase F
PPT1	Palmitoyl-protein thioesterase 1
PRF1	Perforin 1
PRKCA	Protein kinase C alfa
PRKCB	Protein kinase C beta
PRKCD	Protein kinase C delta
PSME2	Proteasome activator subunit 2
PTEN	Phosphatase and tensin homolog
PTK2	Protein tyrosine kinase 2
PUVA	Psoraleno y ultravioleta A
PXN	Paxillin
PYHIN1	Pyrin and HIN domain family member
RAS	Rat sarcoma viral oncogene homolog
RASGRP1	RAS guanyl-releasing protein 1
RB1	Retinoblastoma 1
RFC-1	Reduced folate carrier 1
RFC4	Replication Factor C Subunit 4
RHOA	Ras homolog family member A
RHOB	Ras homolog family member B
RIN	RNA integrity number
RORC	Retinoid acid-related orphan receptor C
RPS6KA1	Ribosomal protein S6 kinase A1

RRAD	Ras related glycolysis Inhibitor and calcium channel regulator
RXRB	Retinoid X receptor beta
SCNV	Variaciones en el número de copias somáticas
SDF1	Stromal cell-derived factor 1
SELL	Selectin L
SELP	Selectin P
SKAP1	Src kinase associated phosphoprotein 1
SLC6A8	Solute carrier family 6 member 8
SMARCB1	SWI/SNF related, matrix associated, actin dependent regulator of chromatin Subfamily B, Member 1
SOCS1	Suppressor of cytokine signaling 1
SOCS6	Suppressor of cytokine signaling 6
SOD2	Superoxide dismutase 2
SPOP	Speckle type BTB/POZ protein
SS	Síndrome de Sezary
SSNV	Variaciones somáticas en un solo nucleótido
STAT	Signal transducer and activator of transcription
STAT3	Signal transducer and activator of transcription 3
STAT4	Signal transducer and activator of transcription 4
STAT5	Signal transducer and activator of transcription 5
STAT5B	Signal transducer and activator of transcription 5 B
STAT6	Signal transducer and activator of transcription 6
STIP1	Stress-induced-phosphoprotein 1
TAGAP	T Cell activation Rho GTPase activating protein
TCR	T cell receptor
TCRBC2	T cell receptor beta constant 2
TGF -B1	Transforming growth factor beta1
TH	T helper
TLR	Toll like receptor
TNMB	Tumor nodes metastasis blood
TNF	Tumor necrosis factor
TNFAIP3	TNF alpha induced protein 3
TNFR2	TNF receptor 2
TNFRSF1B	TNF receptor superfamily member 1B
TNFRSF25	TNF receptor superfamily member 25
TNFRSF8	TNF receptor superfamily member 8
TNFSF10	TNF superfamily member 10
TNFSF13B	TNF superfamily member 13b
TRBC1	T cell receptor beta constant 1
TRGC1/2	T cell receptor gamma, constant 1/2
TRRAP	Transformation/transcription domain-associated protein
TOX	Thymocyte selection-associated high mobility group box protein
TP53	Proteína tumoral 53
UROD	Uroporphyrinogen decarboxylase
VCAM	Vascular cell adhesion molecule
VLA-4	Very late antigen-4
ZEB1	Zinc finger E -box binding homebox 1

RESUMEN

RESUMEN

ESTUDIO DE PERFIL DE EXPRESIÓN GENÉTICA EN MICOSIS FUNGOIDE COMO MARCADOR PRONÓSTICO

Introducción

La micosis fungoide es el linfoma primario cutáneo de células T más frecuente.⁽¹⁾ Se caracteriza por la infiltración de células T tumorales (en la mayoría de los casos linfocitos T helper de memoria CD3⁺ CD4⁺) con epidermotropismo.⁽²⁾ El diagnóstico se basa principalmente en la correlación clínico patológica, y en la presencia o no de clonalidad. Aun así, pueden pasar años desde el inicio de la clínica hasta el diagnóstico definitivo porque la enfermedad puede simular clínica e histológicamente otros procesos inflamatorios y porque su presentación clínico patológica encarna un amplio abanico.⁽³⁻⁵⁾ Puede presentarse como placas, lesiones diseminadas, eritrodermia, tumores, mucinosis folicular, poiquilodermia y un amplio espectro de lesiones clínicas diferentes.⁽⁶⁾

Además de la extensa variedad de presentaciones clínicas e histológicas, el pronóstico de estos linfomas depende entre otros factores de la edad de presentación, la afectación extracutánea o la expresión leucémica.⁽⁷⁻¹²⁾

Inicialmente el paciente presenta manchas o placas y esta forma se considera una micosis fungoide inicial.⁽⁴⁾ La consideración de micosis fungoide avanzada se alcanza cuando el paciente presenta alguno de los siguientes: tumores, eritrodermia, afectación de ganglios, afectación en sangre o metástasis.⁽⁷⁾

El tratamiento varía considerablemente dependiendo del estadio de la enfermedad.⁽¹³⁾ En los estadios iniciales corticoides tópicos y fototerapia pueden ser suficientes para controlar la enfermedad.⁽¹⁴⁾ Conforme progresa la enfermedad, los tratamientos se vuelven más agresivos recurriendo entre otros a quimioterapia, trasplante de médula ósea y terapias biológicas basadas en anticuerpos monoclonales como el anti CCR4 mogamulizumab o el anti CD30 brentuximab-vedotin.^(15, 16) A pesar de todas estas opciones de tratamiento, en la actualidad no tenemos aun terapias efectivas como para conseguir la curación de los pacientes, muchos de los cuales, con formas agresivas de la enfermedad acaban falleciendo. Por lo cual, las diferencias entre la micosis fungoide temprana y las formas avanzadas no sólo se limitan al tratamiento, sino que condicionan enormemente la evolución y probabilidades de supervivencia.

La patogénesis molecular de la micosis fungoide es poco conocida, al igual que la mayoría de vías moleculares responsables de iniciar o facilitar la progresión de esta enfermedad. Sin embargo, hay estudios que resaltan la importancia de la vía PI3K/AKT ya que la expresión de pAKT, p4E-BP1 y p-P70S6K se ha relacionado con riesgo de progresión en micosis fungoide avanzada y por el contrario la expresión de PTEN un inhibidor de PI3K, se relaciona con mejor pronóstico.^(17, 18)

Otros estudios en micosis fungoide avanzada han demostrado relación entre la expresión de ERK, NOTCH y TP53 con peor pronóstico.⁽¹⁹⁻²²⁾ Hasta la fecha sólo un estudio ha intentado relacionar la expresión de ciertas moléculas con riesgo de progresión de micosis fungoide en estadios iniciales, concluyendo que la sobreexpresión de ZEB1 junto con la infraexpresión de Twist en inmunohistoquímica del estudio histológico de las lesiones asociaba menor riesgo de progresión.⁽²³⁾ Aparte de este estudio en el que sólo se tuvieron en cuenta 3 factores de transcripción (ZEB1, Twist y Slug) no se han planteado más estudios de estas características hasta la fecha con un amplio panel de genes.

El mayor problema al que se enfrenta el clínico es que es imposible predecir desde el inicio qué pacientes tendrán un curso crónico e indolente y cuales evolucionarán a formas agresivas.

Aunque la presentación clínica inicial sea la misma, la evolución puede ser muy variable manteniéndose algunos pacientes estables durante años y progresando otros hasta estadios de pronóstico nefasto. Además, el mejor conocimiento de la expresión genética de la enfermedad puede abrir la puerta a nuevas investigaciones que planteen nuevas dianas terapéuticas siendo capaces de individualizar el tratamiento para cada paciente.

Los microarrays de ARN nos permiten estudiar la expresión de miles de genes a la vez. Esta técnica se basa en la hibridación sobre ARN amplificado de la muestra con sondas de ADN marcadas para genes específicos, de tal forma que al leer la intensidad de señal que emiten podemos relacionarlo con el grado de expresión de un determinado gen siendo la unión de las sondas proporcional a la cantidad de ARNm transcrito.^(24, 25)

La tecnología de NanoString puede detectar la expresión de múltiples genes de una forma precisa, reproducible, sensible y específica.⁽²⁶⁻²⁸⁾ Debido a esta especial sensibilidad no es necesario realizar amplificaciones que puedan generar ruido y se obtiene un conteo exacto del número sondas hibridadas del gen a estudio.⁽²⁶⁻²⁹⁾ Es por ello que cuando trabajamos con muestras parafinadas y degradadas con el paso del tiempo es una técnica de elección.^(28, 30)

La hipótesis en la que se basa el presente proyecto de investigación es que existen diferencias de expresión genética medibles entre los pacientes que van a progresar

y los que no desde los estadios iniciales de la micosis fungoide, pudiendo predecir el pronóstico desde el inicio de la enfermedad.

Objetivos

1. Analizar muestras de pacientes con micosis fungoide en estadios iniciales a fin de determinar la frecuencia de genes o vías moleculares diferencialmente expresadas en los pacientes cuya enfermedad progresa a estadios avanzados frente aquellos en los que no.
2. Validar las conclusiones que obtengamos con una muestra control.
3. Proponer marcadores de expresión con valor pronóstico que permita seleccionar pacientes de riesgo desde el inicio de la enfermedad.

Material y métodos

Realizamos un estudio de cohortes históricas con 57 pacientes diagnosticados de micosis fungoide en estadios IA-IIA entre los años 1998-2003 provenientes de: Hospital 12 de Octubre (31), Hospital de la Princesa (4), Hospital Príncipe de Asturias (5), Fundación Alcorcón (1), Hospital Gómez Ulla (5), Hospital Virgen de la Salud (8), Hospital Nuestra Señora de Aránzazu (2), Hospital Virgen del Rocío (1).

Muestras histológicas de pacientes al diagnóstico de micosis fungoide precoz (estadio mancha/placa) se utilizaron a principios de los 2000s para realizar un ensayo de microarrays de ADN complementario utilizando el Onco-Chip® del CNIO que incluía hasta 4982 genes relacionados con cáncer que permitía estudiar la expresión de distintos genes y vías. *Ver Anexo I, pág. 196.*

Sobre esta muestra de pacientes se realizó de forma retrospectiva una recogida de datos evolutivos de los pacientes con una media de seguimiento de 14 años y se formaron dos grupos, aquellos que progresaron con desarrollo de tumores, ganglios, eritrodermia, afectación sanguínea, metástasis (afectación visceral) o muerte a causa del linfoma y aquellos que no progresaron.

Durante el desarrollo del estudio pudimos observar cómo las muestras no eran homogéneas gracias a un análisis mediante un boxplot de datos. *Ver figura 5 pág. 107.* Los microarrays se habían hecho en dos tandas y años diferentes lo que justificaba que las muestras estuviesen divididas en dos poblaciones diferentes. Para solventar esto y poder tener resultados significativos tuvimos que dividir la muestra inicial en dos grupos. El grupo uno estaba constituido por 29 pacientes 10 de los cuales progresaban y el grupo 2 por 28 pacientes con 12 pacientes que progresaban. Estos dos grupos fueron subsecuentemente divididos entre pacientes que progresaban y aquellos que no para los análisis posteriores.

Tras el procesado de los datos se utilizaron un total de 2293 genes que contenían hasta un 80% de información de la n total de los pacientes. *Ver Anexo II, pág. 204.*

Se realizó un estudio de diferencia de expresión genética mediante gráficos de volcán para los eventos: progresión, desarrollo de metástasis, eritrodermia, ganglios, tumores, expresión linfática en sangre, muerte por linfoma y muerte por cualquier causa.

Aunque la expresión aumentada o disminuida de distintos genes proporciona una información relevante, resulta mucho más importante conocer qué vías moleculares están implicadas en estos cambios. La proteína codificada por un gen puede no ser atacable por fármacos pero sí podría serlo otra proteína perteneciente a la misma vía molecular. Para ello se realizó un estudio GSEA de los 2293 genes con cada grupo usando las bases de datos HALLMARK y la base de datos de linfomas del CNIO para observar las diferentes vías sobre o infraexpresadas en progresión versus no progresión.

Para la validación se realizó un estudio de casos y controles con un total de 51 pacientes con micosis fungoide en estadios iniciales provenientes del Hospital 12 de Octubre. Los controles fueron 30 pacientes que no progresaron, diagnosticados de micosis fungoide en estadio IA-IIA entre los años 1993-2009 para asegurar un seguimiento de al menos 13 años. Los casos fueron 21 pacientes que si progresaron, diagnosticados de micosis fungoide en estadio IA-IIA entre los años 1991-2018.

Sobre el ARN extraído de las biopsias parafinadas al diagnóstico se realizó un estudio de expresión genética utilizando la tecnología NanoString con un panel de 97 genes seleccionados. Los resultados se analizaron mediante un gráfico de volcán. *Ver Anexo III, pág. 209.*

En todos los casos los pacientes habían firmado un consentimiento informado.

Resultados y discusión

Respecto a la distribución por sexos de nuestra muestra de estudio, que incluía a los pacientes del grupo 1 y 2, un 54,4% eran mujeres. Esta discreta predominancia femenina en nuestro estudio contradice los datos epidemiológicos conocidos donde se demuestra una mayor incidencia en varones. El ratio de incidencia de micosis fungoide en varones versus mujeres en nuestra muestra fue de 0,85, cuando este mismo ratio en estudios epidemiológicos de EEUU está situado en 1,57.⁽³¹⁾ Esta diferencia puede deberse a algún tipo de sesgo de inclusión o al limitado tamaño muestral.

La edad media al diagnóstico fue de 50 años con una media de 46 años edad en mujeres y 53 años de edad en el caso de los hombres, considerablemente menor a la de las publicaciones conocidas (60 años).⁽¹⁾ Esta diferencia puede deberse a que en centros especializados existe un menor retraso diagnóstico.

La media de tiempo de seguimiento en nuestra serie fue de 13,54 años y la media de tiempo hasta progresión de 10,9 años con un 40,35% de los pacientes que progresaron. Este dato es importante ya que estudios de micosis fungoide temprana acotan sus datos de progresión a 5 años, con cifras aproximadamente de un 16% de progresión.⁽³²⁾ Sin embargo, podemos decir que este tiempo de seguimiento es insuficiente y puede generar la falsa sensación de que son muy pocos los pacientes que progresan cuando casi la mitad de ellos acaban haciéndolo.

El estudio mediante gráficos de volcán en los dos grupos de pacientes (grupo 1 y grupo 2), no pudo demostrar genes diferencialmente expresados de forma significativa para los apartados estudiados (progresión, desarrollo de metástasis, eritrodermia, ganglios, tumores, expresión linfática en sangre, muerte por linfoma y muerte por cualquier causa). *Figuras 14-21, ver pág. 124-128.*

En análisis no supervisado de los mapas de calor (heat map) de los genes más diferencialmente expresados realizados para cada uno de los grupos no mostraron agrupaciones relevantes en ninguno de los dos grupos de estudio. El análisis de genes individuales no dio resultados significativos, aunque destacaba la presencia dentro del heat map de, en el grupo 1 de TP53 sobreexpresado en no progresión e infraexpresado en progresión y en el grupo 2 de SELL, ITGB1 y ITGA4 sobreexpresados en no progresión e infraexpresados en progresión. Además, en ambos mapas de calor se repetían los genes PPP1R3C y PLAGL1. *Figuras 22,23 ver pág. 129-130.*

Debido al número de pacientes limitado en el estudio, el análisis de genes aislados diferencialmente expresados no obtuvo resultado. Más interesante que el estudio de genes aislados es el estudio de vías moleculares diferencialmente expresadas, o enriquecidas. Para ello se realizó un análisis de GSEA (gene set enrichment analysis) que mostró una expresión diferencial en varias vías. *Ver pág. 131 a 137.*

Grupo 1

Vías diferencialmente expresadas en el grupo progresión:

- INFAR1 p = 0,012, NES -1,51, FDR 1. Compuesta por los genes: IFNAR1, JAK1, IFNAR2.
- P53 p = 0,032. NES -1,48, FDR 1. Compuesta por los genes: MDM2, ABCB1, TP53.

Vías diferencialmente expresadas en el grupo no progresión:

- Grupo de genes relacionados con la respuesta a UV $p = 0,007$, NES 1,62, FDR 0,40. Compuesto por los genes: NTRK3, CCNE1, RAB27A, LYN, CEBPG, IL6ST, GAL, PSMC3, RRAD, ATF3, SOD2, BAK1, STIP1, GCH1, BMP2, PRKCD, RFC4, E2F2, IRF1, RASGRP1, BTG3, CDKN1C, ATP6V1F, CHKA, EIF5, POLE3, CDC5, UROD, CDC34, NR4A1, ENO2, JUNB, SLC6A8, DNAJB1, IGFB2, CDK2, PPIF, ABCB1, RXRB, PPT1, SPOP, KIT, MET, EIF5, FURIN.

Grupo 2

Vías diferencialmente expresadas en el grupo progresión:

- CXCR4 $p = 0,000$, NES 1.91 y FDR de 0,027. Compuesta por los genes: BCAR1, PXN, PIK3CA, PTK2, PIK3R1, PRKCA, HRAS, RAF1, CXCL12, PIK3C2G, GNB1.
- ERK5 (MAPK7) $p = 0,035$, NES 1,15, FDR $q = 0,92$. Compuesta por los genes: PIK3CA, PIK3R1, HRAS, RPS6KA1, SHC1.
- AKT $p = 0,049$, NES 1,52, FDR $q = 0,70$. Compuesta por los genes: PIK3CA, PIK3R1, GHR, CASP9, YWHAH.
- Citoquinas $p = 0,034$, NES 1,49 y FDR $q = 0,66$. Compuesta por los genes: SOCS6, SOD2, CCL2.
- PIK 3-CL1 $p = 0,035$, NES 1,39, FDR 0,63 Compuesta por los genes: PIK3CA y PIK3CD.

Vías diferencialmente expresadas en el grupo no progresión:

- Linfocitos $p = 0,000$, FDR 0,31 NES -1,67. Compuesta por los genes: ITGA1, ITGB1, SELL, SELP.
- ERK con una $p = 0,048$, NES -1.48 y FDR $q = 0,93$. Compuesta por los genes: SRC, NGFB, HRAS; IGF1R, RPS6KA1, MYC, EGFR, RAF, SHC1, PDGFRA, GNB1, STAT3, NGFR, ITGB1, GNAS.

En el presente resumen vamos a repasar las más interesantes.

Resultados del estudio mediante GSEA:

La vía CXCR4 $p = 0,000$ sobreexpresada en progresión.

Figura 27 pág 134.

La activación de CXCR4 mediante su ligando CXCL12 estimula la actividad de la tirosin kinasa Scr que activa la vía RAS/MEK/ERK, y como consecuencia se produce la modulación del ciclo celular.⁽³³⁾ En paralelo a estos cambios se produce una migración mediada por la activación de la vía PI3K. PI3K regula la transcripción de genes relacionados con migración y adhesión celular a través de

AKT y varios componentes de adhesión focal.⁽³⁴⁾ Además, CXCR4 también puede activar PLC que produce IP3, que favorece la movilización de calcio intracelular, y PLC también produce DAG que favorece la activación de PKC y MAPK.^(35, 36) Como hemos visto la unión de CXCL12 a su receptor, CXCR4 activa diferentes vías, entre las que destaca PI3K/AKT, RAS/MEK/ERK y proteína kinasa C/MAPK.⁽³⁷⁾ La señalización a través del eje CXCL12-CXCR4 puede ser capaz de regular la migración celular hacia tejidos con expresión de esos ligandos incluyendo ganglios linfáticos, pulmón, hígado y huesos favoreciendo el desarrollo de metástasis.⁽³⁸⁾ A nivel molecular CXCR4 es un factor mediador importante en la interacción del tumor con la matriz extracelular (laminina, fibronectina y colágeno) y esta relación justifica el papel muy relevante en la diseminación y metástasis tumoral en aproximadamente el 75% de todos los cánceres incluyendo varias formas de leucemia.^(37, 39-43)

Estudios en modelos preclínicos de cáncer han demostrado que metástasis en células tumorales están mediadas por la activación de CXCR4 que hace que las células tumorales migren hacia tejidos expresores de CXCL12.⁽⁴⁴⁾ Recientemente un metaanálisis demostró como la sobreexpresión de CXCR4 se relacionaba con peor pronóstico en cánceres hematológicos, de mama, colon, renal, esofágico, ginecológico, pancreático y hepático.⁽⁴⁵⁾ En micosis fungoide la expresión de CXCL12 y CXCR4 es mayor que en sujetos sanos (muestras de piel en sujetos sanos con patología no inflamatoria) y mayor en lesiones tipo mancha/placa que en lesiones tumorales, es decir, esta expresión se pierde en fases avanzadas (tumorales).⁽⁴⁶⁾ Estudios celulares con modelos de células de micosis fungoide y fibroblastos de pacientes de micosis fungoide versus sanos demuestran que las células tumorales expresoras de CXCR4 tienden ser quimiotácticamente atraídas hacia fibroblastos de micosis fungoide secretores de CXCL12.⁽⁴⁷⁾ Estudios en fibroblastos de micosis fungoide han demostrado cómo la expresión de CXCL12 por parte de los fibroblastos protegía a las células tumorales de los efectos citotóxicos de la doxorubicina, pudiendo estar relacionado con resistencia a estos tratamientos.⁽⁴⁷⁾ Si nos centramos solo en CXCL12 su expresión es incluso más interesante ya que alcanza su pico en estadio placa vs tumores o manchas donde se expresa con menor intensidad, se podría decir que el pico de su expresión se encuentra en la fase intermedia de la enfermedad.⁽⁴⁶⁾ Como se puede ver en el heatmap del estudio realizado, aunque la vía CXCR4 estaba enriquecida en progresión, la expresión de CXCL12 estaba inhibida (es decir era mayor en pacientes que no progresaban) lo cual probablemente corresponde con esta pérdida de expresión en fases avanzadas. Figura 24. En cáncer de mama la expresión de CXCL12 se ha asociado con mayor supervivencia, en relación con un mecanismo de secreción autocrino que como consecuencia saturaba el receptor CXCR4 evitando la quimiotaxis hacia tejidos secretores de CXCL12 que actuaran como dianas metastásicas, lo cual podría ser otra explicación de los resultados obtenidos.⁽⁴⁸⁾

Las dinámicas de expresión de citoquinas pueden variar en los distintos estadios tumorales y es posible de CXCL12 sea relevante en la adquisición de una mayor

actividad replicadora en estadios iniciales y por ello su expresión disminuya en fases tumorales o que en estadios avanzados las células proliferen de otro modo y ya no precisen de esta vía para conseguir ventajas de supervivencia. El resultado del **estudio de validación**, aunque con escasa significación estadística (p ajustada $<0,5$) situó la **expresión de CXCL12 y CXCR4 en asociación con no progresión**. *Figura 34 pág. 139*. Lo cual se corresponde con lo observado en el estudio inicial. Lamentablemente en dicho estudio no está recogida la expresión de CXCR4 ya que no existía información suficiente de este gen como para incluirlo en el análisis GSEA.

Otra vía sobreexpresada en progresión fue la vía de citoquinas $p = 0,034$.

Figura 30 pág 135.

Formada por los genes SOCS6, SOD2, CCL2.

CCL2 es uno de los ligandos del receptor CCR4 que ha demostrado tener un papel importante en la generación de metástasis en varios tipos de cáncer. ⁽⁴⁹⁾ CCR4 se expresa de modo natural en las células T reguladoras y que se sabe que su expresión es más alta en los linfocitos T de la micosis fungoide que en los linfocitos normales además en micosis fungoide altas expresiones de CCR4 se relacionan con peor pronóstico y supervivencia.⁽⁵⁰⁾

Una de las moléculas para el tratamiento de la micosis fungoide, mogamulizumab, es el anticuerpo monoclonal humanizado que se une a CCR4.⁽⁵¹⁾ El estudio de validación así mismo demostró que niveles de **expresión de CCR4** (p ajustada $<0,5$) elevados se relacionan con **peor pronóstico**, aunque estos datos no tengan significación estadística el hallazgo tiene significación biológica por lo relatado anteriormente. Lo mismo sucede en la validación con **CCR7 como marcador de progresión** (p ajustada $<0,5$) . *Figura 34 pág. 139*. CCR7 es un receptor de quimiocinas cuyo ligando es CCL21, se ha relacionado con micosis fungoide tumoral, extensión linfática y subcutánea.^(52, 53) La activación de CCR7 induce migración celular a través de la activación de la vía mTOR tal y como sucede en otros tumores. ^(52, 54-56)

La vía AKT $p = 0,049$ y la vía PIK 3-CL1 $p = 0,035$ también se encontraron sobreexpresadas en pacientes que progresaban.

Figura 29 y 31 pág 135 y 137.

Uno de los efectores finales de la vía PI3K/AKT es mTOR que a su vez actúa sobre 4E-BP1 y P70S6K.⁽⁵⁷⁾ La fosforilación por parte de mTOR de 4E-BP1 y P70S6K favorece la proliferación celular.^(58, 59) La sobreexpresión de P70S6K fosforilado se ha detectado en la mayoría de linfomas B de células grandes, así como en linfoma de Hodgkin y linfoma de Burkitt.^(59, 60) En micosis fungoide avanzada la expresión de pAKT, p4E-BP1 y p-p70S6K se asocia con progresión.⁽¹⁷⁾ Y la expresión de la PTEN, inhibidor de la señal PI3K, se corresponde con mejor pronóstico.⁽¹⁹⁾

Estudios in vitro con células de pacientes con síndrome de Sezary y líneas celulares de linfoma cutáneo de células T (LCCT), han demostrado la activación constitutiva de mTOR y la eficacia de la rapamicina (inhibidor de mTOR) inhibiendo la

proliferación celular.^(61, 62) El estudio de **validación** dio a luz a resultados contradictorios, si bien escasamente significativos. Por un lado, se demostró un **aumento de PIK3CA en los pacientes que progresaban** (p ajustada <0,5) lo cual valida la teoría de sobre expresión de PI3K/AKT en progresión, sin embargo, la **expresión de AKT y mTOR se relacionó con no progresión** (p ajustada <0,5). La expresión de **PTEN** también fue evaluada en la validación se relacionó con **progresión** (p ajustada <0,5) . *Figura 34 pág. 139*. Sin embargo, puede que la activación de PI3K como parte superior de la vía ejerza funciones diferentes.

La vía ERK5 (MAPK7) p = 0,035, se encontraba sobreexpresada en pacientes que progresaban mientras que la vía ERK con una p 0,048 se encontraba infraexpresada en los pacientes que no progresaban.

Figura 28 y 33 pág 135 y 138.

ERK, efector final de la vía MAPK, también es capaz de fosforilar 4E-BP1 y existe relación entre su expresión y la presencia de p4E-BP1 en aproximadamente un 50% de las micosis fungoides.^(19, 210) Los resultados de la **validación** mostraron un aumento de la **expresión de MAPK13 y MAPK1 en los pacientes que progresaban** (p ajustada <0,5) . *Figura 34 pág. 139*. Estudios han demostrado que el aumento de la vía RAS/RAF/MEK se puede relacionar con estadios mayores y menores tasas de supervivencia en LCCT.^(20, 21)

Vía de los linfocitos p = 0,000 infraexpresada en pacientes que progresaban.

Figura 32 pág 136.

Compuesta por los genes ITGA, ITGB1, SELL, SELP.

En LCCT se ha demostrado que células del endotelio tumoral presentan mayores cantidades de selectina L (SELL) y se cree que la expresión de SELL puede estar relacionada con el reclutamiento de células CD8 naïve y de memoria en la lesión, pero no así de células CD8 efectoras.⁽⁶³⁾ En micosis fungoide se ha visto como el número de células CD8 efectoras es similar al de los controles sanos, sin embargo en LCCT avanzado, existe una reducción importante del número de CD8, atribuyéndose esta disminución a células CD8 naïve y de memoria.^(63, 64) En el estudio de **validación** se demostró un **aumento de SELL en progresión** (p ajustada <0,5) aunque con limitada significación estadística *Figura 34 pág. 139*.. La función de las selectinas en la progresión o no de la micosis fungoide está por lo tanto aún por dilucidar sin embargo sería interesante profundizar en su estudio, su función sobre los diferentes tipos celulares CD8 y su relación con el pronóstico.

En relación a la presencia de células CD8 y células citotóxicas como marcador de buen pronóstico en micosis fungoide el estudio de validación (*figura 34 pág. 139*.) también demostró:

- **Disminución de expresión de CD8 en los pacientes que progresaban** (p ajustada <0,05). En micosis fungoide la presencia de una mayor de cantidad de CD8+ CD45RO+ en sangre lesional y periférica se correlaciona con un

menor mSWAT y una mayor supervivencia.^(65, 66) La sangre lesional se obtiene de las biopsias diagnósticas y se supone que contiene células residentes de la lesión, células de los capilares y sangre que rebosa de los vasos capilares hacia el área de la lesión.⁽⁶⁵⁾ Esta relación entre la presencia de CD8 y la gravedad de la micosis fungoide puede deberse al efecto antitumoral de las células CD8. Además, mediante inmunohistoquímica se ha demostrado que una alta proporción de CD8 citotóxicos en las lesiones de micosis fungoide suponen un factor de buen pronóstico independiente del estadio.⁽⁶⁴⁾

- **Disminución de expresión de CXCL10 en los pacientes que progresaban** (p ajustada <0,01) y de su receptor **CXCR3** (p ajustada <0,5). La activación del eje CXCL10/CXCR3, ha demostrado facilitar el reclutamiento y extravasación de células CD8+.^(67, 68) Estudios en linfoma cutáneo T han confirmado que la expresión de CXCR3 en células CD4 y CD8 está disminuida respecto a la de controles sanos.⁽⁶³⁾ La disminución de expresión se correlaciona con la carga tumoral y la incapacidad de reclutar células CD8 en las lesiones de micosis fungoide.⁽⁶³⁾

- **Disminución de expresión de IL15 en los pacientes que progresaban** (p ajustada <0.5).

IL 15 es una citocina similar a IL2 con funciones comunes, pero además IL15 es una interleuquina crítica en la supervivencia de células CD8 a diferencia de IL2.^(69, 70) En micosis fungoide se ha demostrado aumento de expresión de IL15 sin asociarse esta expresión a progresión.⁽⁷¹⁾ Sin embargo, puede que su función sobre las células CD8 explique el papel protector observado.

- **Disminución de expresión de PRF1** (p ajustada <0,5) y **NKG2D** (p ajustada <0,5) **en los pacientes que progresaban.** La perforina (PRF1) forma parte del complejo de ataque a la membrana y es esencial para la actividad citotóxica granulo dependiente de linfocitos T y células NK.⁽⁷²⁾ La presencia de PRF1 se ha asociado con mejor pronóstico en varios cánceres.⁽⁷³⁾ NKG2D es un receptor expresado principalmente en células T citotóxicas NK y linfocitos CD8+ que también se ha asociado con buen pronóstico en varios cánceres.^(74, 75)

Vía P53 p = 0,032 se encontraba infraexpresada en los pacientes que progresaban.

Figura 25 pág 132.

TP53 es el gen que codifica la moléculas p53, un supresor de tumoral capaz de bloquear el paso de G1 a S del ciclo celular.^(76, 77)

La mutación de p53 es frecuente en la micosis fungoide y se ha demostrado su asociación con una disminución en la supervivencia global en micosis fungoide avanzada.⁽²²⁾ Sin embargo, hasta ahora no se había demostrado su relación con progresión en micosis fungoide temprana, lamentablemente, en el grupo de **validación TP53 se expresaba en progresión**, pero sin significación estadística.

Figura 34 pág. 139.

Además de lo ya comentado el análisis del grupo de validación nos aportó otros datos importantes. *Figura 34 pág. 139.*

Expresión de CXCL13 sobreexpresada en el grupo de progresión (p ajustada <0,5).

Esta quimiocina cuyo receptor es CXCR5 tiene la función de atraer células B CXCR5 positivas en los linfomas cutáneos.⁽⁷⁸⁾

Reforzando la importancia de las células B en progresión también se demostró la expresión de los marcadores de célula B: **CD79b** (p ajustada <0,05) y **CD79a** (p ajustada <0,5), **CD19** (p ajustada <0,5) **sobreexpresados en el grupo de progresión**. Parece que un aumento de células B en el microambiente tumoral tiene relación con peor pronóstico. Mediante inmunohistoquímica con marcadores CD 20 se demostró que tanto la presencia de altas (>50%) como bajas cantidades (<10%) de células B se ha asociaba con peor pronóstico, si bien los autores no supieron justificar la causa de estas observaciones.⁽⁷⁹⁾

Asimismo, existen casos publicados en la literatura de remisión completa de micosis fungoide tras tratamiento con rituximab.^(80, 81)

En lo relativo a las células T, el estudio del grupo de validación demostró, aunque con baja significación, **expresión de TRBC2** (p ajustada <0,1), **CD4** (p ajustada <0,5), y **CD3G** (p ajustada <0,5) y **CD28** (p ajustada <0,5) **sobreexpresados en el grupo de progresión**.

La expresión de CD4, CD3 y TRBC2 al ser marcadores de célula T puede relacionarse con mayor carga tumoral y de ahí su asociación con peor pronóstico. CD28 por otro lado suele mostrar una función aumentada en micosis fungoide y puede favorecer la proliferación de las células tumorales.^(82, 83)

Conclusiones

Hemos demostrado cómo existen vías diferentemente expresadas desde el inicio de la enfermedad entre los pacientes de micosis fungoide que progresan y los que no.

Existe un aumento de la actividad PI3K en progresión, sin poder demostrar un aumento de la cascada descendente de esta vía (AKT/mTOR). También hay un aumento de la actividad CCL2/CCR4 y de la vía de las MAPK/ERK en progresión. La vía CXCR4 es prometedora, pero son necesarios más estudios para llegar a conclusiones sobre su efecto o no en progresión.

La disminución de la actividad de SELL se ha relacionado con progresión, aunque este dato no se ha podido validar. SELL facilita reclutamiento de células CD8 naïve y

de memoria en la lesión tumoral y habiéndose relacionado disminución de estas poblaciones celulares con la progresión de la micosis fungoide por lo que la disminución de su actividad es consistente con progresión. La validación así mismo ha reforzado la importancia de las células CD8 del microambiente tumoral al mostrar el efecto protector de la cascada CXCL10/CXCR3, de IL15 y de la expresión de CD8.

Respecto al microambiente tumoral la validación, no solo ha demostrado la importancia de las células CD8 como factor de protección, también ha demostrado la importancia de las células B como factor de mal pronóstico/progresión con marcadores como CD79b/CD79a/CD19 y ejes de citoquinas como CXCL13/CXCR5 en asociación con progresión.

El uso de marcadores de células B y CD8 nos permitiría seleccionar a los pacientes de riesgo desde el inicio de la enfermedad mediante el estudio del microambiente tumoral.

ABSTRACT

GENE EXPRESSION PROFILE IN MYCOSIS FUNGOIDES AS A PROGNOSIS MARKER

Introduction

Mycosis fungoides is the most frequent T cell cutaneous lymphoma.⁽¹⁾ Histologically it is characterised by the epidermotropic infiltration of tumor T cells and, in the majority of the cases by lymphocytes T helper CD3+ CD4+.⁽²⁾ Diagnosis is made by clinical and histological correlation as well as the presence/absence of cell clonality. However, diagnosis is not easy and there could be several years of delay since the beginning of the symptoms are identified. This often occurs because the disease can clinically and histologically simulate other inflammatory processes and its clinical pathological presence embodies a wide range of manifestations.⁽³⁻⁵⁾ It can appear as plaques, disseminated lesions, erythroderma, tumors, follicular mucinosis, poikiloderma, and much more.⁽⁶⁾

In addition to the variety of clinical and histological presentations, the prognosis of these lymphomas depends, among other factors, on the age of presentation, extracutaneous involvement or the presence of leukemic expression.⁽⁷⁻¹²⁾

At first the patient presents with patches or plaques and this form is considered an early mycosis fungoides. Consideration of advanced mycosis fungoides is reached when the patient presents any of the following: tumors, erythroderma, lymph node involvement, blood involvement or metastasis.⁽⁷⁾

Along with the progression of the disease the treatment varies considerably.⁽¹³⁾ For early mycosis fungoides, topical corticosteroids or phototherapy could be enough to achieve disease control.⁽¹⁴⁾ As it progresses, treatments become more aggressive, including chemotherapy, bone marrow transplantation and biological therapies based on monoclonal antibodies such as the anti-CCR4, mogamulizumab or the anti CD30 brentuximab vedotin.^(15, 16) Despite all these options of treatment, there is still not an effective therapy for many patients with aggressive forms of the disease, many of which end up dying with these aggressive forms. Therefore, the differences between early mycosis fungoides and advanced forms are not only limited to treatment, but also determine the evolution and survival.

Molecular pathogenesis of mycosis fungoides is not well known due to the majority of molecular pathways involved in initiation and progression of disease. Nonetheless, some studies have shown the relevance of the PI3K/AKT pathway. In advanced mycosis fungoides the expression of pAKT, p4E-BP1 and p-

P70S6K has been generally related to risk of progression and, the expression of PTEN, an inhibitor of PI3K, has been shown to provide a better prognosis.^(17, 18) Other studies in advanced mycosis fungoides have shown the relationship between the expression of ERK, NOTCH and TP53 and a worse prognosis.⁽¹⁹⁻²²⁾ To date there is only one study that has found a connection in the progression of early mycosis fungoides with molecular expression concluding that ZEB1 overexpression together with Twist underexpression, determined by immunohistochemistry in skin samples, was associated with a lower risk of progression. ⁽²³⁾ There have not been similar studies with a wide panel of genes.

The biggest challenge for the clinician is that it is impossible to predict which patients with early stages will evolve to advanced stages of the disease at the time of diagnosis. Even though the clinical presentation can be very similar, the prognosis can be highly variable, some patients will have regression or stable disease for years while others will progress and often eventually die.

Improving our knowledge of the genetic expression of mycosis fungoides can help us not only to predict outcomes but also to find new molecular targets for more individualized therapeutical treatments for each patient.

Microarray technology makes it possible to analyze the expression of thousands of genes from a sample. This technique is based on hybridization of an amplified RNA from a sample with DNA probes labeled for specific genes, in such a way that when reading the intensity of the signal they emit, we can relate it to the degree of expression of a certain gene, since the union of the probes to the RNA is proportional to the amount of mRNA transcribed.^(24, 25)

NanoString technology can detect the expression of multiple genes in a precise, reproducible, sensitive and specific manner, thanks to its special sensitivity and the absence of the need to carry out amplifications that can generate noise, as absolute transcript quantification can be achieved, the use of control samples is thus not required.⁽²⁶⁻²⁹⁾ That is why when using paraffin samples that degrade over time, it is the preferred technique.^(28, 30)

The hypothesis on which this research project is based is that even at the initial stages of mycosis fungoides, there are measurable genetic expression differences between patients who are going to progress and those who are not, being able to predict the prognosis from the beginning of the disease.

Objectives

1. Analyze samples from patients with early mycosis fungoides in order to determine the genes or molecular pathways that are differentially expressed in patients whose disease progresses to advanced stages versus those who do not.
2. Validate the results with a control sample.
3. Propose expression markers with a prognostic value that allows selecting patients at risk of progression since the onset of the disease.

Material and methods

The study performed was of historical cohorts, with 57 patients diagnosed with mycosis fungoides stage IA-IIA between the years 1998-2003. The patients were recruited from: Hospital 12 de Octubre (31), Hospital de la Princesa (4), Hospital Príncipe de Asturias (5), Alcorcón Foundation (1), Gómez Ulla Hospital (5), Virgen de la Salud Hospital (8), Nuestra Señora de Aránzazu Hospital (2), and Virgen del Rocío Hospital (1).

The histological samples from the diagnosis of early mycosis fungoides (patch/plaque) were used in the early 2000s to perform a complementary DNA microarray assay using the CNIO Onco-Chip® that included up to 4,982 genes related to cancer, in order to study the expression of different genes and pathways. *Annex I, page 196.*

The retrospective collection of evolutionary data was carried out on this sample of patients. Patients, with a mean follow-up of 14 years, were divided in two groups, those that progressed with the development of tumors, lymph nodes, erythroderma, blood involvement or metastasis (visceral) or death from lymphoma, and those that did not progress.

During the development of the study a lack of homogeneity of the samples was observed using a data boxplot. *Figure 5 page 107.* The explanation of the differences was based on the batch effect since the microarrays had been done in two different batches and years, hence the samples were divided into two different populations to perform the analysis. Group 1, constituted by 29 patients 10 of which progressed and the group 2 constituted by 28 patients with 12 patients who progressed. These groups were subsequently divided into progression and non-progression for further analysis.

After processing the data, a total of 2293 genes were used, containing up to 80% of the information of the total number of patients. *Annex II, page 204.*

A gene expression difference study was performed using volcano plots for the events: progression, development of metastases, erythroderma, lymph nodes,

tumors, lymphatic expression in blood, death due to lymphoma, and death due to any cause.

Although the increased or decreased expression of different genes provides relevant information, it is much more important to know which molecular pathways are involved in these changes. The protein encoded by a gene cannot be attacked by drugs, but another protein belonging to the same molecular pathway could be. A GSEA study of the 2293 genes was performed with each group using the HALLMARK database and the CNIO lymphoma database to look at the different over- or under-expressed pathways in progression versus non-progression groups.

A case-control study was conducted in order to validate the results. A total of 51 patients with mycosis fungoides in early stages from Hospital 12 de Octubre were recruited. The controls were 30 patients who did not progress, diagnosed with stage IA-IIA mycosis fungoides between the years 1993-2009 to ensure a follow-up of at least 13 years. The cases were 21 patients who did progress, diagnosed with stage IA-IIA mycosis fungoides between the years 1991-2018.

A gene expression study was performed on the RNA extracted from the paraffined samples of the biopsies at diagnosis using NanoString technology. The results were analyzed using a volcano plot. *Annex III, page. 209.*

In all cases, the patients had signed an informed consent.

Results and Discussion

Regarding the distribution by sex of the sample (groups 1 and 2), 54.4% were women. This discreet female predominance in our study contradicts the previously known epidemiological data, which shows a higher incidence in men. The incidence ratio of mycosis fungoides in men versus women in our sample was 0.85, when this same ratio in epidemiological studies in the USA is 1.57.⁽³¹⁾ This may be explained due to some type of inclusion bias or the limited sample size.

The mean age at diagnosis was 50 years with a mean of 46 years of age in women and 53 years of age for men, considerably lower than that of known publications (60 years).⁽¹⁾ This difference may be because in specialized centers the diagnostic delay is shorter.

The mean follow-up time in our series was 13.54 years and the mean time to progression was 10.9 years, with 40.35% of the patients progressing. This data is important since early mycosis fungoides studies limit their progression data to 5 years, with a 16% of progression on their series.⁽³²⁾ However, we can say that this follow-up time is insufficient and can generate the false sensation that very few

patients progress when almost half of them end up doing so.

The study using volcano plots in the two groups of patients (group 1 and group 2), could not show significantly differently expressed genes for the sections studied (progression, development of metastases, erythroderma, lymph nodes, tumors, lymphatic expression in blood, death from lymphoma, and death from any cause). *Figures 14-21, pages 124-128.*

The unsupervised analysis of the heat maps of the most differentially expressed genes performed for each of the groups did not show relevant clusters in either of the two study groups. The analysis of individual genes did not give significant results, although the presence within the heat map of, in group 1 TP53 overexpressed in non-progression and underexpressed in progression and in group 2 of SELL, ITGB1 and ITGA4 overexpressed in non-progression and underexpressed in progression. In addition, the PPP1R3C and PLAGL1 genes were repeated in both heat maps. *Figures 22-23, pages 129-130.*

Due to the limited number of patients in the study, analysis of isolated differentially expressed genes was unsuccessful. More interesting than the study of isolated genes is the study of differentially expressed, or enriched, molecular pathways. To this end, a GSEA (gene set enrichment analysis) analysis was performed, which showed differential expression in several pathways. *See pages 131-137.*

Group 1

Differentially expressed pathways in progression group:

- INFAR1 p = 0,012, NES -1,51, FDR 1. This pathway includes the following genes: IFNAR1, JAK1, IFNAR2.
- P53 p = 0,032. NES -1,48, FDR 1. This pathway includes the following genes: MDM2, ABCB1, TP53.

Differentially expressed pathways in non-progression group:

- Genes related with UV's response p= 0,007, NES 1,62, FDR 0,40. This pathway includes the following genes: NTRK3, CCNE1, RAB27A, LYN, CEBPG, IL6ST, GAL, PSMC3, RRAD, ATF3, SOD2, BAK1, STIP1, GCH1, BMP2, PRKCD, RFC4, E2F2, IRF1, RASGRP1, BTG3, CDKN1C, ATP6V1F, CHKA, EIF5, POLE3, CDC5, UROD, CDC34, NR4A1, ENO2, JUNB, SLC6A8, DNAJB1, IGFB2, CDK2, PPIF, ABCB1, RXRB, PPT1, SPOP, KIT, MET, EIF5, FURIN.

Group 2

Differentially expressed pathways in progression group

- CXCR4 p = 0,000, NES 1.91 y FDR de 0,027. This pathway includes the following genes: BCAR1, PXN, PIK3CA, PTK2, PIK3R1, PRKCA, HRAS, RAF1, CXCL12, PIK3C2G, GNB1.
- ERK5 (MAPK7) p = 0,035, NES 1,15, FDR q 0,92. This pathway includes the following genes: PIK3CA, PIK3R1, HRAS, RPS6KA1, SHC1.
- AKT p = 0,049, NES 1,52, FDR q 0,70. This pathway includes the following genes: PIK3CA, PIK3R1, GHR, CASP9, YWHAH.
- Cytokines p = 0,034, NES 1,49 y FDR q 0,66. This pathway includes the following genes: SOCS6, SOD2, CCL2.
- PIK 3-CL1 p = 0,035, NES 1,39, FDR 0,63 This pathway includes the following genes: PIK3CA y PIK3CD.

Differentially expressed pathways in non-progression group:

- Lymphocytes p = 0,000, FDR 0,31 NES -1,67. This pathway includes the following genes: ITGA1, ITGB1, SELL, SELP.
- ERK con una p = 0,048, NES -1.48 y FDR q 0,93. This pathway includes the following genes: SRC, NGFB, HRAS; IGF1R, RPS6KA1, MYC, EGFR, RAF, SHC1, PDGFRA, GNB1, STAT3, NGFR, ITGB1, GNAS.

In the next summary we will review the most interesting pathways.

CXCR4 pathway p = 0.000 overexpressed in progression group.

Figure 27 page 134.

The activation of CXCR4 by its ligand CXCL12 stimulates the activity of the tyrosine kinase Scr that activates the RAS/MEK/ERK pathway, and as a consequence the modulation of the cell cycle occurs.⁽³³⁾ Simultaneously the activation of PIK3 favors a mediated migration, since PI3K regulates the transcription of genes related to cell migration and adhesion through AKT and various components of focal adhesion.⁽³⁴⁾ In addition, PLC can also be activated, which produces IP3, which favors the mobilization of intracellular calcium, and also PLC produces DAG, which favors the activation of PKC and MAPK..^(35, 36)

The binding of CXCL12 to its receptor, CXCR4, activates different pathways, among which PI3K/AKT and protein kinase C/MAPK stand out.⁽³⁷⁾

The CXCL12-CXCR4 axis may be able to regulate cell migration towards tissues with expression of these ligands, including lymph nodes, lung, liver and bones favoring the development of metastases.⁽³⁸⁾

CXCR4 is an important mediating factor in the interaction of the tumor with the extracellular matrix (laminin, fibronectin and collagen) and this relationship justifies the very relevant role that it has in tumor dissemination and metastasis in approximately 75% of all cancers, including various forms of leukemia.^(37, 39-43)

Preclinical models of cancer have shown that tumor cell metastases are mediated by activation of CXCR4, which causes tumor cells to migrate to CXCL12-expressing tissues.⁽⁴⁴⁾ A recent meta-analysis showed how the overexpression of CXCR4 was related to a worse prognosis in hematologic, breast, colon, kidney, esophageal, gynecologic, pancreatic, and liver cancers.⁽⁴⁵⁾ In mycosis fungoides, the expression of CXCL12 and CXCR4 is higher than in healthy subjects and higher in patch/plaque type lesions than in tumor lesions, essentially, this expression is lost in advanced (tumor) phases.⁽⁴⁶⁾ Cellular studies with mycosis fungoides cells models and fibroblasts from mycosis fungoides patients versus healthy samples demonstrated that CXCR4-expressing tumor cells tend to be chemotactically attracted to CXCL12-secreting mycosis fungoides fibroblasts.⁽⁴⁷⁾ If we focus only on CXCL12, its expression is even more interesting since it reaches its peak in the plaque stage vs tumors or spots where it is expressed with less intensity, it could be said that the peak of its expression is in the intermediate phase of the disease.⁽⁴⁶⁾ Not only that, the expression of CXCL12 by mycosis fungoides fibroblasts protected tumor cells from the cytotoxic effects of doxorubicin, and could be related to resistance to these treatments.⁽⁴⁷⁾

As shown in the heatmap of the study, although the CXCR4 pathway was enriched in progression, the expression of CXCL12 was inhibited (that is, it was higher in patients who did not progress), which probably corresponds to this loss of expression in advanced MF. Figure 24. In breast cancer, the expression of CXCL12 has been associated with increased survival, due to an autocrine secretion mechanism that consequently saturates the CXCR4 receptor, preventing chemotaxis towards CXCL12-secreting tissues that act as metastatic targets, this could be another explanation for the results obtained.⁽⁴⁸⁾

The expression dynamics of cytokines can vary in the different tumor stages and it is possible that CXCL12 is relevant in the acquisition of greater replicative activity in early stages and therefore its expression decreases in tumor stages or that in advanced stages the cells proliferate differently and no longer require this pathway for survival advantage. The result of the **validation study**, although without statistical significance (p adjusted < 0.5), placed the **expression of CXCL12 and CXCR4 in association with no progression**. *Figure 34 page 139*. This corresponds to what was observed in the initial study. Unfortunately, this study does not include the expression of CXCR4 since there was not enough information on this gene to include it in the GSEA analysis.

Another overexpressed pathway in progression group was the cytokine pathway $p = 0.034$.

Figure 30 page 135.

Composed of genes SOCS6, SOD2, CCL2.

CCL2 is one of the CCR4 receptor ligands that has been shown to play an important role in the generation of metastases in various types of cancer. ⁽⁴⁹⁾

CCR4 is naturally expressed on regulatory T cells and its expression is known to be higher in mycosis fungoides T lymphocytes than in normal lymphocytes, furthermore, high expressions of CCR4 in mycosis fungoides are associated with worse prognosis and survival.⁽⁵⁰⁾ One of the molecules for the treatment of mycosis fungoides, mogamulizumab, is the humanized monoclonal antibody that binds to CCR4.⁽⁵¹⁾ The validation study also showed that high levels of **CCR4 expression** (p adjusted <0.5) are related to a **worse prognosis** although these data do not have statistical significance, the finding has biological significance due to what was previously reported. As is the case for the data of CCR7 in the validation group. **CCR7 also stood out as a marker of progression** (p adjusted <0.5). *Figure 34 page 139.* CCR7 is a chemokine receptor whose ligand is CCL21, it has been related to tumoral mycosis fungoides, lymphatic and subcutaneous extension.^(52, 53) The activation of CCR7 induces cell migration through the activation of the mTOR pathway, as occurs in other tumors.^(52, 54-56)

The AKT pathway p = 0.049 and the PIK 3-CL1 pathway p = 0.035 were also found to be overexpressed in patients who progressed.

Figures 29 and 31 pages 135 and 137.

One of the final effectors of the PI3K/AKT pathway is mTOR, which in turn acts on 4E-BP1 and P70S6K.⁽⁵⁷⁾ Phosphorylation by mTOR of 4E-BP1 and P70S6K favors cell proliferation.^(58, 59) Overexpression of phosphorylated P70S6K has been detected in most large B-cell lymphomas, as well as in Hodgkin's lymphoma and Burkitt's lymphoma.^(59, 60)

In advanced mycosis fungoides, the expression of pAKT, p4E-BP1 and p-p70S6K is associated with progression of the disease.⁽¹⁷⁾ And the expression of PTEN, inhibitor of the PI3K signal, corresponds to a better prognosis.⁽¹⁹⁾ Regarding cutaneous lymphomas, in vitro studies with cells from patients with Sezary syndrome and cutaneous T cell lymphoma (CTCL) cell lines have shown the constitutive activation of mTOR and the efficacy of rapamycin, a mTOR inhibitor, inhibiting cell proliferation. celular.^(61, 62)

The **validation** study showed contradictory, although hardly significant, results. On the one hand, **an increase in PIK3CA was shown in progression** (p adjusted <0.5), which validates the theory of overexpression of PI3K/AKT in progression, however, the **expression of AKT and mTOR was related to non-progression** (p adjusted <0.5). **PTEN** expression was also tested for the validation and was related to **progression** (p adjusted <0.5). *Figure 34 page 139.* However, activation of PI3K at the top of the pathway may exert different functions that explain these results.

The ERK5 (MAPK7) pathway, p = 0.035, was overexpressed in patients who progressed, while the ERK pathway, with p 0.048, was underexpressed in patients who did not progress.

Figures 28 and 33 pages 135 and 138.

ERK, the end effector of the MAPK pathway, is also capable of phosphorylating 4E-BP1 and there is a relationship between its expression and the presence of p4E-BP1 in approximately 50% of mycosis fungoides.^(19, 210) The **validation** results showed an increase in the **expression of MAPK13 and MAPK1 in progression** (p adjusted <0.5). *Figure 34 page 139.* Studies have shown that the increase in the RAS/RAF/MEK pathway can be related to higher stages and lower survival rates in CTCL.^(20, 21)

Lymphocyte pathway p = 0.000 underexpressed in progression group.
Composed of the ITGA, ITGB1, SELL, SELP genes.

Figure 32 page 136.

In CTCL, it has been shown that vascular endothelial cells from tumoral mycosis fungoides lesions present higher amounts of L-selectin (SELL) than the endothelium of healthy skin and it is believed that the expression of SELL may be related to the recruitment of naïve and memory CD8 cells in the lesion, but not effector CD8.⁽⁶³⁾ The number of effector CD8 cells is similar to that of healthy controls in mycosis fungoides, however in advanced CTCL, there is a significant reduction in the number of CD8, attributing this decrease to naïve and memory CD8 cells.^(63, 64) In the **validation** study, an **increase in SELL was demonstrated in progression** (p adjusted <0.5) although with limited statistical significance. *Figure 34 page 139.* The role of selectins in the progression of mycosis fungoides is therefore still to be elucidated. However, it would be interesting to study them further, their function on the different CD8 cell types and their relationship with prognosis.

The relevance of the presence of CD8 cells and cytotoxic cells as a marker of good prognosis in mycosis fungoides, was also demonstrated in the validation study. *Figure 34 page 139.*

- **Decreased CD8 expression in patients who progressed** (p adjusted <0.05). The presence of a greater amount of CD8+CD45RO+ in lesional and peripheral blood correlates with lower mSWAT and longer survival in mycosis fungoides.^(65, 66) Lesional blood is obtained from diagnostic biopsies samples and is assumed to contain resident cells of the lesion, cells from the capillaries, and blood that overflows from the capillaries into the area of the lesion.⁽⁶⁵⁾ The relationship between the presence of CD8 and the severity of mycosis fungoides may be due to the antitumor effect of CD8 cells. In addition, immunohistochemistry of mycosis fungoides samples has shown that CD8 is a good prognostic factor independent of the stage of the disease.⁽⁶⁴⁾

- **Decreased CXCL10 expression in patients who progressed** (p adjusted <0.01) and also decreased expression of the CXCL10 receptor **CXCR3** (p adjusted <0.5). Activation of the CXCL10/CXCR3 axis has been shown to facilitate the recruitment and extravasation of CD8+ cells.^(67, 68) Studies in cutaneous T lymphoma have confirmed that the expression of CXCR3 in CD4 and CD8 cells is decreased compared to that of healthy controls.⁽⁶³⁾ This decreased expression correlates with tumor burden and the inability to recruit CD8+ cells into mycosis fungoides lesions.⁽⁶³⁾
- **Decreased IL15 expression in patients who progressed** (p adjusted <0.5). IL 15 is a cytokine similar to IL2 with common functions, but in addition IL15 is a critical interleukin in the survival of CD8 cells, unlike IL2.^(69, 70) In mycosis fungoides, increased expression of IL15 has been shown without this expression being associated with progression.⁽⁷¹⁾ However, its function on CD8 cells may explain the observed protective role.
- **Decreased PRF1** (p adjusted <0.5) and **NKG2D** (p adjusted <0.5) **expression in patients who progressed.** Perforin (PRF1) is part of the membrane attack complex and is essential for the granule-dependent cytotoxic activity of T lymphocytes and NK cells.⁽⁷²⁾ The presence of PRF1 has been associated with a better prognosis in various cancers.⁽⁷³⁾ NKG2D is a receptor expressed mainly on cytotoxic NK T cells and CD8+ lymphocytes which has also been associated with a good prognosis in several cancers.^(74, 75)

TP53 pathway p = 0.032 was underexpressed in progression group.

TP53 is the gene that encodes the p53 molecule, a tumor suppressor capable of blocking the passage from G1 to S in the cellular cycle.^(76, 77)

Mutation of p53 is common in mycosis fungoides and its association with decreased overall survival in advanced mycosis fungoides has been shown.⁽²²⁾ However, until now its relationship with progression in early mycosis fungoides had not been demonstrated, unfortunately, in the **validation study TP53 was expressed in progression**, but without statistical significance. *Figure 34 page 139.*

In addition to what has already been mentioned, the validation study provided us with other important data. *Figure 34 page 139.*

CXCL13 expression is overexpressed in the progression group (p adjusted < 0.5).

This chemokine, whose receptor is CXCR5, has the function of attracting CXCR5-positive B cells in cutaneous lymphomas.⁽⁷⁸⁾

Reinforcing the importance of B cells in progression, the expression of B cell markers was also demonstrated: **CD79b** (p adjusted <0.05) and **CD79a** (p adjusted <0.5), **CD19** (p adjusted <0.5) **overexpressed in the progression group.** It seems

that an increase in B cells in the tumor microenvironment is related to a worse prognosis. Using immunohistochemistry with CD 20 markers, it was shown that the presence of high or low amounts (<10% or >50%) of B cells was associated with a worse prognosis although the authors could not explain the reason behind their observations.⁽⁷⁹⁾ Likewise, there are cases published in the literature of complete remission of mycosis fungoides after treatment with rituximab.^(80, 81)

Regarding T cells, the validation study showed expression of **TRBC2** (p adjusted <0.1), **CD4** (p adjusted <0.5), and **CD3G** (p adjusted <0.5) and **CD28** (p adjusted <0.5) **overexpressed in the progression group**. The expression of CD4, CD3 and TRBC2, being T cell markers, can be related to a higher tumor burden and hence its association with a worse prognosis. CD28, on the other hand, is usually hyperactivated in mycosis fungoides and can favor the proliferation of tumor cells.^(82, 83)

Conclusion

We have shown how there are differently expressed pathways from the onset of the disease between mycosis fungoides patients who progress and those who do not.

An increase in PI3K activity has been shown in progression, conversely there was not an increase in the descending cascade of this pathway in progression. Also, the CCL2/CCR4 activity and the MAPK/ERK pathway was increased in progression. The CXCR4 pathway is promising, but more studies are needed to reach conclusion whether it has some effect or not on progression.

The decrease in SELL activity has been related to progression, although this data has not been validated. SELL facilitates the recruitment of naïve and memory CD8 cells in the tumor lesion and a decrease in these cell populations has been related to the progression of mycosis fungoides, so the decrease in their activity is consistent with progression. Validation has reinforced the importance of CD8 cells in the tumor microenvironment by showing the protective effect of the CXCL10/CXCR3 cascade, IL15 and CD8 expression.

Regarding the tumor microenvironment, the validation study has not only shown the relevance of CD8 cells as a protection factor but also the importance of B cells as a factor of poor prognosis/progression with markers such as CD79b/CD79a/CD19 and cytokines such as CXCL13/CXCR5 in association with progression.

The use of B cell and CD8 markers would allow us to select patients at risk from the onset of the disease by studying the tumor microenvironment.

INTRODUCCIÓN

INTRODUCCIÓN

Micosis fungoide

Definición

Los linfomas son neoplasias derivadas de la proliferación clonal de células maduras e inmaduras de estirpe T, B o NK en varios estadios de diferenciación.⁽⁸⁴⁾

En muchos casos es posible correlacionar la expresión de linfomas B y T con su contrapartida en un estadio normal de diferenciación facilitando su clasificación.⁽⁸⁴⁾

Los órganos frecuentemente afectados son aquellos en los que los linfocitos se hospedan, principalmente en ganglios linfáticos, médula ósea y bazo.⁽⁸⁵⁾ La piel forma parte de los denominados órganos linfáticos secundarios o periféricos y como tal puede desarrollar linfomas primarios (originados en la piel) o secundarios, cuando un linfoma primario no cutáneo tiene expresión cutánea.⁽⁸⁶⁾

Los linfomas cutáneos primarios se definen como linfomas no-Hodking que se manifiestan en la piel sin haber evidencia de enfermedad extracutánea en el momento del diagnóstico.⁽⁸⁷⁾ Este grupo de neoplasias abarca un conjunto heterogéneo de linfomas cutáneos de células T, B y NK.⁽⁸⁶⁾

Dado que la manifestación inicial de estos linfomas es cutánea y realizar una biopsia accesible y escasamente invasivo, el dermatólogo clínico tiene la oportunidad de detectar y tratar precozmente estos procesos.

La incidencia de linfomas cutáneos primarios es muy baja, representando un 3,9% de los linfomas no Hodking.⁽⁸⁸⁾

En los países occidentales los linfomas cutáneos de células T (LCCT) se corresponden con el 75-80% de todos los linfomas cutáneos mientras que los de células B se manifiestan en un 20-25% de los casos, por otro lado los linfomas derivados de células NK son muy infrecuentes.⁽⁸⁹⁾

Centrándonos en los linfomas cutáneos de células T, la micosis fungoide (MF) es el más frecuente y representa aproximadamente el 50% de los casos de linfoma cutáneo.⁽¹⁾ La enfermedad se caracteriza histológicamente por la presencia de una proliferación de linfocitos atípicos medianos o pequeños con núcleo cerebriforme y epidermotropismo.⁽⁸⁷⁾ El síndrome de Sézary (SS) por otro lado, es un linfoma T más agresivo pero mucho menos frecuente, aproximadamente un 5% de los casos, que clínicamente puede guardar similitudes con ciertas manifestaciones de la MF (MF eritrodérmica).⁽⁹⁰⁾

El SS se define como la combinación de eritrodermia, afectación leucémica en sangre (B2) y la presencia en sangre de un clon marcado por el receptor de células T (TCR) idéntico al de la piel.⁽⁹¹⁾ Estudios moleculares demuestran que las células tumorales del SS derivan de las células T centrales de memoria mientras que en la MF son células T efectoras de memoria las que causan el linfoma, lo que ratifica que pese a las similitudes son enfermedades diferentes.⁽¹³⁾

La aparición inicial de los linfocitos malignos en la piel en el caso de la MF se debe a que el linfoma se desarrolla por la transformación maligna de células T post-tímicas con migración cutánea, es decir que se hospedan en la piel.^(90, 92)

El interés de este trabajo se va a dedicar al linfoma primario cutáneo más frecuente: la MF.

Clínicamente la enfermedad pasa por tres estadios que presentan una correlación clínico-patológica.

1. **Manchas/Parches:** Se trata del estadio inicial y las lesiones se manifiestan como máculas o parches eritematosos que pueden aparecer como lesiones únicas o múltiples con diferentes tamaños.⁽⁹³⁾ Es muy característica la afectación de piel no fotoexpuesta como la parte proximal de los muslos o los glúteos, lo que se llama lesiones en bañador.^(5, 94)

Al igual que clínicamente las lesiones pueden ser muy inespecíficas histológicamente, en esta fase el diagnóstico puede ser un reto para el patólogo dado que el infiltrado linfocitario suele ser escaso y se puede confundir con patología inflamatoria benigna.⁽⁵⁾ Usualmente puede verse un infiltrado linfocitario epidermotropo, con atipia linfocítica (núcleos pleomórficos, hiper cromáticos, cerebriformes), acantosis e hiperqueratosis y en algunos casos también incontinencia pigmenti junto con fibrosis de las papilas dérmicas.^(95, 96)

2. **Placas:** Son lesiones infiltradas, bien delimitadas que asocian descamación fina.⁽⁹⁷⁾

En ocasiones pueden adoptar una morfología anular (fungiforme) lo que dio el nombre de micosis fungoide a la enfermedad.

En esta fase cabeza y cuero cabelludo también pueden estar afectas por lo que deben ser áreas a revisar.⁽⁹⁸⁾ Histológicamente la epidermis muestra acantosis con hiperplasia psoriasiforme aunque en raras ocasiones puede haber espongirosis.⁽⁹⁹⁾ La dermis superior muestra un infiltrado linfocitario denso y en banda con linfocitos atípicos con núcleo cerebriforme y marcado epidermotropismo que hasta en un tercio de los casos se manifiesta en forma de microabscesos de Pautrier.⁽⁹⁷⁾ El diagnóstico en esta fase suele ser más sencillo tanto clínica como histológicamente.

3. Tumores: Los tumores aparecen generalmente sobre placas previas y son lesiones papulosas, nodulares o francamente tumorales con infiltración en profundidad que frecuentemente se ulceran.⁽⁹⁹⁾ En este estadio la histología muestra un denso infiltrado linfoide en dermis que puede ir acompañado de pérdida de epidermotropismo junto con linfocitos grandes con núcleo cerebriforme y figuras de mitosis.⁽⁹⁷⁾ El diagnóstico suele ser evidente clínica e histológicamente, aunque debe diferenciarse de otros tumores.

4. Diseminación Cuando la enfermedad se disemina fuera de la piel frecuentemente se afectan los ganglios linfáticos, aparece expresión leucémica en sangre o menos frecuentemente metástasis, principalmente en bazo, hígado, pulmón, hueso y riñón.⁽¹⁰⁰⁾

Cuanto mayor sea el estadio (tumor>placa>mancha) mayor probabilidad de afectación extracutánea.⁽⁹⁹⁾

Evolución histórica

La primera descripción de MF fue dada por Jean-Louis Alibert en 1806 mientras trabajaba en el Hospital Saint Louis de Paris.⁽¹⁰¹⁾ Curiosamente, el mismo hospital donde Albert Sézary describió el SS en 1938.⁽⁹⁰⁾

El nombre dado a la enfermedad, que literalmente significa infección fúngica que recuerda a un hongo/seta, fue dado por la morfología arciforme y tumoral de las lesiones que surgen en el curso de la enfermedad. Sin embargo, hoy en día está claro que no se trata de una infección si no de un linfoma y esta terminología pese a ser equívoca se ha mantenido por motivos históricos.

En 1870, Pierre Antoine Ernest Bazin describe con mayor detalle la MF y habla ya de una fase inicial caracterizada por parches y placas eritematosos, descamativos, persistentes y progresivos localizados en áreas no fotoexpuestas que posteriormente evoluciona a tumores.⁽⁹³⁾

Siguiendo la historia de la MF, en 1885, Auspitz utiliza el término de “granuloma fungoide” para nombrarla porque creía que las lesiones eran producto de una reacción inflamatoria del sistema retículo endotelial.⁽¹⁰²⁾ También en 1885 Vidal y Brocq describen la MF demblée (de inicio), en la cual aparecían lesiones tumorales desde el inicio de la enfermedad.⁽¹⁰³⁾

Posteriormente en 1892, Besnier y Hallopeau describen un estadio premicótico caracterizado por placas eritematosas, así como la MF eritrodérmica.^(100, 102)

Ya en el siglo XX Brocq utiliza el término parapsoriasis para referirse a los parches y placas iniciales de la MF pero esta descripción abarcaba también otras patologías.⁽¹⁰²⁾

Posteriormente se describió la enfermedad en 3 estadios diferenciados, premicótico (eccematoso/en parche), micótico (en placas) y tumoral y además se empezaron a describir variantes clínicas como la reticulosis pagetoide (1939), la variante foliculotrópica (1957) y la granulomatosa (1970).⁽¹⁰²⁾

Durante años se consideró que todos los linfomas cutáneos de células T eran MF, hasta que en 1979 se acuñó el término linfoma cutáneo de células T para referirse a un grupo heterogéneo de linfomas primarios de células T malignas que afectan a la piel de forma primaria, siendo el más frecuente dentro de este grupo la MF.⁽¹⁰³⁾ En ese mismo año Bunn y Lamberg en 1979 proponen un sistema de estadiaje basado en el sistema TNMB (tumor, nodes, metastasis, blood) del National Cancer Institute que se sigue aplicando en la actualidad en la clasificación de la MF.⁽¹⁰⁴⁾

Epidemiología

Desde su descripción inicial ha habido un incremento exponencial del número de casos diagnosticados, probablemente gracias a la mayor precisión y mejores medios diagnósticos. Este incremento se estabilizó hacia 1995 y desde entonces las cifras de incidencia se han mantenido estables.⁽¹⁴⁾ En 2013 se realizó un estudio por el Instituto Nacional del Cáncer de Estados Unidos que cifraba la incidencia de MF en 5,6 casos por millón de personas mientras que la incidencia total de linfoma cutáneo primario es de 10,2 por millón, es decir, aproximadamente la mitad de los casos de linfoma cutáneo primario son MF.^(1, 90) El resto de linfomas cutáneos de células T representan un 25% del total de linfomas cutáneos, quedando reservado otro 25% de linfomas cutáneos para los linfomas cutáneos de células B.⁽¹⁰⁴⁾

Como reflejan estos datos, pese a ser la MF el linfoma cutáneo más frecuente, sigue tratándose de una enfermedad rara por lo que es importante que el clínico esté atento ante la posibilidad de que dermatitis atípicas o recalcitrantes se traten en realidad de MF. Además, en España la incidencia es relativamente alta respecto a otros países con unos 2,6 casos por 100000 habitantes.⁽¹⁰⁵⁾

Los hombres tienen una incidencia mayor que las mujeres con una razón de tasa de incidencia de 1,57, y esta aumenta con la edad siendo el pico máximo a los 70 años.⁽³¹⁾

Los datos epidemiológicos sugieren un comportamiento diferente en la raza negra con una incidencia más elevada (índice de riesgo relativo 1,57), un diagnóstico más temprano, a los 53 años de media vs a los 63 caucásica, y una supervivencia media es menor independientemente del estadio.⁽¹⁾ De forma similar también existe una incidencia mayor en la raza árabe, y esta influencia genética podría justificar el aumento de incidencia en España y otros países mediterráneos respecto a las cifras de Europa y Estados Unidos.⁽¹⁰⁵⁾

Dos tercios de los pacientes presentan MF en estadios tempranos (IA-IIA).⁽¹⁰⁶⁾ En estos casos la supervivencia es mayor a 10 años y el pronóstico general es bueno, aun así, debido a la cronicidad del proceso los pacientes pueden tener una disminución en su calidad de vida debido al dolor, picor y el impacto estético de las lesiones.⁽¹⁰⁷⁾ Un cuarto de los pacientes con MF temprana sufren progresión de la enfermedad empeorando drásticamente el pronóstico y la supervivencia conforme subimos de estadio.^(14, 108)

Hasta en un 85% de los casos de MF existe un retraso diagnóstico desde el inicio de los síntomas hasta que se realiza el diagnóstico, con una media de 3 años.⁽⁴⁾

Esto se debe no solo a que al tratarse de una enfermedad rara y capaz de simular otras dermatosis inflamatorias el clínico puede tardar en sospechar sino que también, como ya hemos visto, histológicamente puede suponer un reto simulando patología benigna, sobre todo en estadios iniciales.

Clasificación

La clasificación ofrecida por la World Health Organization y la European Organization for Research and Treatment of Cancer (WHO-EORTC) en 2005 y posteriormente revisada en 2018 refleja las características de los linfomas cutáneos, incluyendo la MF.⁽¹³⁾

Además la WHO-EORTC destaca 3 variantes con comportamiento clinicopatológico diferente de la MF clásica, estas son: la MF foliculotropa, la reticulosis pagetoide y la piel laxa granulomatosa.⁽⁸⁷⁾

La MF clásica ha sido descrita en la definición.

En este apartado veremos con más detalle las características de los 3 tipos de MF que según la clasificación WHO-EORTC merecen una mención especial.

MF foliculotropa:

Se trata de la variante de MF más frecuente y afecta principalmente a adultos, con predominio del sexo masculino, aunque también se han descrito casos en la infancia y la adolescencia.^(6, 102)

Ya en 1906 Giovannini describió la aparición de áreas de alopecia en placas de MF, y pesar de que su diagnóstico fue de alopecia areata parece razonable pensar que se trataba de una forma de MF foliculotropa.⁽¹⁰⁹⁾

Posteriormente, en 1957, Pinkus detalló la presencia de depósitos de mucina en los folículos pilosos utilizando el término de alopecia mucinosa; lo que se acabó conociendo como mucinosis folicular, proceso que puede ser idiopático o estar asociado por ejemplo a un linfoma cutáneo de células T.⁽¹¹⁰⁾

La MF foliculotropa aparece en el 10% de los casos y se caracteriza por un infiltrado tumoral foliculotro (exocitosis en el epitelio folicular) y asociación con frecuencia de mucinosis folicular.⁽¹³⁾ La alopecia aparece en aproximadamente un 50% de los casos.⁽¹¹⁰⁾

La afectación de las cejas es muy característica, aparece hasta en un 71% de los pacientes y puede estar presente desde etapas iniciales.⁽¹¹¹⁾

Las formas iniciales se presentan como pápulas foliculares, que pueden producir parches de alopecia, además se puede acompañar de lesiones acneiformes, comedones y quistes que se localizan a menudo en la cabeza y el cuello.⁽¹¹¹⁾

Prácticamente el 100% de los pacientes con la forma inicial presentan lesiones en el tronco mientras que la afectación de cabeza y cuello aparece solo en un 40% de los casos y la histología muestra un infiltrado linfocitario menos denso y más superficial que en los casos de formas avanzadas.⁽¹¹⁰⁾

El curso en estos casos suele ser indolente como en la MF clásica.⁽¹¹⁰⁾

Las formas avanzadas forman placas gruesas, alopécicas que muestran un infiltrado de linfocitos denso y profundo y se pueden apreciar nódulos tumorales.⁽¹¹²⁾ En la histología tampoco es infrecuente observar eosinófilos y células plasmáticas.⁽¹¹⁰⁾ Esta forma tiene un curso agresivo, similar al de la MF en fase tumoral, y requiere un tratamiento intensivo.⁽¹³⁾

Clínicamente en estos casos el 100% de los pacientes muestran lesiones en cabeza /cuello y un 20% están localizadas únicamente en esa zona.⁽¹¹⁰⁾ En esta forma la clasificación por estadios TNM no sirve y las placas deben ser manejadas como tumores debido a la agresividad.⁽¹⁰²⁾

Esta variante se asocia generalmente con un importante prurito, que suele ser refractario al tratamiento y más severo en las formas avanzadas que en las tempranas.^(6, 110)

Según la clasificación de la WHO-EORTC existe un subtipo de MF foliculotropa denominado adnexotropa que comparte características con la MF foliculotropa, caracterizada por afectación de las glándulas ecrinas.⁽⁸⁷⁾ Esta forma tiene un curso clínico indolente y afecta frecuentemente a palmas y plantas.⁽¹¹³⁾ Clínicamente se presenta en forma de pápulas y placas eritematosas con acentuación folicular siendo habitual la aparición de anhidrosis y alopecia como consecuencia de la afectación anexial.⁽⁹³⁾

En relación con la MF foliculotropa hay que destacar la entidad de MF con quistes infundibulares eruptivos. Esta variante, que para algunos autores forma parte de la MF foliculotropa, se caracteriza clínicamente por una erupción folicular localizada o generalizada en forma de quistes infundibulares y comedones que incluso pueden simular lesiones tumorales.^(6, 87)

Síndrome de la piel laxa granulomatosa

El síndrome de la piel laxa granulomatosa se considera una variante de MF debido a sus características clínicas, aunque se trata de una variante muy poco frecuente de MF su expresión clínica tan llamativa ha sido lo que le ha otorgado una mención aparte.⁽⁸⁷⁾ El término, acuñado por Ackerman en 1978, se debe a la pérdida de fibras elásticas la cual confiere a la piel un aspecto arrugado similar a la piel laxa.⁽¹⁰²⁾

Durante la enfermedad se desarrollan placas eritematosas en forma de grandes pliegues cutáneos de piel laxa, especialmente en áreas intertriginosas como axilas e ingles.⁽¹³⁾ Otra de las características especiales de esta forma de MF es que afecta con mayor frecuencia a pacientes jóvenes y no es infrecuente la presencia o aparición de un segundo linfoma, sobre todo enfermedad de Hodgkin.⁽⁶⁾

Su curso clínico es indolente, pero tiene una clara tendencia a la recidiva si se realiza extirpación quirúrgica.⁽¹¹⁴⁾

Reticulosis pagetoide

La reticulosis pagetoide, también conocida como enfermedad de Woringer-Kolopp, es una variante rara de MF con muy buen pronóstico de crecimiento lento y curso indolente.⁽¹¹⁵⁾ Clínicamente se caracteriza por la aparición de una placa única, prosiasiforme, hiperqueratósica, eritematosa y arciforme, principalmente en zonas acras.⁽¹¹⁵⁾ Histológicamente se presenta como un infiltrado linfocitario con epidermotropismo.⁽¹³⁾ El tratamiento suele ser la extirpación quirúrgica o la radioterapia local.⁽¹¹⁶⁾

Características clínicas de la MF

La MF clásica se manifiesta inicialmente como manchas o parches eritematosos bien delimitadas, muchas veces en piel no fotoexpuesta, que aunque suelen tener un curso indolente que pueden evolucionar a placas.⁽⁹⁶⁾

Un pequeño grupo de pacientes desarrollará lesiones tumorales de gran tamaño y frecuentemente ulceradas sobre estas placas, en el progreso de la enfermedad también se puede producir afectación sistémica e incluso la muerte del paciente.^(13, 90)

Sin embargo además de la MF clásica existen múltiples variantes de MF capaces de simular una gran cantidad de patología benigna inflamatoria tanto clínica como histológicamente por lo que puede ser una gran imitadora.⁽⁹³⁾

Existen variantes de MF eritrodérmica⁽¹¹⁷⁾, hipopigmentada⁽¹¹⁸⁾, con transformación a células grandes⁽¹¹⁹⁾, ampollar⁽¹²⁰⁾, dishidrótica⁽¹²¹⁾, papular⁽¹²²⁾, purpúrica⁽¹²³⁾, poiquilodérmica⁽¹²⁴⁾, solitaria⁽¹²⁵⁾, ictiosiforme⁽¹²⁶⁾, palmoplantar⁽¹²⁷⁾, verrucosa⁽¹²⁸⁾, pustulosa⁽¹²⁹⁾, papilomatosa ⁽¹³⁰⁾ hiperpigmentada⁽¹³¹⁾, hiperqueratósica⁽¹³²⁾ y granulomatosa⁽¹³³⁾, por citar algunas.

De especial mención son la MF eritrodérmica y la MF transformada.

Micosis fungoide eritrodérmica

La MF eritrodérmica se caracteriza por una afectación como mínimo del 80% de la superficie cutánea y el principal diagnóstico diferencial se realiza con el SS.⁽¹⁾

La historia clínica (presencia previa de manchas o placas indolentes) y la ausencia de afectación hematológica son indicadores MF eritrodérmica.⁽¹³⁴⁾

Raramente es la primera manifestación de la enfermedad, lo más habitual es que aparezca tras el desarrollo de parches/placas que confluyen hasta abarcar una gran extensión corporal y una vez controlada los pacientes vuelven a desarrollar lesiones de MF clásica.⁽⁶⁾ El desarrollo de MF eritrodérmica cambia el estadiaje de la enfermedad y el paciente pasa a tener un T4 dentro de la clasificación TNM.⁽⁹¹⁾

La MF eritrodérmica y el SS, comparten estadificación desde el punto de vista hematooncológico, pero presentan un pronóstico, alteraciones genéticas y una expresión inmunofenotípica distintas.⁽⁶⁾

Una de las diferencias más reseñables que podemos encontrar es la expresión de marcadores de células T centrales de memoria y PD-1 (proteína de muerte celular programada 1 o programmed death receptor-1) en los linfocitos del SS mientras que la MF expresa marcadores de linfocitos T efectores de memoria.⁽¹³⁵⁾ La activación de PD-1 es significativa porque previene la activación de linfocitos T desregulando el sistema inmune, lo que explicaría el curso más agresivo del SS respecto a la MF.⁽¹⁰²⁾

Micosis fungoide con transformación a célula grande

La transformación en un linfoma de células grandes se define por la presencia de linfocitos grandes, pleomórficas, anaplásicas e inmunoblastos en un porcentaje mayor del 25% en el infiltrado neoplásico de la piel o los ganglios linfáticos.⁽⁵⁾

La transformación de MF a célula grande tiene una incidencia de ente 8-23% de los casos en estadio tumoral y se asocia con mal pronóstico.⁽¹³⁶⁾

Esto queda reflejado en una media de supervivencia de 12 a 36 meses desde el diagnóstico y una supervivencia a 5 años del 11-32% de los pacientes.⁽¹⁰²⁾

En la inmunohistoquímica expresión de CD30 es variable por lo que se debe diferenciar de otros linfomas primarios cutáneos con células grandes CD30+, como el linfoma anaplásico de células grandes y la papulosis linfomatoide. La negatividad a CD30 se relaciona con peor pronóstico.⁽⁶⁾

Etiopatogenia

La causa de la MF es desconocida.

En 1974 surgió la teoría de estimulación crónica antigénica como el detonante de una proliferación clonal de células T malignas.⁽¹³⁷⁾ Estos estímulos pueden ser desde infecciones virales, bacterianas hasta factores ocupacionales.⁽¹⁰²⁾ Está claro que el microambiente cutáneo tiene un papel en el desarrollo de MF como pone de relevancia el hecho de que la expansión clonal del gen TCR $\nu\beta$ más frecuentemente detectada sea TRBV20-1 que se asocia con el reconocimiento de *Staphylococcus aureus*.⁽¹³⁸⁾ Además el *S aureus*, ha demostrado ser capaz de actuar como un superantígeno estimulando la proliferación clonal de células T malignas.⁽¹³⁸⁾

No se han encontrado mutaciones heredables que se puedan relacionar con el desarrollo de MF, sin embargo, aunque la mayoría de pacientes no tienen antecedentes de enfermedad cutánea previa, si se ha descrito un aumento del riesgo de desarrollar MF en pacientes con dermatitis crónicas, pudiendo guardar relación con la teoría de los superantígenos.⁽¹⁾

También se ha relacionado con la exposición a factores ambientales como las dioxinas y aceites industriales.^(139, 140) Esta relación se demostró en un estudio de veteranos de la guerra de Vietnam en el que se vio un aumento de la frecuencia de MF en aquellos expuestos a dioxina.⁽¹⁴⁰⁾

Los linfocitos de las lesiones de MF casi siempre muestran el fenotipo CD4 CD45RO+ (marcador de células T efectoras de memoria), así como un aumento de ALC (antígeno linfoide cutáneo) en superficie que está relacionado con la migración a la piel.⁽¹⁴¹⁾ El ALC es un ligando de la molécula de adhesión endotelial de leucocitos de las células endoteliales que ayuda a las células malignas a vascularizar y nutrir el tumor.⁽¹⁰²⁾ Es por eso que hay quien defiende que la MF deriva de células efectoras de memoria ALC+.⁽¹⁴¹⁾

También se alteran las expresiones de quimiocinas. Por ejemplo, inicialmente se expresan receptores de quimiocinas C-C como CCR4 y CCR10, que facilitan la migración a la dermis y la epidermis al igual que lo hacía ALC, pero en estadios

tardíos CCR7 aumenta, lo que se relaciona con la migración de células T de memoria a órganos linfoides y esto se relaciona con lesiones tumorales y potencial afectación extracutánea.⁽¹⁴¹⁻¹⁴³⁾

Otros estudios han demostrado que los linfocitos T malignos expresan ligandos para células presentadoras de antígenos como B7 y CD40 que producen la coestimulación del linfocito T, por lo cual puede inferirse una vía autoecrina en el desarrollo de MF.⁽¹⁴⁴⁾

Es interesante saber también que se produce un cambio en la expresión de citocinas. Los linfocitos T de lesiones en estadios iniciales tienen una diferenciación T efectoras o helper (Th) 1 con secreción de interleuquina (IL) 2 e IL12 e interferón (INF) gamma.⁽¹⁴⁵⁾ Sin embargo, conforme progresa la enfermedad la expresión cambia hacia el fenotipo Th2 con secreción de IL4, 5, 10 y 13.^(146, 147) Secundariamente disminuye la respuesta CD8 y de células dendríticas que eran activadas por los linfocitos Th1. La presencia de linfocitos CD8 + se relaciona con la respuesta inmunológica al tumor, por eso estos cambios hacia Th2 contribuyen a la evasión inmune.⁽¹⁴⁸⁾ Otro fenómeno relacionado con la evasión inmune en estadios avanzados es la pérdida de células T reguladoras marcadas por FOXP3, por el contrario su presencia se relaciona con mejor pronóstico y supervivencia probablemente a través de la supresión tumoral.⁽¹⁴⁹⁾ La evasión inmune también se da en un contexto de linfocitos T hiporreactivos o exhaustos que expresan PD1 o CTLA-4 (cytotoxic T-lymphocyte associated protein 4).^(92, 102) PD1 favorece la tolerancia inmune y CTLA 4 se une a B7 inhibiendo su señal.^(92, 150, 151) El aumento de expresión de CTLA4 se realiza a través de una expresión también incrementada de GATA3.⁽¹⁵⁰⁾

Por otro lado la inmunosupresión de estadios avanzados también se debe al aumento de células T malignas y las alteraciones de la vía janus kinasa (JAK)/ traductor de señal y activador de transcripción (signal transducer and activator of transcription: STAT) que tienen lugar una vez más con el cambio fenotípico de respuesta Th1 a Th2.⁽¹⁾ Figura 1.

En la vía JAK/STAT se produce una disminución de STAT4 (signal transducer and activator of transcription 4), relacionado con la diferenciación Th1, mientras que se incrementa STAT5 (signal transducer and activator of transcription 5) a través de JAK1 (janus kinasa1) y JAK3 (janus kinasa3), aumenta STAT6 (signal transducer and activator of transcription 6) a través de IL4 y aumenta STAT3 (signal transducer and activator of transcription 3) a través de IL7 e IL15.⁽¹⁵²⁾

STAT5 está activo tanto en la MF temprana debido a la acción de las citoquinas Th1 como en la MF tardía dado que su activación posterior se debe a la actividad JAK1/JAK3 independiente de interleuquinas.⁽¹⁵³⁾ STAT5 tiene la capacidad de aumentar miR-155, una molécula de micro ácido ribonucleico (ARN) considerada como el puente que conecta la inflamación y el cáncer.⁽¹⁵³⁾ STAT5 también es

responsable del descenso de STAT4 favoreciendo el cambio fenotípico de Th1 a Th2.⁽¹⁵⁴⁾

STAT6 lleva a cabo la diferenciación hacia Th2 gracias a IL4 e IL13, además induce la activación transcripcional de inmunoglobulina (Ig) E y no podemos olvidar que en estadios avanzados no es infrecuente encontrar aumento de IgE y eosinofilia en sangre.^(5, 155)

Por último, STAT3 aumenta en estadios más tardíos y se relaciona con el aumento de SOCS3 que inhibe la señalización de citoquinas Th2, favoreciendo una vez más esa transición Th1-Th2.⁽¹⁵⁶⁾

En la evolución de la enfermedad también se acaban perdiendo los receptores normales, funcionales, de células T (TCR) lo cual también se traduce en un estado de inmunosupresión.⁽¹⁵⁷⁾ En este contexto se puede comprender como las infecciones oportunistas son una de las causas más frecuentes de muerte por enfermedad.

Es importante recordar que, al disminuir la carga tumoral, mediante tratamientos, estos efectos son reversibles.

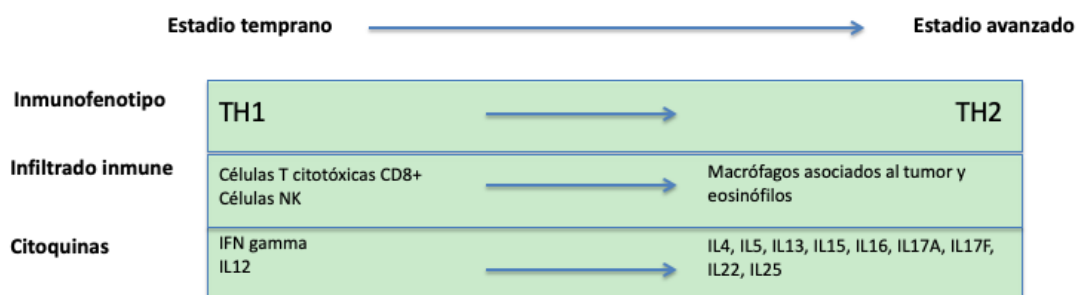


Figura 1: Esquema que muestra la inmunopatogénesis de la MF. Adaptado de Mycosis Fungoides and Sézary Syndrome: An Update. Hematol Oncol Clin North Am. 2019.⁽¹⁾

Existen múltiples alteraciones que pueden ocurrir en el genoma de los tumores que diferencia estas células de las células germinales que originaron inicialmente el organismo (paciente) al que pertenecen. Estas alteraciones se llaman mutaciones somáticas para diferenciarlas de las mutaciones germinales que son heredadas.⁽¹⁵⁸⁾ Las mutaciones somáticas pueden corresponder a sustituciones de una base por otra, inserciones, deleciones de segmentos de tamaño variable, reordenamientos, aumento o disminución en el número de copias.^(157, 158)

Además, existe la posibilidad de adquirir nuevas secuencias de ADN de forma exógena, lo que explica la relación de algunos virus con determinados cánceres

como el virus del papiloma humano, virus Epstein Barr, virus herpes 8 o virus linfotrópico humano T 1.(159) A ese respecto hay estudios en pacientes con MF que demuestran que la seropositividad a citomegalovirus (CMV), es más elevada que en la población normal o inmunocomprometida, sin llegar todavía a haber dilucidado su papel como posible agente oncogénico.(160)

Por otro lado nuestro genoma se puede ver afectado por cambios epigenéticos que alteran la estructura y/o expresión de la cromatina mediante metilaciones o residuos de citosina.(158)

Las alteraciones epigenéticas que se producen por modificación de las histonas son producto de encimas que “escriben” alterando la cromatina, “leen” reconociendo las modificaciones y “borran” eliminando las transformaciones añadidas por las enzimas escritoras.(161)

Las alteraciones genéticas que acompañan a la MF incluyen aberraciones cromosómicas principalmente en los cromosomas 8, 10 y 17, implicando a genes como la proteína tumoral 53 (TP53), MYC (myelocytomatosis oncogene), el inhibidor de la quinasa dependiente de ciclina 2A (cyclin dependent kinase-inhibitor 2A: CDKN2A) y GATA3.(162, 163)

Otras alteraciones frecuentes son las variaciones en el número de copias somáticas (SCNVs) en el 92% de los casos, en contraposición a variaciones somáticas en un solo nucleótido (SSNVs) que son más infrecuentes.(157) Las SCNV consisten principalmente en amplificaciones y deleciones focales que dan lugar a pérdidas hemicigóticas de genes supresores.(161) Este dato es relevante en tanto en cuanto en la mayoría de tumores el proceso mediante el cual se inactivan los genes supresores de tumores es por mutaciones puntuales (SSNV), pero en el caso de la MF la mayoría de las veces se produce por SCNV que conllevan deleciones.(161)

Por ejemplo, TP53, una mutación oncogénica por excelencia, está mutado con mucha frecuencia en linfomas cutáneos con un ratio SCNV/SSNV de 5.1:1, sin embargo en otro tipo de cánceres el ratio encontrado entre deleción y mutación es equivalente.(157, 161) Hay que tener en cuenta, sin embargo, que en MF no leucémica el número de SCNV es menor y muchos de estos estudios se centran en MF avanzada y SS conjuntamente.(157)

Respecto a las SSNV se han descrito mutaciones en miembro de la familia homólogos de Ras A (Ras homolog family member A: RHOA), BRAF, STAT5B (signal transducer and activator of transcription 5 B), CD28, factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células b activadas (nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated b cells: NFKB2), zinc finger E -box binding homebox 1 ZEB1, dominio de interacción rico en AT de la proteína A1 (AT-rich interactive domain-containing protein 1A: ARID1A), FAS y fosfolipasa C gamma 1(PLCG1).(157, 164-167)

Como en otros tumores cutáneos la mayoría (75%) de SSNV son transiciones C-T, en trinucleótidos NpCpG.^(161, 168)

Este es el típico patrón de tumores inducidos por ultravioleta (UV) en relación con envejecimiento y exposición UVB, similar a lo que ocurre en el melanoma.^(82, 169, 170) Esta información curiosamente contrasta con las alteraciones asociadas a linfomas B que suelen ser transversiones T>G.⁽¹⁷⁰⁾

Aunque se especula la relación con UVB epidemiológicamente no existe asociación entre fotoexposición y desarrollo de MF, como destaca el hecho de que la afectación de zonas no fotoexpuestas es característica y frecuente.⁽¹⁶¹⁾ Estas transiciones C-T, que se relacionan con irradiación UVB, ocurren desde estadios iniciales, previos por ejemplo a tratamientos con fototerapia, por lo que pese a la polémica hay autores que descartan que sean consecuencia de los mismos.⁽¹⁷¹⁾

Además de las SCNV se produce una inestabilidad cromosómica favorecida por alteraciones en el ciclo celular, en la reparación del ADN, la activación de endonucleasas RAG e hipermetilación.⁽¹⁾

La activación de las endonucleasas RAG se ha relacionado con el aumento de mutaciones SCNV tan característica de la MF.⁽¹⁶¹⁾ Estas endonucleasas, RAG1 y RAG2, se expresan en los timocitos para catalizar las roturas de doble cadena durante la recombinación V(D)J mediando en el ensamblaje del receptor TCR a partir de segmentos de genes V, D y J.⁽¹⁷²⁾ Actividad que ocurre fisiológicamente durante el desarrollo de los timocitos, es decir infancia/adolescencia.⁽¹⁶⁹⁾ Pero, cuando se activan en el contexto de la MF en células CD4+ maduras las roturas en la doble cadena dan como resultado SCNV y alteraciones estructurales como translocaciones.⁽¹⁵⁷⁾ Alteraciones en la recombinación mediadas por RAG puede explicar las abundantes deleciones focales en la MF. ^(157, 161)

Otro de los fenómenos mutacionales mediante el cual se pueden adquirir un gran número de mutaciones es la cromotripsis o crisis. Se trata de un evento catastrófico por desgaste de los telómeros que obliga a la célula a reorganizar su genoma para sobrevivir con múltiples reordenamientos cromosómicos por rotura de la doble cadena, en unos pocos loci.^(158, 161) La cromotripsis en la MF se da en un elevado porcentaje de casos, hasta en un 65% en comparación a otros tumores y particularmente ocurre en loci relacionados con genes supresores de tumores.^(82, 169)

En el siguiente apartado vamos a detenernos en las **vías moleculares y genes** afectados comúnmente en la MF (figura 2):

- En relación a **ciclo celular, proliferación y supervivencia:**

Una de las mutaciones más frecuentemente encontradas es en **CDKN2A** entorno al 40 - 50% de los casos.^(171, 173)

CDKN2A codifica las proteínas p14ARF y p16INK4A.⁽¹⁷⁴⁾ p16INK4A es capaz de inducir la detención del ciclo celular, y p14ARF induce apoptosis o detención del ciclo celular a través de p53 o doble minuto murino 2 (murine double minute 2, MDM2).⁽¹⁷⁵⁾

Retinoblastoma 1 (RB1) es un gen comúnmente afectado, detectándose ausencia del mismo hasta en un 60% de los casos.⁽¹⁷⁶⁾ RB1 codifica la proteína supresora de tumores RB que está implicada en el paso de G1 a S durante el ciclo celular.⁽¹⁷⁷⁾ En relación a RB, se ha demostrado que P16 se encuentra inactivo en aproximadamente el 20% de los casos y la fosforilación sobre RB por los complejos ciclina D/ Quinasa dependiente de ciclina (CDK) 4 o ciclina D/CDK6 se correlaciona con la ausencia de p16 en MF.^(178, 179) Esta fosforilación tiene como consecuencia el fin del efecto inhibitorio de RB1 sobre el factor de transcripción E2F implicado en el progreso hacia la fase S del ciclo celular.⁽¹⁸⁰⁾ Así mismo podemos afirmar que CDK4 se encuentra sobreexpresado en linfomas cutáneos.⁽¹⁷¹⁾

También se han encontrado alteraciones en genes relacionados en la regulación de la apoptosis como FAS que se encuentra mutado en un 10% de los casos.^(171, 181)

Vía fosfatidil inositol 3 kinasa (phosphoinositide-3-kinase: PI3K)/AKT/ diana de rapamicina en células de mamífero (mammalian target of rapamycin: mTOR).

Se ha descrito un aumento hasta en un 65% de los casos en la expresión de pAKT y mTOR.⁽¹⁹⁾ Sin embargo, pAKT está activado en hasta un 98% de los casos indicando que puede tener su efecto fosforilativo en otras moléculas diferentes a mTOR.⁽¹⁹⁾ Entre los efectos de mTOR destaca la capacidad de inactivar mediante fosforilación, la proteína supresora de tumores: proteína de unión al factor de inicio de la traducción eucariota 4E (eukaryotic translation initiation factor 4E (eIF4E)-binding protein 1, 4E-BP1).⁽¹⁸²⁾ La quinasa regulada por señales extracelulares (extracellular signal-regulated kinase: ERK) también es capaz de fosforilar 4E-BP1 y se ha mostrado correlación entre su expresión en aproximadamente un 50% de las MF y la presencia de p4E-BP1.⁽¹⁹⁾

Volviendo a la vía PI3K/AKT/mTOR, también se ha relacionado con STAT3 siendo posible que, tal y como pasa en otros tumores, sea la encargada de fosforilar STAT3.⁽¹⁹⁾ Mutaciones relacionadas con PI3K se han encontrado en subunidad reguladora 1 de Vía fosfatidil inositol 3 kinasa (phosphoinositide-3-kinase regulatory subunit 1, PIK3R1) en MF.⁽¹⁸³⁾

Esta vía se ha relacionado con el pronóstico de la MF, ya que la expresión de pAKT, p4E-BP1 y p-p70S6K (p70 ribosomal protein S6 kinase) se relaciona con progresión en estadios avanzados.⁽¹⁷⁾ No sólo eso, la expresión de homólogo de fosfatasa y tensina (phosphatase and tensin homolog, PTEN), un

inhibidor de la señal PI3K se relaciona con mejor pronóstico.⁽¹⁹⁾ Se han descrito mutaciones tanto en PTEN y sus proteínas reguladoras como en la vía PI3K/AKT, con implicaciones pronósticas.^(17, 18)

También se ha demostrado incremento en la expresión de cMYC con aumento de cMYC y pérdida de sus antagonistas (MAX interactor 1 MXI1, MAX network transcriptional repressor MNT) en un 75% y un 40% de los casos respectivamente.^(163, 184) La proteína cMYC está implicada en la progresión del ciclo celular a través de CDK4 y E2F, y la represión de p27 y p15.⁽¹⁸⁵⁾ En condiciones de ausencia de factores de crecimiento puede promover apoptosis a través de la liberación del citocromo c de la mitocondria por la vía p14ARF-Mdm2-TP53 gracias a BIM (también conocido como BCL2L11).⁽¹⁸⁶⁾

NOTCH1 es capaz de aumentar la expresión de MYC y se cree que también puede regular PI3K.^(19, 187) La expresión de NOTCH se ha relacionado con progresión o estadios más avanzados (tumoral), tal y como sucede en otras neoplasias hematológicas.^(19, 188)

Vía de las proteínas quinasas activadas por mitógenos (Mitogen-Activated Protein Kinase: MAPK)

BRAF también se encuentra mutado con frecuencia produciendo la activación de la vía MAPK.^(157, 169) La vía de las MAPK está frecuentemente alterada, se han descrito mutaciones en MAPK kinasa 1 (MAP2K1) y neurofibromin 1 (NF1).^(169, 183)

Mutaciones en MAPK1 (mitogen-activated protein kinase 1) curiosamente se han encontrado únicamente en MF y no en SS.⁽¹⁸³⁾ La sobreexpresión de la vía MAPK puede tener relación con el estímulo directo de la vía por parte de IL-2 que como ya sabemos forma parte de la respuesta Th1 predominante en las fases iniciales de la enfermedad.⁽¹⁸⁹⁾

Se han encontrado hasta en un 30% disminución en el número de copias de la proteína quinasa S6 ribosomal alfa 1 (ribosomal protein S6 kinase A1, RPS6KA1).⁽¹⁷¹⁾ Esta molécula es una serina/treonina proteína quinasa que participa de la vía ERK y cuya función es retrasar el paso celular G2/M inducido por factores de crecimiento.⁽¹⁹⁰⁾ Se ha descrito mutaciones en ERK1 (MAPK3) que tienen como consecuencia aumento de función y que pueden producir un aumento en la señalización MAPK.⁽¹⁷⁾

La detección de sobreexpresión de JUN en casos de MF también demuestra la activación de la vía MAPK, proteína relacionada con la transcripción en el núcleo celular.^(17, 191)

Se ha encontrado mutaciones inactivantes de RHOA hasta en el 6-7%.^(157, 171, 183) Esta molécula codifica una GTPasa que se encarga del regular el remodelado del citoesqueleto, la migración y adhesión y la transducción de señal desde varios receptores de linfocitos.⁽¹⁹²⁾ La sobre expresión de RHOA se ha relacionado con la

detención del ciclo celular mediante la alteración del citoesqueleto.(193) También se le relaciona con la vía NF κ B (nuclear factor kappa beta) teniendo la capacidad de actuar tanto inhibiendo como activando esta vía.(194)

- Alteraciones en la célula T (activación, función, diferenciación, migración):

CD28 codifica una proteína de superficie en las células T que se une a CD80 y CD86 en la superficie de células presentadoras de antígenos, activando la expresión de IL-2 y proteínas antiapoptóticas como Bcl-2. (82) La mutación en CD28 tiene como consecuencia un aumento de función por lo que incrementa la afinidad CD86 hiperactivando la expresión de IL-2 secundariamente. Además, la estimulación de CD28 activa múltiples cascadas de señalización como PI3K/AKT, NF κ B, NFAT (nuclear factor of activated T cells) y MAPK que además de aumentar la producción de citoquinas, aumentan la regulación de genes pro-supervivencia celular y regulan el citoesqueleto de actina. (195)

Mutaciones en CD28 muchas veces asocian alteraciones estructurales como fusión de CTLA/CD28 o Costestimulador de células T inducible (inducible T cell costimulator, ICOS)/CD28, que ha demostrado aumentar la actividad de señalización TCR haciendo la unión con CD80 y CD86 más intensa.(1, 195) Además también es frecuente encontrar ganancias focales (71%) y amplificaciones (23%).(195)

En un 10-20% de los casos se pueden encontrar mutaciones en PLCG1, que codifica la fosfolipasa C γ 1 aumentando la actividad fosfodiesterasa a través de la vía NFAT y promoviendo la activación TCR.(164)

La vía de NFAT se encuentra activada en aproximadamente un cuarto de los pacientes sin diferencias entre estadios, y se puede encontrar asociación entre la expresión de NFAT y de NF κ B, lo cual podría deberse a una vía de activación común.(196) Las proteínas de la familia NFAT regulan la activación de las células T, su diferenciación y tienen relación con el desarrollo de los timocitos y la autotolerancia de las células T.(197)

IRF4 codifica un factor de transcripción necesario para la expansión de células T TCR activadas y hasta en un 5% de MF avanzadas se encuentran ganancias en el número de copias.(157, 198)

También se encuentran frecuentes deleciones en PDCD1 (programmed cell death protein 1), el gen que codifica PD-1 una molécula que regula la respuesta inmune adaptativa y la muerte celular programada.(199) Las consecuencias de estas alteraciones son descenso de la señalización, mayor resistencia al agotamiento celular y la activación de NFAT. (82, 157, 183) De hecho la sobreexpresión de la a

proteína de caja de grupo de alta movilidad asociada a la selección de timocitos (thymocyte selection-associated high mobility group box protein: TOX) y de PDCD1 se da desde los estadios iniciales de la enfermedad y puede ayudar a diferenciar dermatosis inflamatorias de MF.⁽²⁰⁰⁾

ZEB1, se encuentra mutado en un 56–65% de los casos, produciendo una disminución en su expresión.^(82, 171) Es un oncogén de tumores epiteliales que codifica un represor de la transcripción de dedo de zinc (zinc finger) y se une con promotores de múltiples genes relacionados con la diferenciación T disminuyendo la expresión de CD4 durante la maduración de las células T.⁽²³⁾ También tiene la función de aumentar la señal del Factor de crecimiento transformante beta 1 (transforming growth factor beta 1, TGF- β 1) y puede contribuir a la resistencia a la supresión de crecimiento por parte de TGF- β 1.⁽¹⁷¹⁾ En ZEB1 se han localizado deleciones y mutaciones puntuales deletéreas funcionalmente que aumentan la expresión de GATA3 y conllevan un aumento de producción de citoquinas como IL2.⁽¹⁵⁷⁾ A parte de IL2 otros genes reprimidos por ZEB1 son BCL6 e IL15.⁽¹⁹⁵⁾ Un reciente estudio ha sido capaz de relacionar la ausencia de ZEB1 mediante inmunohistoquímica en las muestras de paciente con MF con un peor pronóstico y progresión de la enfermedad por lo que su expresión es de especial interés.⁽²³⁾

La vía de señalización NF κ B está frecuentemente afectada en la MF con aumento de su actividad.⁽¹⁷⁾

Esta vía molecular regula la función de la célula T y su activación, produce citoquinas pro inflamatorias, proliferación e inhibición de la apoptosis.^(82, 169, 201)

Uno de los genes frecuentemente mutados en esta vía es **NF κ B2**, con deleciones en el dominio autoinhibidor C terminal, esta mutación conlleva la pérdida del dominio inhibidor de la molécula por lo que queda constitutivamente activada, resultando en el aumento de la señal NF κ B dependiente de TCR.⁽¹⁶⁹⁾

CARD11 (caspase recruitment domain family member 11) es otro gen con frecuentes mutaciones puntuales o aumento en el número de copias que codifica una proteína multidominio intracelular necesaria para la activación de NF κ B mediada por TCR, y sus mutaciones contribuyen a la activación de la vía NF κ B.^(169, 202, 203) PI3K también influye en esta vía gracias al reclutamiento de ITK (IL2 inducible T cell kinase) que activa la quinasas PDK1 (3'-phosphoinositide-dependent kinase-1) que a su vez activa a PKC θ (protein kinase C-theta). PKC θ a su vez fosforila a CARD11 que entonces se une al complejo BCL10-MALT1 (proteína del linfoma del tejido linfoide asociado a mucosas 1) para finalmente activar NF κ B.⁽¹⁹⁵⁾ PKC θ también puede activar la proteína activadora 1 (AP-1), un heterodímero de la familia JUN esencial para activar la transcripción de IL2 y de otros genes relacionados con proliferación de células T.^(195, 204)

PRK θ es el gen encargado de codificar PKC theta y en estadios tardíos de MF se han

detectado hasta un 30% de ganancias en el número de copias.⁽¹⁶⁹⁾

En esta vía también se han implicado mutaciones en la proteína 3 alfa inducida por el factor de necrosis tumoral (TNF alpha induced protein 3: TNFAIP3) un inhibidor de NFKB, con deleciones hasta en el 25% de los linfomas primarios cutáneos.⁽¹⁵⁷⁾

TNFRSF1B (TNF receptor superfamily member 1B) que codifica el receptor TNFR2 (TNF receptor 2) se encuentra mutado hasta en un 18% de los casos.⁽¹⁶⁹⁾ Este receptor activa la vía NFKB en presencia de su ligando TNF α pero mutaciones en TNFR2 producen una activación de NFKB independiente de TNF α .⁽¹⁶⁹⁾ Se han detectado anomalías en relación a la señalización de TNFR2 en aproximadamente el 38% de los casos, con la consecuencia de aumentar la actividad de NFKB.⁽²⁰⁵⁾ Otra mutación recientemente descrita afecta a RLTPR conocido también como CARMIL2 (capping protein regulator and myosin 1 linker 2) que codifica una proteína de andamiaje en la señalización TCR y que aumenta la regulación de la vía NFKB en las células T y la producción de IL2. ⁽¹⁸³⁾

Otras mutaciones detectadas afectan a CSNK1A1 (casein kinase 1 alpha 1) y a PRKCB (protein kinase C beta), ambas parte fundamental de la señalización NFKB en respuesta a receptores de antígenos.⁽¹⁸³⁾

Por último, la vía NFKB también está constitutivamente activada mediante kinasas regulatorias como MAPK kinasa kinasa 7 (MAP3K7) también conocido como TAK1, que se encuentra aumentado en su actividad.⁽²⁰⁶⁾

Mutaciones que alteran las vías de citoquinas son muy frecuentes como las alteraciones de la vía JAK-STAT, que afectan a JAK1, JAK2 (janus kinasa 2), JAK3, STAT3/5B.⁽¹⁷⁾

La vía JAK-STAT está alterada en aproximadamente el 6% de las MF con un aumento de función.⁽¹⁶¹⁾ La activación de esta vía activa diversos procesos de apoptosis, diferenciación y proliferación celular.⁽²⁰⁷⁾ Como hemos visto inicialmente se encuentran activas las vías STAT4 y STAT5 y progresivamente viran hacia STAT3, STAT5, STAT6. Las citoquinas Th2 del microambiente tumoral son efectivas gracias a la preservación de esta vía.⁽¹⁵⁷⁾ Se han encontrado múltiples mutaciones en IL2, IL2R, JAK3, STAT5 implicadas en el aumento de la vía IL2.⁽²⁰⁸⁾

Se han detectado también deleciones en SOCS1 (suppressor of cytokine signaling 1) un inhibidor de JAK.⁽²⁰⁹⁾

CCR4 codifica un receptor de quimioquinas que participa en la migración de las células T a la piel. Mutaciones en CCR4 se relacionan con aumento de migración celular y activación de la vía PI3K/AKT, a través de VAV1.⁽⁸²⁾ VAV1 es necesario para la expresión de ERK, NFKB, PLCG1 a través de PI3K.⁽²¹⁰⁾

En la diferenciación a célula T, se han descrito mutaciones en RARA.⁽¹⁸³⁾

Twist, un factor de transcripción que induce la transición epitelial-mesenquimal y que está implicado en la progresión (metástasis) de otros tipos de cáncer, se ha encontrado serológicamente aumentado en pacientes eritrodérmicos.⁽²¹¹⁾ No sólo eso sino que los linfocitos maduros no expresan esta proteína y sin embargo se ha descrito en estadios avanzados de MF.⁽²¹²⁾ Además su expresión en estadios tempranos junto con la inhibición de ZEB1 se han postulado como factores pronósticos de progresión.⁽²³⁾

- Alteraciones en cromatina:

Se encuentran con frecuencia alteraciones en genes modificadores epigenéticos de ácido desoxirribonucleico (ADN) como DNMT3A (ADN metil transferasa 3A). DNMT3A actúa como un supresor oncogénico y muchas veces se encuentran deleciones y disminución en el número de copias hasta en el 38% de los casos de MF.^(168, 169)

Otra familia de genes mutados con frecuencia son las metiltransferasas de histonas son las lisinas metil transferasas como KMT2C (MLL3), KMT2D, KMT2B.⁽¹⁶⁹⁾ Actúan también como reguladores epigenéticos y supresores de tumores, junto con la proteína de unión a CREB (CREBBP) también afecto por mutaciones que conllevan pérdida de función.^(168, 212)

La lisina demetilasa 6A (KDM6A), otra metiltransferasa de histonas que tiene importantes funciones en en los procesos de senescencia y diferenciación celular, con frecuencia se encuentra mutada con fusiones inactivantes.^(209, 213)

También se ha encontrado alteración en la expresión de deacetilasas de histonas HDAC, lo cual explica la eficacia de inhibidores de deacetilasas como vorinostat en el tratamiento de la MF.^(1, 214)

El correpresor 1 de receptor nuclear (Nuclear Receptor Corepressor 1: NCOR1) está mutado hasta en un tercio de los casos, interactúa con muchos factores de transcripción y actúa mediante el reclutamiento de deacetilasas de histona para reprimir la transcripción.^(195, 208)

Mutaciones inactivantes ARID1A también son frecuentes, hasta en un 10% de los casos.^(157, 171) ARID1A funciona con un supresor de tumores epigenético, con 2 funciones principales, la primera como parte del complejo remodelador de la cromatina SWI/SNF (SWItch/sucrose non fermentable), y también como parte de los puntos de control en el ciclo celular en la detención del ciclo, probablemente a través de p53.^(215, 216)

Se han detectado hasta un 13% de pérdida en el número de copias de CTCF (CCCTC-Binding Factor) un modificador epigenético relacionado con la regulación de varios genes implicados en cáncer.^(169, 183, 217)

Otras mutaciones encontradas en modificadores de la cromatina afectan al correpresor de BCL-6 (BCOR), el regulador dependiente de actina asociado a la matriz relacionado con SWI / SNF del miembro 1 de la subfamilia B de cromatina (SWI/SNF related, matrix associated, actin dependent regulator of chromatin subfamily B, member 1 : SMARCB1), y la proteína asociada al dominio de transformación / transcripción TRRAP (transformation/transcription domain-associated protein).⁽¹⁸³⁾

- **Reparación de DNA:** los genes mutados más representativos de este grupo son **TP53**, ATM.⁽¹⁶⁹⁾

Se han encontrado mutaciones en TP53 (que codifica el gen supresor de tumores p53, capaz de bloquear el paso de G1 a S del ciclo celular) hasta en el 24% de las MF tumorales, sin embargo, estas mutaciones son mucho más infrecuentes en las MF tempranas.^(76, 77, 171, 208) De hecho para algunos autores, estas mutaciones que ocurren principalmente en estadios tardíos de la enfermedad (p53, p16, p15, PTEN) deben ser consideradas como eventos genéticos secundarios que no son parte de la patogenia de la enfermedad.⁽¹⁴¹⁾ Sin embargo otros autores señalan la relevancia de TP53 dado que la presencia de la mutación se asocia con mayor mortalidad.⁽²²⁾

El fenómeno más frecuente en TP53 es la delección con pérdida en el número de copias (hasta 93% en estadios avanzados).^(157, 169, 171) Es interesante recordar que las transiciones C-T, típicas por la radiación ultravioleta son tremendamente frecuentes en TP53 y su presencia se ha relacionado con el tratamiento en estadios iniciales (fototerapia).⁽²⁰⁸⁾

Podemos encontrar delecciones de ATM (ataxia telangiectasia mutated) en hasta en un 30% de las MF avanzadas.^(157, 169)

La relación entre las distintas vías es tremendamente compleja ya que por ejemplo la activación de NFκB o JAK/STAT puede aumentar la señalización MAPK o PI3K/Akt.⁽¹⁷⁾ Así mismo la vía ERK1/ERK2 (MAPK3/MAPK1) puede actuar de forma sinérgica con PI3K/Akt mediante señales que interaccionan con ambas.⁽²¹⁸⁾ La activación de todas estas vías potencian el crecimiento y la supervivencia celular, fundamentales para el desarrollo del linfoma.

Aunque todavía no se dispone de biomarcadores genéticos que podamos utilizar en el diagnóstico y tratamiento, la presencia de delecciones o amplificaciones genéticas se relacionan con niveles de RNA transcrito y abre la puerta nuevas dianas terapéuticas.⁽¹⁵⁷⁾ Tabla 1.

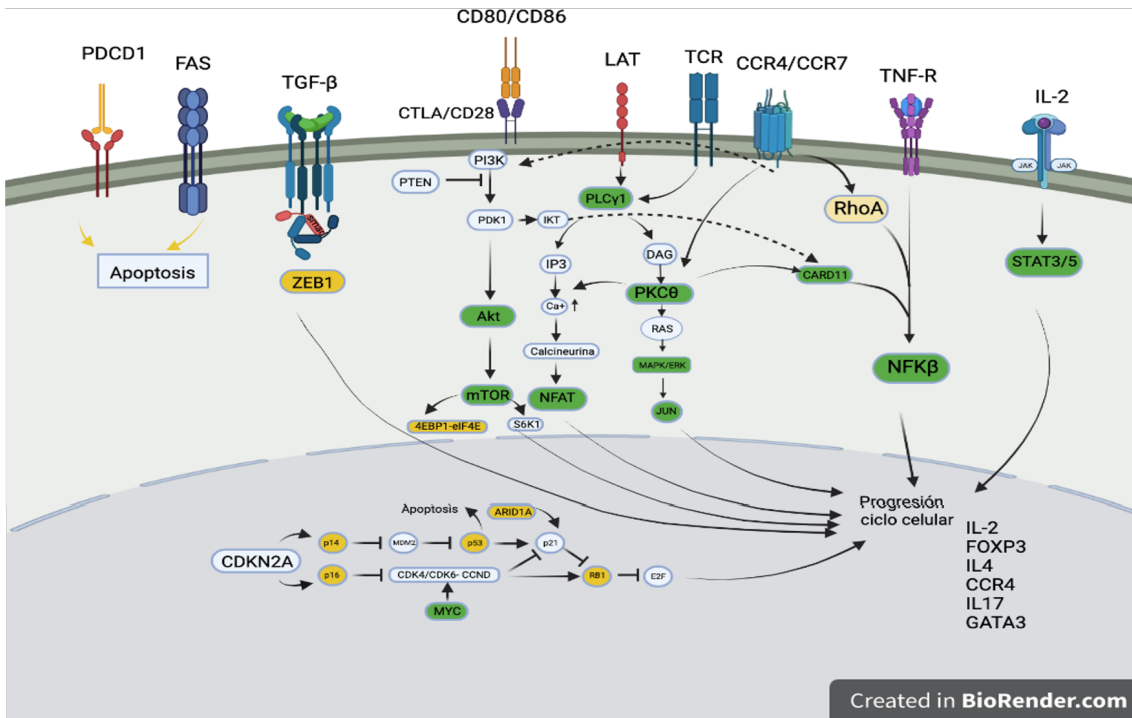


Figura 2: Alteraciones moleculares presentes recurrentemente en MF.

En amarillo, pérdida de función (delección o inactivación), en verde aumento de función (mutación o aumento en el número de copias).

	Terapia	Genes	Mutaciones CNV %	Mutaciones SNV %	Función	Tratamiento
Señalización TCR	Inhibidor ITK o SYK	PLCG1	15%	18%	+	Inhibidores de calcineurina
		PTEN	20%		-	PI3K inhibidor, mTOR inhibidor
		RhoA	6%		-	
		PRKG1	6%		-	
		PRKCQ	30%			
		CARD11	12%	7-22%	+	Inhibidor del proteosoma (Bortezomid)
		TNFAIP3	22%		-	Independiente del proteosoma
		NFKB2	6%		+	Resistente a inhibidor de proteosoma
Coestimulación	Anticuerpos monoclonales	PDCD1	35%		-	
		CD28	12%			Anti CD80/CD86
		Fusión CD28-CTLA4 /CD28-ICOS	4%		+	Ipilimumab
		Notch	100%		+	GSI
Citoquinas		TNFRSF1B (TNFR2)	6%		+	Inhibidor del proteosoma
		TNFRSF6	10%		-	
		CCR4	7%		+	Mogamulizumab
		JAK1	3%		+	Inhibidor de JAK (Tofacitinib/Ruxolitinib)
		JAK3	4%		+	Inhibidor de JAK (Tofacitinib)
		STAT3	3%		+	
		STAT5B	3-63%	3-26%	+	
Remodelado cromatina		ARID1A	20-58%	8-25%	-	
		ARID58	29%		-	
		SMARCC1	21%		-	
		ARID1B	<10%		-	
		ARID2	<10%		-	
		ARID3A	<10%		-	
		SMARCA4	<10%		-	
		CHD3	<10%		-	
		ARID4A	<10%		-	
Factores de transcripción		ZEB1	43-65%	4-27%	-	
		IRF4	5%		+	Lenalidomida
		Myc	40%		+	Inhibidor de BET
Histona metiltransferasa		MLL2	10%		-	
		MLL3	60%	4-57%	-	
		MLL4	18%		-	
		SETD1A	16%		-	
		SETD1B	16%		-	
		SETDB2	22%		-	
		SETD6	11%		-	

	Terapia	Genes	Mutaciones CNV %	Mutaciones SNV %	Función	Tratamiento
Histona demetilasa		KDM6B	50%		-	
Histona acetiltransferasa		CREBBP	5%		-	
Histona deacetilasa	Inhibidores HDAC	NCOR1	50%		-	
ADN metiltransferasa	Agentes hipometiladores	DNMT3A	18%	38%	-	
		DNMT3B	11%		-	
ADN metilación		TET1	10%		-	
		TET2	10%		-	
Ciclo celular		CDKN1B	15%		-	Inhibidor de CDK
		CDKN2A	40-60%	4-17%	-	
		RB1	25%		-	
		TP53	30-95%	16-41%	-	Inhibidor de resistencia a MDM2
		RPS6KA1	36%		-	
		ATR	6%		-	
		FAS	40%	3-19%		
		ATM	30%			

Tabla 1: Vías moleculares mutadas en MF y SS y su relación con la terapéutica.

Adaptado de Mycosis Fungoides and Sézary Syndrome: *An Update*. Larocca C. *Hematol Oncol Clin North Am.* 2019 y *A new molecular paradigm in mycosis fungoides and Sézary syndrome*. Elenitoba-Johnson KS. *Semin Diagn Pathol.* 2017.^(1, 161)

Histología

El dato histológico más importante para diagnosticar una MF es la presencia de un infiltrado de linfocitos atípicos con epidermotropismo disponiéndose en banda a lo largo de la capa basal junto con la formación de agrupaciones intraepidérmicas de éstos mismos (3 o más) en los llamados microabscesos de Pautrier.⁽¹³⁾

Éstos se producen porque los linfocitos malignos se agrupan rodeando a las células de Langerhans dando lugar a los microabscesos.⁽²¹⁹⁾ El infiltrado linfocitario implica linfocitos atípicos con tamaño mediano o pequeño y un núcleo cerebriforme

hipercromático rodeado de un citoplasma claro (células halo) y puede ser un infiltrado parcheado de densidad variable.^(102, 220)

En fases iniciales (mácula/placa fina) se puede confundir con otras dermatosis inflamatorias dado que el infiltrado linfocitario suele ser parcheado, perivascular y el epidermotropismo discreto, sin linfocitos atípicos dado que los linfocitos reactivos suelen ser más numerosos que los tumorales.⁽²²⁰⁾

En la fase de mácula y parches el infiltrado linfocitario en banda puede estar acompañado de células inflamatorias (linfocitos reactivos, células plasmáticas, eosinófilos, macrófagos y células dendríticas) localizadas en dermis papilar y la unión dermoepidérmica puede estar afectada.^(5, 221) Puede haber discreta acantosis, hiperqueratosis, edema o fibrosis en la dermis papilar.⁽²²¹⁾

El epidermotropismo puede ser de células aisladas o en grupos (microabscesos de Pautrier) pero normalmente se hace más evidente conforme el paciente presenta placas más infiltradas, así mismo se aprecia mejor el infiltrado en banda y la presencia de linfocitos atípicos con nucléolos cerebriformes.^(97, 221) También se pueden ver cambios citopáticos como queratinocitos apoptóticos, cuerpos de Civatte y cuerpos coloidales.⁽⁵⁾

En esta fase los microabscesos de Pautrier, están presentes en menos del 25% de los casos, los linfocitos atípicos en menos del 10%, y el epidermotropismo puede estar ausente hasta en un 4% de los casos.⁽⁶⁾

De acuerdo con Wechesler ⁽²²⁰⁾ el diagnóstico diferencial histológico en formas iniciales abarca:

En las formas con necrosis: liquen ampolloso o toxicodermia.

También se puede pensar en toxicodermia en las formas pustulosas que así mismo plantearán el diagnóstico diferencial con una dermatosis neutrofílica o infecciosa.

En las formas con espongiosis descartar fotodermatitis o una dermatitis de contacto. Si por el contrario hay hiperqueratosis se puede confundir con una psoriasis.

En la fase tumoral los cambios histológicos son más evidentes al aumentar claramente la proporción de células tumorales (células pequeñas medianas con nucléolos cerebriformes y células blásticas o anaplásicas con nucléolos prominentes) y la actividad mitótica.^(221, 222) Encontramos un infiltrado de linfocitos atípicos en zonas más profundas de la dermis, por el contrario el epidermotropismo suele estar ausente o ser muy leve.⁽²²²⁾

En esta fase la presencia de células dendríticas reactivas disminuye y los eosinófilos y células plasmáticas suelen estar presentes.⁽²²¹⁾

El examen inmunohistoquímico es una herramienta fundamental en el diagnóstico histológico de los linfomas cutáneos. El fenotipo de la MF es el típico de linfocitos Th2: CD2+, CD3+, CD4+, CD5+, CD45RO+, CD8-, CD30- y TCRβ+.⁽²²²⁾

Si bien hay excepciones, por un lado, durante la progresión de la enfermedad se pueden perder marcadores como CD2, CD5 y CD7 lo que se relaciona con la pérdida del epidermotropismo.^(3, 221)

Por otro se han descrito múltiples variantes, CD4- CD8+, CD4+ CD8+, CD4- CD8-, CD20+, TIA-1 y Granzima B +, CD30+ o CD56+.^(97, 221, 223-227)

Diversos estudios han demostrado un ratio de consenso entre expertos menor al 50% a la hora de hacer el diagnóstico de MF, por eso muchas veces se produce un retraso diagnóstico, son necesarias múltiples biopsias y es imprescindible la correlación y la comunicación clínico-patólogo.⁽²²⁸⁾

Existen cambios histológicos específicos de algunas variantes como la transformación a célula grande, siringotropismo, folioclotropismo... que ya han sido discutidas en la descripción de las mismas.

Diagnóstico

El diagnóstico diferencial de la MF incluye normalmente dermatosis inflamatorias como psoriasis y dermatitis atópica. En estadios de eritrodermia hay que descartar también pitiriasis rubra pilaris, dermatitis sistémica alérgica de contacto, SS, reacciones medicamentosas y eritrodermias idiopáticas.^(3, 229) En las MF eritrodérmicas los hallazgos histológicos muchas veces son inespecíficos y se puede llegar al diagnóstico tras pasar la fase aguda y reaparecer las manchas y placas.⁽²²⁹⁾

Cualquier hallazgo atípico en un paciente con lo que parece una dermatosis inflamatoria como podría ser una dermatitis atópica sin prurito y placas infiltradas, presencia lesiones hipopigmentadas o placas con refuerzo folicular deben hacernos sospechar que pueda tratarse de una MF.^(230, 231)

Ante dermatosis inflamatorias atípicas es fundamental hacer una exploración completa de los pacientes, recordando que áreas no fotoexpuestas como los glúteos son zonas de localización frecuente.⁽⁹³⁾

Como ya hemos visto no sólo a nivel clínico la MF puede simular una dermatosis inflamatoria si no que histológicamente también es una duda frecuente. Por ello ante un cuadro sospechoso es muy probable tener que hacer múltiples biopsias para llegar al diagnóstico.^(1, 6)

La MF atípica (no clásica) es un reto diagnóstico mayor y requiere de un alto grado de sospecha, así como una correcta correlación clínico histopatológica.⁽²³²⁾ Para aumentar el rendimiento de las pruebas, es importante suspender cualquier tratamiento con corticoides al menos 2 semanas antes de realizar la biopsia, se

pueden realizar tomas de varias lesiones intentando incluir siempre una muestra de la lesión más infiltrada y/o de mayor tamaño y evitando las biopsias tipo punch.^(3, 222, 233)

Los estudios moleculares pueden ayudar en el proceso diagnóstico y debe de solicitarse una citometría de flujo para descartar afectación sanguínea.^(93, 234)

Debido a estas dificultades para establecer un diagnóstico, la Sociedad Internacional de Linfomas Cutáneos ha desarrollado un algoritmo de diagnóstico basado criterios clínicos, histopatológicos, inmunohistoquímicos y moleculares.⁽³⁾ Tabla 2.

CRITERIOS	PUNTUACION
Clínica	
Criterio principal: parches y placas persistentes/progresivos	2 puntos si criterio principal + 2 adicionales
Criterio adicional: área no fotoexpuesta poiquilodermia variación en forma y tamaño	1 punto si criterio principal + 1 adicional ²
Histopatología	
Criterio principal: infiltrado linfocitario superficial	2 puntos si criterio principal + 2 adicionales
Criterio adicional: epidermotropismo sin espongiosis atipia linfocitaria (núcleo grande, hipercromático, irregular o cerebriforme)	1 punto si criterio principal + 1 adicional
Biología molecular	
Reordenamiento monoclonal del gen TCRgamma	1 punto si monoclonal
Inmunopatología	
< 50% de células T CD2+, CD3+ o CD5+	1 punto si al menos un criterio
< 10% de células T CD7+	
Discordancia de CD7, CD2, CD3 o CD5 a nivel dermo-epidérmico por pérdida de marcadores a nivel epidérmico	
Si 4 o mas puntos se considera diagnóstico de micosis fungoide	

Tabla 2: Algoritmo diagnóstico de MF en estadios iniciales. Adaptado de *Defining early mycosis fungoides*. Pimpinelli N. *J Am Acad Dermatol*.2005.

El análisis inmunohistoquímico de las células T neoplásicas contribuye al diagnóstico de MF. Habitualmente los linfocitos malignos son T helper CD4+ de memoria (inmunofenotipo CD45RO) con un fenotipo de linfocitos T periféricos epidermotrópicos que incluye los marcadores CD2+, CD3+, CD4+, CD7+ y CD5+. ^(6, 102)

Pero esta expresión se puede perder, el caso más frecuente el de CD26 y CD7.⁽²³⁵⁾ En el caso de CD7 su expresión se puede perder desde estadios tempranos.⁽²³⁶⁾ Su ausencia se considera bastante específica de MF, pero no es diagnóstica de MF ya que también se puede dar en patología inflamatoria.⁽²³⁷⁾

La pérdida de CD26 también es frecuente y aunque parece más específica de MF su expresión se puede perder en linfocitos no tumorales.^(235, 238)

Otros marcadores que pueden perderse son CD2, CD3, CD4 y CD5.⁽²³⁹⁾

Dado que ninguno es específico la propuesta actual para el diagnóstico mediante citometría de flujo consiste en analizar inmunofenotipos aberrantes que incluyan CD3, CD4, CD8, CD7, CD26, y CD45, en lugar de CD4, CD7 y CD26 como se hacía previamente para aumentar la especificidad de la prueba.⁽²⁴⁰⁾

En < 5% de los casos el fenotipo de las células malignas es CD8+, siendo más frecuente que ocurra en la infancia (formas hipopigmentadas).^(241, 242) El comportamiento clínico en las MF CD8+ es superponible a la MF CD4+ lo que lo diferencia del linfoma primario cutáneo CD8+ citotóxico cuyo comportamiento es mucho más agresivo.^(241, 243)

Como ya hemos visto, aunque muy infrecuentemente, en algunos pacientes el fenotipo puede ser CD4- y CD8+, CD4- y CD8-, o CD4+ y CD8+.

La identificación de proliferación clonal es fundamental y tremendamente útil en el diagnóstico, siendo necesario evaluar tanto TRC gamma como beta.⁽²³³⁾

Los genes que codifican el receptor de células T, TCR, están formados por un reordenamiento secuencial de la porción variable (V), de diversidad (D) y de unión (J) cuyas combinaciones en los reordenamientos dan lugar a miles de moléculas TCR.⁽²⁴⁴⁾ Como consecuencia de esas combinaciones cada linfocito tiene un receptor de antígenos único y es extremadamente improbable que dos linfocitos compartan receptor TCR por lo que se supone que la presencia de reordenamientos TCR iguales son el resultado de la proliferación clonal de una célula maligna.⁽²⁴⁵⁾

La ausencia de clonalidad no excluye el diagnóstico sobre todo en los casos de MF en estadio inicial en los que la oligoclonalidad no es extraña.⁽¹³⁸⁾ Además su presencia tampoco lo confirma ya que puede haber clonalidad en dermatosis inflamatorias hasta en un 60% de los casos debido a una estimulación antigénica crónica.⁽²⁴⁶⁻²⁴⁹⁾ Por ejemplo, en enfermedades inflamatorias como liquen plano, pitiriasis liquenoide y liquen escleroso se puede detectar clonalidad.⁽²⁵⁰⁻²⁵²⁾ Cabe destacar que en estudios recientes se ha demostrado que encontrar el mismo gen en dos muestras de localizaciones diferentes es mucho más específico de MF.⁽²⁵³⁾

El reordenamiento T es especialmente útil en casos equívocos en los que es importante diferenciar una MF de patología inflamatoria benigna.⁽⁹³⁾

La detección de clonalidad TCR se puede realizar por técnicas como Southern blot o reacción en cadena de la polimerasa (polimerase chain reaction, PCR), considerándose el Southern blot como el gold estandar por el bajo grado de falsos negativos y positivos, sin embargo, en la práctica real la PCR ha reemplazado a el Southern blot por ser una técnica barata y rápida que requiere de menos tejido tumoral.⁽²⁴⁵⁾ Se trata de una técnica más sensible que se puede utilizar en tejido

parafinado.⁽²⁴⁹⁾

Para evitar falsos positivos en el caso de tener dificultad diferenciando la MF de patología inflamatoria también se puede utilizar el análisis de micro RNA (pequeñas secciones de RNA que regulan la expresión génica) aumentando la precisión más de un 90%.⁽²⁵⁴⁾

Un gran avance en el diagnóstico de la MF es la secuenciación de alto rendimiento, también llamada de nueva generación o secuenciación masiva. Se trata de un método para secuenciar miles a millones de fragmentos de ADN al mismo tiempo para lo cual se utilizan sondas fijadas en placas.⁽²⁵⁵⁾ Aplicado a la clonalidad de la MF se realiza la secuenciación del gen TCRB que permite la identificación de una proliferación clonal a través de la región CDR3 del mismo.⁽²⁵⁶⁾ Esta técnica ha resultado ser más sensible y específica que la PCR, sin embargo, este tipo de análisis no está disponible en todos los centros.^(257, 258)

De todo esto se puede concluir que no existen marcadores celulares ni moleculares que permitan un diagnóstico de certeza de MF sobre todo en fases tempranas.

Diversos estudios han intentado identificar el aumento en expresión génica de hasta 19 genes en lesiones precoces de MF respecto a otras dermatosis inflamatorias como método de ayuda al diagnóstico.⁽⁶⁾ Estos genes son⁽²⁰⁰⁾:

IL23R (interleukin 23 receptor), TAGAP (T cell activation Rho GTPase activating protein), HLADPB2 (major histocompatibility complex, class II, DP beta 2) LY9 (lymphocyte antigen 9), IL18BP (interleukin 18 binding protein), TNFSF13B (TNF superfamily member 13b), IFITM1 (interferon induced transmembrane protein 1), TNFSF10 (TNF superfamily member 10) y LAT (linker for Activation of T cells) relacionados con la regulación inmune.

PYHIN1 (pyrin and HIN domain family member 1), SKAP1 (src kinase associated phosphoprotein 1), GBP2 (guanylate binding protein 2), ETS1 (ETS proto-oncogene 1, transcription factor), AGAP2 (ArfGAP with GTPase domain, ankyrin repeat and PH domain 2), GNGT2 (G protein subunit gamma transducin 2), y PSME2 (proteasome activator subunit 2) relacionados con señalización y transducción celular.

MGAT4A(alpha-1,3-mannosyl-glycoprotein4-beta-N acetylglucosaminyltransferase A), como regulador de la adhesión celular.

PDCD1 que como hemos visto regula la pro-apoptosis.

Por último, TOX es un regulador del desarrollo temprano de las células T durante la transición de CD4+ CD8+ a CD4+.⁽²⁵⁹⁾ En las células T normales después de esta diferenciación el gen es suprimido por lo que los linfocitos CD4+ maduros no lo expresan.⁽²⁰⁰⁾

La expresión de TOX en inmunohistoquímica no es exclusiva y se puede encontrar, aunque con menor intensidad en patología inflamatoria no tumoral.⁽⁸²⁾

De esta lista los genes TOX y PDCD1 son los más relevantes con una sobreexpresión en células de MF detectados por PCR, inmunofluorescencia e inmunohistoquímica, con una sensibilidad del 71.3% para TOX y del 60% para PDCD1 con una especificidad fijada al 100%.⁽²⁰⁰⁾

En la inmunohistoquímica TOX, muestra un patrón de tinción nuclear intensa y difusa, diferente al de las dermatosis inflamatorias.⁽²⁶⁰⁾ Estas células TOX+ muestran núcleos atípicos, y se encuentran en la epidermis, en la dermis papilar, y en las células que conforman los microabscesos de Pautrier.⁽²⁰⁰⁾ Sin embargo el análisis de estos genes no se realiza de rutina en los laboratorios hospitalarios para el diagnóstico de MF.

Estadificación y factores pronósticos

La MF clásica se caracteriza por una progresión lenta con una gran variedad de manifestaciones clínicas. Las lesiones iniciales se presentan como finos parches descamativos presentes durante años que en algunos casos evolucionan lentamente hacia placas y finalmente a tumores.⁽²³⁴⁾

Conforme progresa la enfermedad las lesiones se vuelven más induradas, lo habitual es encontrar lesiones en forma de parches y placas junto a los tumores que pueden llegar a ulcerarse en los pacientes que los desarrollan.⁽¹⁰²⁾

No obstante, la enfermedad puede no evolucionar y muchos pacientes pueden pasar su vida con lesiones tipo manchas/placas sin otra progresión.⁽²⁶¹⁾ Y aunque las lesiones suelen ser persistentes y no desaparecen sin tratamiento la supervivencia a 5-10 años es mayor al 90%.⁽²⁶¹⁾

Conforme evolucionan a los siguientes estadios también se producen cambios dramáticos en el pronóstico.^(262, 263) Los pacientes con tumores normalmente acaban falleciendo en relación con el linfoma muchas veces por sepsis dada la ulceración de los mismos o por el compromiso inmunológico que conlleva la enfermedad. ^(13, 102, 264)

Por lo tanto, el estadio clínico es importante para determinar el riesgo de progresión y la supervivencia media.^(92, 263)

El estadiaje de la MF se basa en el sistema TNM desarrollado en 1979 por Bunn y Lamberg y posteriormente revisado para incluir la afectación sanguínea, TNMB, en 2007 como vamos a ver a continuación.^(234, 265)

T afectación cutánea	
T1	T1a parche/mancha
Manchas, parches, pápulas o placas que abarcan < 10% de la superficie cutánea	T1b placa
T2	T2a parche/mancha
Parches, manchas, pápulas o placas que afectan > del 10% de la superficie cutánea	T2b placa
T3	
1 o mas tumores > 1cm	
T4	
Eritrodermia, eritema > 80% de la superficie cutánea.	
N afectación ganglionar	
N0	
No adenopatías	
N1	N1a clon negativo
Ganglios linfáticos patológicos palpables clínicamente. Histología grado 1 (Dutch) o NCI LN0-2	N1b clon positivo
N2	N2a clon negativo
Ganglios linfáticos periféricos palpables clínicamente. Histología grado 2 (Dutch) o NCI LN3.	N2b clon positivo
N3	
Ganglios linfáticos periféricos palpables clínicamente. Histología grado 3-4 (Dutch) o NCI LN4.	
Nx	
Ganglios linfáticos periféricos palpables clínicamente sin confirmación histológica.	
M afectación visceral	
M0	
Sin afectación	
M1	
Afectación visceral con confirmación histológica	
B afectación sanguínea	
B0	B0a Clon negativo
Sin afectación sanguínea, < 5% de linfocitos atípicos en sangre	B0b Clon positivo
B1	B1a Clon negativo
>5% de linfocitos atípicos en sangre periférica, pero sin cumplir criterios B2	B1b Clon positivo
B2	
Linfocitos atípicos en sangre periférica ≥ de 1000/mL con clonalidad positiva	

Tabla 3: Sistema de estadiaje TNM. Adaptado de *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*

Aunque en la mayoría de los casos la afectación en sangre ocurre en pacientes con eritrodermia, puede ocurrir también cuando sólo hay lesiones tipo mancha/placa y el cambio de B0 a B1 no tiene por qué ir acompañado de cambios en la extensión de la enfermedad.^(91, 266)

En base a la clasificación TNMB tenemos los siguientes estadios con relevancia pronóstica. Tabla 3.

	Estadio	Tumor	Ganglios	Metástasis	Sangre	Supervivencia a 5 años %
Estadio temprano IA-IIA	IA	T1	N0	M0	B0-B1	98
	IB	T2	N0	M0	B0-B1	89
	IIA	T1 o T2	N1 o N2	M0	B0-B1	89
Estadio avanzado IIB-IVB	IIB	T3	N0-N2	M0	B0-B1	56
	IIIA	T4	N0-N2	M0	B0	54
	IIIB	T4	N0-N2	M0	B1	48
	IVA1	T1-T4	N0-N2	M0	B2	41
	IVA2	T1-T4	N3	M0	B0-B2	23
	IVB	T1-T4	N0-N3	M1	B0-B2	18

Tabla 4: Cuadro explicativo de estadiaje y su asociación con la supervivencia. Adaptado de *Survival outcomes and prognostic factors in mycosis fungoides/Sézary syndrome: validation of the revised International Society for Cutaneous Lymphomas/European Organisation for Research and Treatment of Cancer staging proposal. Agar NS. J Clin Onco 2010.(7)*

Un estadio IA tiene una media de supervivencia de 35.5 años y una supervivencia específica de la enfermedad del 90% a 20 años lo cual es un pronóstico excelente.⁽²⁶¹⁾ Sin embargo, existe un 18% de riesgo de progresión a 20 años.⁽⁷⁾

Pacientes con estadio IB tienen una media de supervivencia de 21,5 años y supervivencia por enfermedad de entre 67-85.8%, el riesgo de progresión asciende a 47% a 20 años.^(7, 267)

Pacientes con estadio IIA tienen una media de supervivencia de 15,8 años una supervivencia por enfermedad del 60% y un riesgo de progresión del 41% a 20 años.⁽⁷⁾

Pacientes con estadio IIB tienen una media de supervivencia de 4,7 años, una supervivencia por enfermedad del 57-62% a 5 años y del 29% a 20 años, el riesgo de progresión es del 48% a 5 años y del 71% a 20 años.^(7, 8, 267)

Pacientes con IIIA y IIIB tienen una media de supervivencia de 4.7 y 3.4 años respectivamente y una supervivencia por enfermedad a cinco años de 59,7-67% para el IIIA y 54% para IIIB; a 10 años el riesgo de progresión es del 45% y del 62% a 5 años.^(7, 267, 268)

Los pacientes en estadio IVa1 tienen una supervivencia general a 5 años del 44%-61%.⁽²⁶⁷⁾

Pacientes con estadio IVa2 tiene una media de supervivencia de 2,1 años, una supervivencia por enfermedad del 34% a 5 años y del 20% a 10 años, así como un riesgo de progresión del 77% a 5 años.⁽⁷⁾

Pacientes con un estadio IVB tienen una media de supervivencia de 1,4 años con una supervivencia del 18% a 5 años.⁽⁷⁾

La relevancia pronóstica en pacientes eritrodérmicos sin afectación en sangre (B0) o con una afectación mínima (B1) correspondiente a un estadio IIIA/B todavía no está determinada.⁽⁹¹⁾

Como hemos visto la MF foliculotropa constituye una excepción respecto a los estadios dado que los pacientes con lesiones tempranas tienen una supervivencia a 5 y 10 años del 94-83% y 72% respectivamente.^(112, 269) Sin embargo, en la forma avanzada estos porcentajes bajan a 55% y 28% respectivamente.⁽²⁷⁰⁾

Otros factores pronósticos a tener en cuenta que empeoran la supervivencia y aumentan el riesgo de progresión son edad avanzada, transformación a célula grande, afectación extracutánea, elevación de LDH, el estadio T y estadio B0b sobre el B0a.⁽⁹⁻¹²⁾

Factores pronósticos protectores, es decir relacionados con mejor pronóstico son la presencia de poikilodermia, lesiones hipopigmentadas, asociación con papulosis linfomatoide, presencia de tumores en una región localizada (vs tumores solitarios, regionales o generalizados) y el sexo femenino.⁽⁸⁾

La combinación de 4 factores como son: estadio IV, > 60 años, transformación a célula grande y aumento de LDH da lugar a un modelo de riesgo con una supervivencia a 5 años que varía del 68% en los casos de bajo riesgo a 44% en riesgo intermedio y 28% alto.⁽⁸⁾

Dada la variabilidad en la evolución, uno de los mayores retos en la MF es identificar los pacientes en estadios tempranos en riesgo de progresión. Ha habido estudios que relacionan la carga clonal de células tumorales con la progresión, según los cuales existe una asociación con progresión cuando es mayor al 25%.⁽¹⁾

Uno de los objetivos del presente trabajo es clarificar el riesgo de progresión en

pacientes en estadios tempranos mediante el análisis de expresión génica en las lesiones iniciales.

Tratamiento

El tratamiento de la MF cambia según el estadio con terapias dirigidas a la piel como tratamiento para los estadios precoces y terapias sistémicas, combinables con terapias dirigidas a la piel, para los casos avanzados.⁽¹³⁾

La mayoría de tratamientos raramente son capaces de curar o inducir remisiones a largo plazo por lo que el enfoque es hacia una acción paliativa adaptada a cada paciente y estadio.⁽¹⁴⁾

Las terapias dirigidas a la piel mejoran el prurito, el dolor y la apariencia clínica por lo que pueden usarse tanto en estadios tempranos como avanzados. No hay evidencia que demuestre que un tratamiento agresivo en estadios tempranos aumente la supervivencia.^(14, 90)

Terapias dirigidas a la piel

Uno de los factores más importantes a tener en cuenta al elegir el tipo de terapia es que debemos ajustarnos a las características de cada paciente. Esto significa tener en cuenta el estadio T, el grado de afectación cutánea y superficie corporal, si el paciente vive solo y puede aplicarse productos tópicos (en zonas como la espalda puede ser complicado), o si puede acudir a las sesiones de fototerapia.⁽²⁷¹⁾

Las terapias dirigidas a la piel son de elección en estadios tempranos. Aunque la mayoría de estos pacientes no van a progresar es importante que reciban tratamiento de cara a mejorar su calidad de vida que puede verse afectada por el dolor o picor de las lesiones.⁽¹⁰⁷⁾

Emolientes

Las cremas emolientes pueden ayudar a disminuir el picor y la descamación debido a que reducen la pérdida de agua transepidermica, además se pueden utilizar durante todos los estadios de la enfermedad.^(14, 272)

Corticoides tópicos

Existen pocos estudios clínicos relativos al uso de corticoides tópicos, pero en esos casos la mayor evidencia de remisión (parcial o completa) sobre parches y placas se da al aplicar corticoides de muy alta potencia como el clobetasol.⁽⁹⁰⁾ El clobetasol

propionato ha conseguido tasas de respuesta total del 94% en estadio T1 con una toxicidad prácticamente nula.⁽²⁷³⁾

Agentes alcalinizantes

Se trata de mostaza nitrogenada (mecloretamina tópica) (HN2) y carmustina tópica, agentes alcalinizantes quimioterápicos tópicos que tienen una tasa de respuesta de aproximadamente del 50% en estadios iniciales.^(274, 275) Los efectos adversos más frecuentes son dermatitis de contacto irritativa e hiper e hipopigmentación.^(14, 271) Los efectos secundarios a largo plazo incluyen desarrollo de cáncer de piel no melanoma, como carcinoma basocelular y carcinoma epidermoide.⁽²⁷⁶⁾

Retinoides tópicos

Los retinoides son agentes inmunomoduladores similares a la vitamina A estructuralmente. En MF se han usado retinoides que se unen a los receptores de ácido retinoico como isotretinoína, etretinato y acitretino.⁽²⁷⁷⁾ Sin embargo dentro de los retinoides el más usado es el bexaroteno al 1% cuya unión se realiza de forma selectiva a los receptores de retinoides X ('retinoid') produciendo su activación.⁽⁹⁰⁾ La actividad biológica que tiene es diferente ya que el receptor X tiene múltiples funciones en el proceso celular (apoptosis, diferenciación, proliferación) y ha demostrado disminuir CCR4, E selectina y afectar al tráfico de linfocitos T malignos.⁽²⁷⁸⁾

En estudios in vitro ha probado producir apoptosis en las células tumorales de la MF.⁽²⁷⁹⁾ Ensayos clínicos han evidenciado, en pacientes en estadio I o IIA, una tasa de respuesta del 63% y una tasa de respuesta completa del 21%.⁽²⁸⁰⁾

Con menos evidencia, se utiliza también tazaroteno 0,1% un retinoico que se une a los receptores de ácido retinoico β y γ , con propiedades antiinflamatorias y antiproliferativas.⁽²⁷¹⁾

Imiquimod y resiquimod

Pertenecen al grupo de las imidazoquinolonas y su efecto lo realizan a través de la activación los receptores toll-like (TLR).

El imiquimod tiene como diana TLR7, expresado en las células dendríticas plasmocitoides, células T CD8+ y células NK, cuya activación induce la producción de citoquinas proinflamatorias como IFN α y suprime la expresión de BCL-2 que tiene efectos antiapoptóticos.⁽²⁸¹⁾ Se ha utilizado con buenos resultados en MF en estadio manchas/placas.⁽²⁸²⁾

Resiquimod actúa de una forma similar, pero tiene afinidad por TLR7 y TLR8 por lo que la inducción de citoquinas producidas es diferente y se ha usado con resultados prometedores en linfomas cutáneos T.⁽²⁸³⁾

Fototerapia

Las modalidades de fototerapia que se utilizan son con radiación ultravioleta A (UVA) (320e400 nm) Psoralenos +UVA (PUVA) en combinación con 8-Methoxypsoraleno oral como agente fotosensibilizante y fototerapia con radiación ultravioleta B (UVB) normalmente utilizando banda estrecha (311e312 nm).⁽²⁸⁴⁾ En estadios tempranos producen una alta tasa de remisión con un tiempo variable hasta a la recidiva.^(4, 90) No se recomienda en lesiones tumorales, es más eficaz en estadios mancha/parches.⁽²⁸⁵⁾ El mayor grado de evidencia se encuentra para la terapia PUVA, en estadios en mancha se puede usar UVB pero para placas, MF foliculotropa o fototipos altos la recomendación es usar PUVA debido a que la capacidad de penetrar en la piel es mayor.^(271, 284)

La intensidad y frecuencia de administración se ajustan de acuerdo al fototipo, respuesta y tolerancia del paciente, aunque se recomiendan 3 sesiones semanales.⁽²⁸⁴⁾ Una vez alcanzada la respuesta se suelen dar dosis de mantenimiento.⁽²⁷⁶⁾

Terapia fotodinámica

Se trata de una técnica donde se utiliza luz visible para activar un agente fotosensibilizante aplicado tópicamente, esta reacción genera especies reactivas de oxígeno que causan apoptosis y necrosis en las células tumorales.⁽²⁸⁶⁾

Es una opción terapéutica eficaz en lesiones localizadas, incluso en lesiones tumorales, con buena respuesta y excelente resultado cosmético.^(286, 287)

Radioterapia localizada

Es un tratamiento superficial y localizado con buenos resultados en lesiones individuales con buenos datos de remisión a largo plazo, incluso con terapia a bajas dosis (8Gy), habiendo demostrado ser capaz de eliminar completamente el clon maligno y por lo tanto con capacidad curativa.⁽²⁸⁸⁾ Las dosis de tratamiento oscilan entre 1- 30 Gy y se pueden dar de forma fraccionada.⁽²⁸⁹⁾

Baño de electrones

La terapia del baño de electrones se realiza a través de una irradiación total sobre la piel utilizando electrones con una energía entre 6-12 MeV (megaelectrón voltio).⁽²⁸⁹⁾ Tiene la ventaja frente a los rayos X de que la profundidad de acción se puede controlar modificando la energía de los electrones, utilizando por ejemplo 6 MeV en placas y 12 MeV en tumores.⁽²⁸⁹⁾

Estos electrones que se producen con un acelerador lineal, depositan la mayor parte de su energía en el primer centímetro de tejido y sólo una pequeña parte puede

llegar a los 2 cm de profundidad por lo que no se suelen afectar órganos más allá de la piel.⁽²⁹⁰⁾

La dosis total a aplicar está en torno a los 12 Gray (Gy), con buena tolerancia y ratios de respuesta.⁽²⁹¹⁾ Previamente se usaban dosis totales mayores de 30 a 36 Gy con mayores efectos secundarios entre los que destaca la anhidrosis, alopecia, xerosis y alteraciones ungueales.⁽²⁹²⁾ A largo plazo existe un aumento del riesgo de cáncer cutáneo.⁽²⁹³⁾

Esta terapia se suele utilizar en pacientes en estadio T2, T3, pero también se puede aplicar en pacientes con eritrodermia.⁽¹⁴⁾ Las tasas de respuesta completa a 5 años son de alrededor del 80% en T1-T2.⁽¹⁰⁶⁾ La respuesta en lesiones tumorales suele ser baja con una tasa de respuesta completa del 5% y una respuesta parcial de 10%.⁽²⁹⁴⁾ En los casos de pacientes en T4 se ha reportado una remisión a 5 años del 60%.⁽²⁹⁵⁾

Tratamiento sistémico

Estos tratamientos se realizan normalmente en estadios más avanzados de la enfermedad, aunque en los casos en enfermedad extensa (IB) y fracaso a tratamientos dirigidos a la piel se pueden aplicar.

El objetivo de estos tratamientos es controlar la enfermedad a largo plazo, la sintomatología y evitar complicaciones potencialmente peligrosas.⁽¹⁵⁾

No es infrecuente que los pacientes en estadios avanzados reciban múltiples tratamientos. Existen datos de que al menos un 34% de los pacientes pueden estar recibiendo 4 o más tratamientos.⁽¹⁶⁾

Retinoides

Los retinoides son derivados de la vitamina A. El ácido all trans retinoico, isotretinoína, etretinato, acitretina y bexaroteno han sido utilizados en el tratamiento de la MF desde los años 80.⁽¹⁴⁾

Al igual que pasaba con los tópicos, respecto a la administración oral de retinoides, el bexaroteno, conocido por su nombre comercial como Targretin, sigue siendo el tratamiento más extendido dentro de esta familia y es el único retinoide aprobado para el tratamiento de linfoma cutáneo de células T.⁽²⁹⁶⁾

Bexaroteno 300mg/día ha demostrado una respuesta del 54 y 45% en MF temprana y tardía respectivamente.⁽²⁹⁷⁾ El prurito, que puede ser una consecuencia tremendamente incapacitante de la MF, disminuye en la mayoría de los pacientes tratados lo que se traduce en una mejora en la calidad de vida.^(297, 298)

Su toxicidad principal son las alteraciones metabólicas tanto por aumento de lípidos (triglicéridos y colesterol) como supresión de la función tiroidea por lo que se pueden asociar al tratamiento antilipemiantes y levotiroxina.⁽²⁷⁶⁾ Otros efectos secundarios frecuentes son cefalea y rash cutáneo.⁽²⁹⁹⁾ Su dosis habitual es de 300 mg/m² aunque se inician dosis menores y se aumenta según tolerancia y efectos secundarios.⁽²⁷⁶⁾

Interferón

Los interferones son citoquinas naturales que forman parte de la inmunidad innata y tienen actividad inmunomoduladora, antivírica y supresora de tumores.⁽³⁰⁰⁾

Existen IFN alfa, beta, gamma, épsilon, kappa, omega, delta, tau, limitin, IL-28A), IL-28B, and IL-29 .⁽³⁰⁰⁾ De ellos usamos para el tratamiento de MF el IFNalfa y el INF gamma, aunque es más extendido el uso del INFalfa.⁽³⁰¹⁾ Como hemos visto la MF es una enfermedad que se caracteriza por un desplazamiento de la inmunidad hacia una actividad predominantemente T helper 2 lo que lleva a un aumento de IL-4, IL-5 e IL-10.

IFN- α activa la respuesta antitumoral típica de las células Th1, mediada por los linfocitos CD8+ y células NK suprimiendo la respuesta Th2 y anulando la capacidad de evasión del tumor.^(15, 92, 301)

Su tasa de respuesta total es de alrededor del 60%, sin embargo, aproximadamente la mitad de los pacientes recaen en menos de 8 meses.^(302, 303) La dosis de tratamiento oscila entre 3 a 7 millones de unidades 3 días por semana (según respuesta y tolerancia) y los efectos secundarios abarcan desde síndrome constitucional, hasta supresión de médula ósea (citopenias).^(94, 276, 304)

Antifolatos

Dentro de esta familia se encuentra el metotrexato y el pralatrexato.

Metotrexato es un fármaco antineoplásico e inmunosupresor que inhibe el metabolismo de ácido fólico mediante la inhibición de la dihidrofolato reductasa bloqueando como consecuencia la división celular.⁽³⁰⁵⁾

Las dosis habituales son de unos 20-30mg semanales y se puede ir subiendo según respuesta hasta 50mg/semana.⁽³⁰⁶⁾ Aunque también hay estudios que demuestran su eficacia a dosis bajas(2,5-10mg semanales).⁽³⁰⁷⁾ Los efectos secundarios más frecuentes son citopenias y daño hepático a largo plazo.⁽²⁹⁹⁾

Pralatrexato es un antifolato de aparición reciente con alta afinidad por el portador de folato reducido 1 (RFC-1) que ha conseguido tasa de respuesta objetiva de hasta el 58%.⁽³⁰⁸⁾ Se suele aplicar a dosis de 10-30mg/m² de forma semanal por 3 semanas descansando una luego.^(308, 309) Al ser un antifolato se debe suplementar

con ácido fólico y vitamina B12.⁽³⁰⁸⁾ La mucositis es el efecto secundario más frecuente.^(94, 299)

Quimioterapia

La quimioterapia convencional no se suele considerar como tratamiento de primera línea ya que las respuestas conseguidas con estos tratamientos tienen una duración de unos meses, requiriendo repetir la terapia en el primer año en hasta un 90% de los casos y tampoco ha demostrado aumentar la supervivencia.⁽³¹⁰⁾ Como tratamiento de primera línea conlleva un aumento del riesgo de fallecimiento. Por lo que es una opción terapéutica que se reserva a pacientes con muchas recidivas tras otros tratamientos o en casos de enfermedad agresiva con gran masa tumoral y rápida evolución utilizándose regímenes de tratamiento de linfoma no Hodgking como CHOP (ciclofosfamida, doxorubicina, vincristina, prednisona,).^(16, 94, 311) La quimioterapia con regímenes de tratamiento multiagente como el CHOP ha demostrado inducir inmunosupresión y aumento del riesgo de infecciones consecuentemente, además de por su baja tolerancia, se suele dejar como última opción, tras haber intentado INF, inhibidores de histonas o inmunoterapia.⁽³¹²⁾

En regímenes de monoterapia la doxorubicina liposomal y la gemcitabina son quimioterápicos utilizados con éxito y buena respuesta.^(90, 313, 314) La doxorubicina liposomal pegilada es una variante gracias a la cual se ha podido disminuir en gran medida la toxicidad de la doxorubicina y se ha aumentado su vida media por lo que es el tratamiento quimioterápico para MF que se usa de elección en este momento.⁽³¹⁵⁾

Inmunoterapia

Alemtuzumab es una IgG1 recombinante humanizada contra la molécula CD52 que se expresa en linfocitos B y T malignos y normales.⁽³¹⁶⁾ Es una molécula más efectiva en pacientes con SS pero también se ha utilizado con peores resultados en pacientes con MF.⁽³¹⁷⁾

Uno de los mayores problemas durante la inyección de alemtuzumab es el riesgo de infecciones (2/3 de los pacientes) siendo los cuadros más severos descritos de sepsis por infección bacteriana, reactivación de CMV, neumonía por *Pneumocystis jirovecii* e infecciones invasivas por hongos infecciones que muchas veces se asocian a neutropenia.⁽³¹⁶⁾ Por ello junto con el tratamiento se recomienda administrar trimetoprim sulfametoxazol, aciclovir y realizar PCR de CMV de forma seriada en pacientes seropositivos para CMV para iniciar tratamiento con ganciclovir o valganciclovir de ser necesario.⁽³¹⁸⁾ Se ha ensayado con dosis menores obteniendo resultados eficaces y con menos complicaciones infecciosas.⁽³¹⁹⁾

Brentuximab vedotina es un anticuerpo conjugado que consiste en una quimera

entre un IgG1 anti CD30 unido a monometil auristatina E.⁽³¹⁶⁾ Es un agente disruptor de microtúbulos que cuando la molécula se internaliza en las células expresoras de CD30 libera la monometil auristatina E en el citosol y para el ciclo celular.⁽³²⁰⁾ Dada la alta especificidad por células expresoras de CD30 este tratamiento es ideal para las MF que expresan CD30 con una tasa de respuesta proporcional a la expresión de CD30.⁽³²¹⁾ Entre los efectos secundarios destaca la neuropatía periférica, que se da en hasta 2/3 de los casos con mejoría o resolución al año de finalizar el tratamiento.
(82, 322)

Mogamulizumab es un anticuerpo monoclonal humanizado IgG1 con actividad citotóxica que actúa frente al receptor de quimioquina CC 4 (CCR4) que se expresa en las células del linfoma leucemia de células T del adulto.⁽³²³⁾ CCR4 también se expresa en las células T a nivel cutáneo de la MF en estadio de parches, placas o tumores por lo que se ha utilizado mogamulizumab con buenos resultados en MF.^(15, 324)

Pembrolizumab y nivolumab son fármacos anti PD1 cuyo uso se ha aprobado para una amplia variedad de tumores, como el melanoma. Estudios en fase I y II se están realizando con ambos fármacos para valorar su utilidad en MF.^(325, 326)

Inhibidores de histona deacetilasa

Se trata de una serie de enzimas que eliminan los grupos acetilo de los residuos de lisina de las histonas por lo que tienen gran importancia en el remodelado de la cromatina, condensándola, y consecuentemente en la epigenética de la expresión génica.⁽³²⁷⁾ Tienen utilidad antitumoral al controlar las aberraciones epigenéticas asociadas al cáncer y se utilizan como tratamiento de segunda línea (fallo a sistémico previo) en estadios avanzados de MF.⁽⁹⁰⁾

Vorinostat, romidepsin, y belinostat son los 3 fármacos de este tipo utilizados para tratamiento de MF.⁽³²⁸⁾ Vorinostat tiene la ventaja de poder ser administrado de forma oral y es el que tiene un rol más importante de los tres para el tratamiento de MF.^(15, 329) Ha demostrado una tasa de respuesta parcial del 24% en MF recidivada.⁽³²⁸⁾ Los efectos secundarios incluyen disgeusia, trombocitopenia, astenia diarrea y náuseas de intensidad variable que pueden hacer necesario reducir la dosis.⁽³³⁰⁾

Romidepsin se administra a 14 mg/m² de forma intravenosa y sus efectos secundarios incluyen náuseas, síndrome constitucional, trombocitopenia y alteraciones electrocardiográficas.⁽³³¹⁾

Belinostat se administra también de forma intravenosa y ha sido aprobado como tratamiento de segunda línea en linfoma primario cutáneo T con unas tasas de respuesta aproximada del 13%.⁽³³²⁾

Fotoféresis extracorpórea

Es un procedimiento por el cual la sangre de forma extracorpórea se separa de los leucocitos para luego exponerlos a 8-metoxipsoraleno un fármaco que se fotoactiva mediante radiación ultravioleta A.⁽³³³⁾ La combinación de metoxipsoraleno 8 y radiación UVA conduce a daño del ADN celular debido a la unión y entrecruzamiento del psoraleno con el ADN produciendo toxicidad celular con activación de la apoptosis en los linfocitos tratados.⁽³³³⁾ Por otro lado, se produce una activación de monocitos y como consecuencia una mejora en la presentación y respuesta inmune.⁽³³⁴⁾

La fotoféresis extracorpórea ha demostrado mayor eficacia en pacientes eritrodérmicos sobre todo en el caso de ausencia de afectación nodal o visceral.⁽³³⁵⁾

Con este tratamiento se han descrito tasas de respuesta de alrededor del 63%.⁽³³⁶⁾ En los esquemas de tratamiento actuales ya no es necesaria la administración de psoraleno oral lo que han disminuido los efectos secundarios (nauseas).⁽³³⁷⁾ Los protocolos de administración son dos días seguidos cada semana, dos semanas o cuatro semanas.⁽³³⁷⁾

Trasplante de células madre hematopoiéticas

Se trata del único tratamiento con intención curativa, a excepción de la radioterapia en casos de MF unilesional.⁽³³⁸⁾ El problema de esta técnica es el alto riesgo de morbi-mortalidad asociado por lo que la selección de los pacientes es fundamental limitándose principalmente a pacientes jóvenes con buen estado basal, pero en estadios avanzados de la enfermedad con alto riesgo de progresión y < 46 meses desde el diagnóstico.^(90, 339)

El tratamiento se realiza previo a un régimen de intensidad reducida para acondicionar al paciente.⁽³⁴⁰⁾ Algunos estudios han demostrado que asociar terapia de baño de electrones antes del acondicionamiento aumenta la tasa de respuesta completa hasta el 58%.⁽³⁴⁰⁾ Los principales efectos secundarios además de las complicaciones infecciosas por la inmunosupresión son las reacciones injerto frente a huésped agudas y crónicas.⁽²⁷⁶⁾

Como hemos visto existen múltiples opciones terapéuticas, pero no hay una guía clara de cómo o cuándo usarlas. Esto se debe a que la respuesta a los tratamientos varía mucho entre individuos y las remisiones incluso cuando son completas no suelen ser definitivas, por lo que los pacientes van pasando de un tratamiento a otro o combinando varios, conforme avanza el proceso. Uno de los puntos fundamentales del presente trabajo es poder mejorar la selección del paciente mediante un estudio de expresión génica en los pacientes iniciales, y poder intervenir con intención

curativa en los casos que previsiblemente vayan a tener peor pronóstico antes de que la enfermedad haya avanzado empeorando drásticamente el estado basal del paciente disminuyendo las probabilidades de éxito.

Arrays de ADN complementario

La medicina personalizada está cada vez más cerca de ser una realidad. Los avances en biomedicina detectan, más allá de los genotipos, alteraciones moleculares de forma precisa gracias a un desarrollo tecnológico que cada vez nos permite descubrir con mayor sensibilidad variaciones de forma dinámica y a múltiples escalas en individuos y enfermedades.⁽³⁴¹⁾

Poder predecir, gracias a la detección de biomarcadores, la evolución de cada paciente nos daría la capacidad de intervenir de manera más efectiva, evitando sobretratar a pacientes con buen pronóstico e infratrar los casos opuestos.^(342, 343) Este es el futuro: medicina personalizada. Las alteraciones genéticas entre tumores, incluidos los de la misma estirpe, nunca son iguales de un individuo a otro, al igual que nuestro perfil genético es diferente de un individuo a otro, el perfil genético de aberraciones somáticas cambia entre cada cáncer haciéndolo único.⁽¹⁵⁸⁾

En el camino hacia esta medicina personalizada uno de los pilares es el estudio de expresión genética, que se centra en la medición simultánea de niveles de expresión de una gran cantidad de genes. Estos estudios han facilitado la categorización de los cambios en el genoma asociados al cáncer.

Por ejemplo, en linfomas de células T estudios de expresión genética han demostrado un aumento de la señalización TCR y una gran plasticidad fenotípica.⁽³⁴⁴⁾ En MF concretamente se ha demostrado mediante estudios citogenéticos que la pérdida de 9p21, incluyendo CDKN2A, o la ganancia en el cromosoma 7 se asocian con menor supervivencia. ^(173, 345, 346)

Además un mejor conocimiento de las vías genéticas activadas o inhibidas puede abrir nuevas vías terapéuticas, como demuestra el estudio de PLCG1, gen que se encuentra alterado en un 21% de los pacientes y activa la vía RAS/RAF/PKC/NFκB por DAG (dystrophin associated glycoprotein) o calmodulina/calcineurina/NFAT por IP3/Ca²⁺.^(164, 347) La implicación de la calcineurina ha abierto la puerta a la utilización de inhibidores de la calcineurina como tacrolimus/pimecrolimus como tratamiento tópico de MF inicial.⁽³⁴⁸⁾

Como vemos los estudios de expresión genética son muy interesantes y las tecnologías usualmente utilizadas para ello son la medición de microarrays de ARN mensajero (ARNm) y la secuenciación de próxima generación.⁽³⁴⁹⁾

En el presente proyecto utilizamos la tecnología de microarrays para poder estudiar la expresión de miles de genes a la vez.

Los microarrays son técnicas ampliamente usadas en la investigación biomédica que pueden utilizarse para diagnosticar, clasificar y entender los mecanismos moleculares de la tumorigénesis y cómo evolucionan los tumores.⁽³⁵⁰⁾

Este tipo de estudios han revolucionado el conocimiento sobre el cáncer mejorando la clasificación predicción de la respuesta a tratamiento y predicción de supervivencia. ⁽³⁵¹⁻³⁵⁴⁾

Un microarray es un sustrato, normalmente un portaobjetos de vidrio, sobre el que se fijan unas sondas de ADN conocidas en diferentes localizaciones para añadir ADN complementario (ADNc) del tejido muestral marcado mediante fluorescencia o radioactividad y que se produzca la hibridación de ambos.⁽²⁴⁾ Posteriormente se lee la señal que emiten indicando a través de la intensidad de la misma el grado de expresión para un determinado gen ya que la unión es proporcional a la cantidad de ARNm transcrito.⁽²⁵⁾

El ARNm es aquel que codifica proteínas y por tanto se relaciona con la expresión de los genes.⁽³⁵⁵⁾ Tiene una poliadenosina (polyA) en el extremo 3-primo que permite unirse con moléculas de politimina y su tamaño puede ser de entre 1000 a 10000 nucleótidos.⁽³⁵⁵⁾

Como ARN es una molécula muy sensible a la degradación tanto en condiciones fisiológicas como de laboratorio hay que buscar la manera de estabilizarla para poder trabajar con ella y es por eso que se transforma en ADNc mediante el uso de la transcriptasa inversa lo que nos facilita un material mucho más estable para el estudio.⁽³⁵⁵⁾

La presencia del extremo polyA es muy importante si queremos realizar la replicación del material mediante transcriptasa inversa ya que el ARN ribosomal carece del mismo por lo que se produce ADNc únicamente del ARNm celular. ^(355, 356)

Para el estudio del ARN mediante microarrays primero se debe extraer ARN de la muestra de tejido con un buffer de extracción y purificarlo.⁽³⁵⁶⁾

La mejor fuente para obtener el ARN es de tejido fresco congelado a -80°C, al que se le aplican reactivos como RNAlater (Thermo Fisher Scientific) para disminuir el riesgo de degradación del material genético y facilitar la conservación.⁽³⁵⁵⁾

Otro problema al que nos podemos enfrentar es que en muchas ocasiones el material muestral y por lo tanto la cantidad a ARNm es escaso. ⁽³⁵⁷⁾

Es importante controlar la cantidad y calidad del ARN mediante un espectrofotómetro y un bioanalizador que nos ayude a medir el número de ARN íntegro (RIN, RNA integrity number).⁽³⁵⁶⁾ El RIN se mide en una escala del 1 al 10 donde valores <2 corresponden a una muestra muy degradada por lo que no se

recomienda para estudio, de 2 a 7 se puede utilizar si se realiza una amplificación y por último >7 que se trata de una muestra útil para cualquier análisis.⁽³⁵⁵⁾

Para mejorar el resultado del array y aumentar la cantidad de ARN lo amplificaremos, pero este proceso cuenta con la limitación de que podemos perder información sobre la cantidad de ARNm inicial y por lo tanto del nivel de expresión real para cada gen, que es lo que se pretende medir.⁽³⁵⁸⁾

Una vez purificado el ARN se sintetiza el ADNc y se amplifica mediante PCR o la amplificación de ARN obteniendo ARNa (ARN amplificado) basada en T7 donde el material se puede marcar con fluorescencia o radioactividad.^(25, 355)

El procedimiento para sintetizar ADNc a partir de ARNm utiliza la transcriptasa inversa con un primer de oligodT-T7 que actúa sobre el extremo poliA del ARNm. El resultado inicial es un híbrido ARN-ADNc.⁽³⁵⁹⁾

Sobre estos híbridos se realiza una digestión mediante RNAasa del ARN, para poder así convertir el ADNc en ADN de doble cadena mediante la ADN polimerasa I de la Escherichia Coli.^(358, 359)

Queda por tanto un ADN con un promotor T7 activo. En este momento se realiza la amplificación mediante transcripción in vitro añadiendo una polimerasa T7 de ARN.^(358, 359) En un segundo paso se realiza una transcripción reversa del RNAa obtenido a ADNc y gracias a la polimerasa I conseguimos un ADN de doble cadena.⁽³⁵⁹⁾ En este proceso se pueden añadir marcadores de fluorescencia para monitorizar la hibridación, aplicando marcadores como estreptavidina o ficoeritrina como fluoróforos.⁽³⁵⁶⁾

La amplificación se repite cuantas veces sea necesario.

Una vez obtenido el ADNc de la muestra para la realización de los microarrays las secuencias génicas se colocan en lugares determinados del array que contiene millones de fragmentos de ADNc o sondas de oligonucleótidos que hibridizan con el ADNc de la muestra.⁽²⁴⁾

Las secuencias de las sondas son conocidas previamente por lo que los microarrays son diseñados para medir perfiles de expresión de genes ya conocidos.⁽³⁴⁹⁾

Mediante fotolitografía se sintetizan las secuencias de nucleótidos en el array.⁽³⁶⁰⁾ Este proceso se realiza nucleótido a nucleótido hasta formar las secuencias de oligonucleótidos complementarias a los fragmentos de material genético con los que queremos que hibridicen.⁽³⁵⁶⁾

La hibridación se realiza junto con test control de ARN para facilitar la comparación y una vez finalizada el material no hibridado se elimina con un lavado.⁽³⁶¹⁾ La imagen

de fluorescencia identifica los genes que se expresan en esa muestra y la intensidad de la luz se relaciona con la intensidad de la expresión de ARN aunque no de una forma lineal.⁽³⁴⁹⁾

El procesamiento de las imágenes obtenidas se realiza mediante escáneres que realizan las funciones de direccionamiento (localizar los puntos del array), segmentación y extracción de información (cálculo de la media y la mediana de las intensidades de cada punto y el ruido de fondo).⁽²⁵⁾

Los arrays de cristal tienen un grado de autofluorescencia bajo por lo que generan poco ruido de fondo aun así este ruido debe ser eliminado a la hora de calcular la intensidad de fluorescencia.⁽³⁶⁰⁾

La intensidad se calcula como la suma de las intensidades de cada pixel dentro de un punto.⁽²⁵⁾

Los datos de intensidad de fluorescencia suelen ser transformados a una escala logarítmica ya que este tipo de transformación hace los datos más aptos para estudios que requieran de una distribución normal.⁽³⁶²⁾

Además de las posibles interferencias en las mediciones, los microarrays están sujetos a variaciones técnicas no biológicas como el lote de reactivos, chips, personal o día en el que se realiza el estudio. Lo que se conoce como efecto batch o efecto lote.^(25, 356)

Para la correcta tipificación de la expresión genética hay que tener en cuenta los factores que contribuyen a generar ruido en la obtención de resultados como pueden ser las variaciones en la configuración del escáner de fluorescencia (por lo que el brillo de los arrays puede variar), las condiciones de hibridación entre arrays o la cantidad de ARN.⁽³⁴⁹⁾

En laboratorio se realizan técnicas para disminuir los errores como la randomización o la replicación. La replicación puede ser gen a gen (genes estudiados varias veces por array), array a array (mismas muestras de ARNm en diferentes arrays) o sujeto a sujeto (las muestras de ARNm se toman de varios sujetos para detectar la variabilidad biológica).⁽²⁵⁾

Aun así, con la finalidad de disminuir las diferencias sistemáticas y técnicas para poder observar mejor las diferencias biológicas entre genes y arrays, deben aplicarse diferentes técnicas estadísticas con el objetivo de normalizar los datos antes de realizar cualquier análisis estadístico.⁽³⁴⁹⁾

NanoString

El procesamiento de muestras anatómicas en formol y posteriormente en bloques de parafina, las condiciones de almacenamiento, etc. afectan a la calidad del ADN/ARN cuando queremos procesar esas muestras.⁽³⁶³⁾ Esto se debe a que el ARN se degrada y se fragmenta con el tiempo durante el almacenamiento y también se ve afectado por condiciones externas como los cambios en la temperatura ambiental.⁽³⁶⁴⁾

Además, durante el procesamiento de las muestras el formaldehído induce una serie de modificaciones químicas en el ARN como la formación de enlaces cruzados de metileno.⁽²⁶⁾ Estos enlaces también se pueden formar durante la extracción del ARN.⁽³⁶³⁾

Cuando tratamos con este tipo de tejidos, que llevan años parafinados la tecnología de microarrays es menos precisa y más susceptible a errores o directamente no es capaz de detectar ARN por estar el mismo presente en escasa cantidad ya que tiene un rango dinámico de detección bajo y de peor calidad.^(27, 29)

Sin embargo, ese material, el tejido parafinado, puede ser tremendamente valioso ya que tenemos información de biopsias almacenadas de muchos pacientes, así como de su seguimiento durante años y es necesario disponer de una tecnología que minimice esos errores para poder utilizar y sacar partido de toda esa información.⁽³⁶³⁾

Cuando utilizamos tecnología NanoString evitamos el sesgo de amplificación que podemos tener cuando utilizamos PCR, además obtenemos un conteo exacto del número de genes y es tan sensible que se puede utilizar con pequeñas cantidades de ARN lo cual es muy útil cuando trabajamos con material parafinado.^(26, 28)

Esta tecnología realiza un análisis múltiple de hasta 800 genes a la vez y funciona de la siguiente manera.⁽³⁶⁵⁾

En una primera fase se hibridiza la muestra de ARN con unas sondas de nucleótidos captura y reportera. La sonda reportera tiene un código fluorescente en el extremo 5' que consiste en la combinación de rojo, verde, amarillo y azul en 6 posiciones distintas.⁽²⁶⁾

De esta forma esta sonda funciona como un código de barras y cada combinación marca un gen diferente que posteriormente podrá ser contado de forma

individual.⁽²⁷⁾

El extremo de esta sonda será afín a una molécula de ARN (gen) concreta. Por otro lado, la sonda capturadora hybridizará también con la molécula de ARN, y en su extremo 3' está biotinilada.⁽²⁶⁾

Tras la hibridación se elimina el exceso de sondas reporteras usando esferas que se unen a las sondas capturadoras en un primer paso. En un segundo paso se elimina el exceso de sondas capturadoras utilizando el mismo recurso, es decir esferas que se unen a las sondas reporteras y de esta manera nos quedamos con las moléculas hibridadas completamente.⁽²⁶⁾

Por último, se utiliza una placa recubierta de estreptavidina que se une de forma muy afín con la biotina de los extremos biotinizados de la sonda capturadora y se aplica un campo eléctrico que alinea, elonga e inmoviliza los complejos.^(26, 29)

De esta manera se realiza el conteo de los códigos de barras, en un analizador digital donde un microscopio de epifluorescencia toma las imágenes de las señales fluorescentes de los códigos de barras para su análisis digital.⁽³⁶⁵⁾

La tecnología de NanoString puede detectar la expresión de múltiples genes de una forma precisa, reproducible, sensible y específica.^(26, 28) Se considera una tecnología más sensible que el microarray y tan sensible y exacta como la PCR en tiempo real.⁽²⁹⁾

Se utilizan controles positivos para normalizar los resultados, esta es una normalización dirigida a la técnica. Posteriormente hay otra normalización denominada biológica, basada en los recuentos de genes internos y las diferencias significativas en la cantidad de ARN entre las muestras.⁽³⁶⁵⁾

La lectura digital de los genes tiene un rango dinámico más amplio y menos ruido de fondo. El alto rango de precisión de los resultados hace innecesarias validaciones adicionales.⁽²⁷⁾

Para resumir, podemos decir que las ventajas del NanoString son:

La medición de ARN de forma directa sin amplificación. Esto elimina el sesgo de amplificación.⁽²⁷⁾

El conteo de las muestras se hace de forma directa ya que cada sonda reportera equivale a un gen. Lo cual lo hace tremendamente específica.⁽²⁷⁾

Se necesita menos cantidad de ARN para realizar las mediciones de expresión genética. Cantidades que con otras técnicas como el microarray serían declaradas como inexistentes o ausentes.⁽²⁹⁾

No es necesario validación adicional.⁽²⁹⁾

Se puede utilizar en tejidos parafinados con buenos resultados.⁽²⁸⁾

La tecnología NanoStrig se ha utilizado con éxito en cáncer de pulmón⁽³⁶⁶⁾, cáncer de colon,⁽³⁰⁾ cáncer de tiroides⁽³⁶⁵⁾, cáncer de mama y melanoma.⁽²⁸⁾

Es por ello que para el estudio de validación decidimos utilizar esta tecnología en lugar de los microarrays de ADNc que utilizamos en el estudio inicial.

Procesamiento de datos

Normalización

La normalización tiene el propósito de ajustar los datos de los microarrays para excluir los efectos de la variación en la tecnología respecto a las variaciones biológicas entre ARN o sondas.⁽³⁶⁷⁾ Además tiene una segunda función, ya que también se utiliza para ajustar los datos a un lecho de Procusto de los supuestos que se acuerdan en los análisis convencionales que permitirá un posterior análisis estadístico y biológico confiable.^(367, 368)

Existen muchos métodos para normalizar entre ellos varias variedades de modelos lineales, loess, cuantil-cuantil, log2, min-max, conversión a función logarítmica, normalización z score, cuantificación difusa, función atan etc.^(367, 369-373) No existe una norma general para elegir el método para normalizar. El método más común para la normalización de arrays es el Robust Multichip Analysis.^(374, 375)

La sumarización es el último paso para normalizar los resultados. Se realiza por que cada gen puede tener varias sondas que miden su intensidad y mediante la sumarización determinamos la intensidad del transcrito a partir de la intensidad de sus sondas.^(368, 375)

Análisis de diferenciación de expresión

El principal problema para determinar qué genes se expresan de manera diferente entre dos grupos de muestras suele ser que el tamaño del grupo (n de pacientes) es menor que el número de test (genes) investigados.⁽³⁷⁶⁾ Es por ello que las herramientas de estadística simplemente actúan como un filtro para seleccionar los

genes más diferencial y significativamente expresados pero esos datos deben de validarse en el laboratorio de nuevo para su confirmación.⁽³⁷⁶⁾

Para medir la expresión diferencial de los microarrays y del NanoString comúnmente se utilizan el cambio de pliegue (fold change, FC) y la t estadística. ⁽³⁶²⁾

Respecto al análisis estadístico la t de Student o t-test se puede utilizar para evaluar la diferencia de expresión en dos grupos de muestras.⁽³⁷⁷⁾

$$t = \frac{\langle \log_{10} E_1 \rangle - \langle \log_{10} E_0 \rangle}{SE_{\langle \log_{10} E_1 \rangle - \langle \log_{10} E_0 \rangle}} = \frac{\langle \log_{10} E_1 \rangle - \langle \log_{10} E_0 \rangle}{\sqrt{\frac{s_1^2}{n_1} + \frac{s_0^2}{n_0}}}$$

Figura 3: representación matemática del t-test.⁽³⁶²⁾

El FC se calcula como el ratio de las medias entre los valores del control y de las muestras; se ha demostrado que este método consigue resultados más reproducibles.⁽³⁷⁸⁾

Normalmente se realiza un triple análisis, primero un t test para obtener un p valor de cada gen estudiado.⁽³⁷⁸⁾ El análisis matemático de distribución t permite el cálculo del valor p asociado con la transcripción medida por microarrays.⁽³⁴⁹⁾ Las transcripciones cuyos valores de p son más pequeños (más significativos) dentro de un nivel de confianza previamente especificado (denominado tasa de error de tipo I) constituyen la lista inicial de genes expresados diferencialmente.⁽³⁴⁹⁾ En un segundo paso en los casos en los que hay una diferencia estadísticamente significativa a través de la p tenemos que confirmar su validez. Para ello se debe hacer un test para la detección de falsos positivos como el test de Benjamini y Hochberg.^(349, 378) En el tercer y último paso se seleccionan los genes usando FC para escoger los umbrales de genes sobre o infraregulados.⁽³⁷⁸⁾

En el caso de que la distribución no sea normal se pueden utilizar el test de SAM (Significance Analysis of Microarrays) o el de suma de rango de Wilcoxon, o realizar normalización y transformación de datos previo al análisis.⁽³⁴⁹⁾

Otra opción para medir los cambios de expresión genética es visualizarlo mediante un gráfico conocido como gráfico de volcán en el que se ponen los valores p contra los del FC. Esto se realiza dado que una transcripción puede tener un valor p pobre a pesar de un cambio de pliegue alto (debido a la gran variación entre las réplicas biológicas), mientras que otras transcripciones pueden tener valores de p altamente significativos a pesar de pequeños cambios de pliegues y es necesario eliminar ese tipo de datos.⁽³⁴⁹⁾

Estos gráficos se llaman “volcano plot” o gráficos de volcán por la forma que tienen. Básicamente enfrentan una señal no estandarizada en el eje horizontal como el cambio de pliegue (en expresión logarítmica) contra una señal estandarizada en el eje vertical (ajustada al ruido) en una escala logarítmica negativa de p .^(349, 362) En el eje horizontal la sobreexpresión o infraexpresión aparece de forma simétrica y en el eje vertical los valores de p menores (más significativos) aparecen representados arriba.⁽³⁶²⁾ En resumen el eje horizontal indica el impacto biológico del cambio y el eje vertical la significación estadística.⁽³⁴⁹⁾

Estos gráficos han sido muy utilizados para realizar análisis de expresión y se han generalizado a representaciones donde el eje horizontal se relaciona con la fuerza de la señal estadística y el eje vertical con su significación.⁽³⁷⁹⁾ Pero también se pueden aplicar a estudios de asociación genética tipo casos y controles como es el caso de los estudios de asociación de múltiples genes. El eje horizontal puede representar la odds ratio (OR) o el riesgo relativo (RR, hazard ratio HR) y el eje x la expresión negativa logarítmica de p extraída del test de la chi cuadrado.⁽³⁸⁰⁾

El paquete estadístico R (<http://www.r-project.org/>) puede realizar estos gráficos con la función `identify`.⁽³⁶²⁾

Falsos positivos

Uno de los métodos más frecuentes para disminuir el ratio de falsos positivos es utilizar el test de Bonferroni para ajustar los valores de p dividiendo este entre el número de test realizados.⁽³⁸¹⁾

Si realizamos por ejemplo un estudio de un millón de genes tendríamos que dividir $p < 0.05/10^6$ para poder identificar asociaciones que puedan ocurrir de forma muy improbable por casualidad. Sin embargo, como podemos ver, cuando el análisis son muy numerosos esta corrección puede ser excesivamente restrictiva ya que asume una relación directa entre un gen y una enfermedad cuando frecuentemente se dan asociaciones de genes o vías metabólicas alteradas en las enfermedades y si los tratamos como factores independientes no serían estadísticamente significativos.⁽³⁸¹⁾

Benjamini y Hochberg describieron un método según el cual los resultados de expresión se colocan de mayor a menor de acuerdo a su p valor y para un número de predicciones Z el valor de p en el rango Z es p_z habiéndose analizado un total de genes Y .⁽³⁴⁹⁾ $Y \times p_z$ son los falsos positivos por lo que el porcentaje de falso positivos es $Y \times p_z / Z$. De esta manera se pueden extraer el número esperado de falsos positivos (false Discovery rate, FDR).⁽³⁴⁹⁾ El FDR es el ratio entre el número esperado de casos en los rechazos la hipótesis y la hipótesis nula es cierta frente al total de rechazos de la hipótesis.⁽³⁸²⁾

Análisis de predicción de clases

Este tipo de análisis busca crear un modelo que pueda utilizar la expresión de genes como biomarcador. Los métodos más utilizados son el análisis discriminante lineal de Fisher, enfoques de aprendizaje automático como SVM (support vector machine), mínimos cuadrados, etc.⁽²⁵⁾

Análisis de descubrimiento de clases: Agrupaciones de datos en clusters o grupos de genes/pacientes.

El objetivo de estos análisis es construir grupos dentro de los cuales las observaciones de una clase sean más similares entre sí que a las observaciones en diferentes grupos.⁽²⁵⁾

Los genes de un mismo grupo muestran similares perfiles de expresión, esta similitud se puede medir para realizar agrupaciones.⁽³⁸³⁾

Se pueden hacer muchas agrupaciones jerárquicas o no jerárquicas (dentro de las jerárquicas existen métodos aglomerativos o divisivos), de fraccionamiento, basadas en densidad, basadas en modelos y basadas en cuadrícula.^(25, 373)

En las agrupaciones no jerárquicas se utilizan métodos como SVM, K vecinos más cercanos, mapas auto organizados y descomposición de valores singulares.⁽²⁵⁾ Las herramientas más utilizadas son k-media y algoritmo de centro k.⁽³⁷³⁾

En las agrupaciones jerárquicas la similitud de expresión se puede medir con métodos como la correlación de Pearson, distancia Euclidiana, la tau de Kendall, media y mediana.⁽²⁵⁾

Cuando se hace una agrupación jerárquica lo más habitual es formar una estructura arboriforme en el que cada gen comienza como un grupo y de ahí se extraen los 2 genes o grupos más similares creando sucesivamente una nueva agrupación por similitud hasta que el número total de grupos disminuye y todos los genes están en un grupo, en el proceso de creación de grupos se forma un dendograma.⁽³⁴⁹⁾ La similitud entre 2 grupos se puede medir como la similitud entre sus centroides, el centroide representa la media de la expresión de todos los genes de un grupo.⁽³⁴⁹⁾

Los análisis por cluster tienen una serie de fallos, el primero es que siempre van a producir grupos independientemente de los datos introducidos, además no hay forma de reglar el número de grupos final y por último distintos métodos de análisis de descubrimiento de clases pueden producir resultados extremadamente diferentes.^(25, 384) Es por ello que este tipo de análisis deben de tomarse como una forma de explorar nuevas hipótesis y tomar los resultados con cautela.⁽²⁵⁾

Análisis de enriquecimiento

Cuando encontramos genes o grupos de genes que se expresan de forma diferente hay que buscar la función biológica de esos genes y si esos genes están aumentando una funcionalidad celular (división, inhibición de apoptosis etc.)^(385, 386) Los genes diferentemente expresados se pueden agrupar en base a elementos regulatorios como factores de transcripción, o en base a coexpresión de genes, buscando pares de genes con similares patrones de expresión entre muestras como en WGCNA (Weighted Gene Coexpression Network Analysis).⁽³⁸⁷⁾

Para valorar la función de los genes diferentemente expresados, se realizan estudios mediante análisis de enriquecimiento del conjunto de genes (gen set enrichment análisis, GSEA) utilizando bases de datos como Gene Ontology y KEGG.^(388, 389)

Los análisis de enriquecimiento son fundamentales a la hora de comprender y estudiar patologías complejas causadas por múltiples genes en vías relacionadas y facilitan así el entendimiento de los mecanismos patogénicos y abriendo vías para nuevos tratamientos.⁽³⁸⁵⁾

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

Hipótesis

Existen diferencias de expresión genética medibles entre los pacientes que van a progresar y los que no desde los estadios iniciales de la MF.

Objetivo principal

El objetivo principal del presente estudio es analizar muestras de biopsias cutáneas a fin de determinar la frecuencia de genes o vías de expresión, sobre o infraexpresados en pacientes preseleccionados con MF en estadio IA-IIA (manchas y placas).

Pretendemos así mismo correlacionar las diferencias observadas en términos de evolución de la enfermedad.

Objetivos secundarios

Como objetivos secundarios pretendemos **validar** las conclusiones que obtengamos de los objetivos principales con una muestra control para así poder **proponer marcadores de expresión** génica con valor pronóstico que permita seleccionar pacientes de riesgo desde el inicio de la enfermedad.

MATERIAL Y MÉTODOS

MATERIAL Y MÉTODOS

El **tipo de trabajo** es un estudio de cohortes históricas. Los datos de exposición, en este caso la muestra de tejido fue recogida antes de que el estudio empezara entre los años 1998-2003, así como algunos datos iniciales y el análisis de microarray.

Estos datos se utilizaron en los siguientes estudios:

. Tracey L, Villuendas R, Ortiz P, Dopazo A, Spiteri I, Lombardia L, Rodríguez-Peralto JL, Fernández-Herrera J, Hernández A, Fraga J, Dominguez O, Herrero J, Alonso MA, Dopazo J, Piris MA. Identification of genes involved in resistance to interferon-alpha in cutaneous T-cell lymphoma. *Am J Pathol.* 2002 Nov;161(5):1825-37. doi: 10.1016/s0002-9440(10)64459-8. PMID: 12414529; PMCID: PMC1850769.

. Tracey L, Villuendas R, Dotor AM, Spiteri I, Ortiz P, Garcia JF, Peralto JL, Lawler M, Piris MA. Mycosis fungoides shows concurrent deregulation of multiple genes involved in the TNF signaling pathway: an expression profile study. *Blood.* 2003 Aug 1;102(3):1042-50. doi: 10.1182/blood-2002-11-3574. Epub 2003 Apr 10. PMID: 12689942.

Posteriormente se ha realizado una recogida retrospectiva de datos evolutivos.

Los **criterios de inclusión** de pacientes fueron clínicos e histológicos. En todos los casos los pacientes presentaban MF en estadios iniciales IA-IIA. Los pacientes incluidos mostraron su acuerdo a que muestras cutáneas y datos evolutivos fueran tomadas para su posterior estudio. Por último, para incluir a los pacientes debía existir una muestra adecuada para su estudio y suficiente información de seguimiento.

Muestra

Siguiendo estos criterios se utilizaron microarrays de cADN para examinar el perfil de expresión genética de 64 pacientes con MF en estadios iniciales.

Se excluyeron del estudio 7 pacientes ya bien por falta de información clínica/pérdida de seguimiento o por baja calidad de la muestra. Corresponden a 2 pacientes del hospital de la Princesa, 3 pacientes del hospital Príncipe de Asturias y 2 pacientes del Hospital 12 de Octubre. Por lo que el número total de muestras que se recogieron fueron 64 aunque el presente estudio y conclusiones se centra sólo en 57 de ellos.

Los pacientes seleccionados pertenecían al Hospital 12 de Octubre (31), Hospital de la Princesa (4), Hospital Príncipe de Asturias (5), Fundación Alcorcón (1), Hospital Gómez Ulla (5), Hospital Virgen de la Salud (8), Hospital nuestra señora de Aránzazu (2), Hospital Virgen del rocío (1).

Tratamiento de las muestras biológicas

Todas las muestras, fueron obtenidas a través del banco nacional de tejidos (CNIO) en colaboración con los distintos hospitales. Las muestras parafinadas se recogieron y conservaron siguiendo los protocolos del banco de tejidos del CNIO.

Las tomas de tejido para el estudio y su análisis se realizaron entre los años 1998-2003 con pacientes recientemente diagnosticados de MF estadio IA-IIA.

De todos estos pacientes se han obtenido muestras de tejido afecto de MF con manchas o placas, mediante biopsia punch o incisional.

Las muestras obtenidas se congelaron a -80 °C con agentes estabilizantes.

Variables clínicas

Se realizó una recogida de datos inicial como fecha de diagnóstico, fecha de toma de biopsia, datos de filiación (fecha de nacimiento, sexo), estadio clínico y lesiones en el momento del diagnóstico y en el momento de la biopsia.

Para la consideración de los estadios se siguieron los criterios presentados en la **tabla 3**.

Posteriormente de forma retrospectiva se recogieron datos de evolución que incluían estadio máximo, estadio en última revisión, fechas de toma de biopsia, fecha de última revisión, desarrollo de tumores, ganglios, eritrodermia, expresión leucémica en sangre junto con las fechas de todos estos hitos, exitus, causa del mismo, si estaba relacionada con la MF o no y fecha.

Localizador	Desarrollo de tumores S/N
Fecha de nacimiento	Fecha de desarrollo de tumores
Sexo H=1 M=2	Desarrollo de ganglios S/N
Fecha de diagnóstico	Fecha de desarrollo de ganglios
Fecha de toma de la biopsia	Desarrollo de eritrodermia S/N
Estadio al diagnóstico	Fecha de desarrollo de eritrodermia
T al diagnóstico	Desarrollo de expresión leucémica en sangre S/N
N al diagnóstico	Fecha de desarrollo de expresión leucémica en sangre
M al diagnóstico	Desarrollo de metástasis S/N
B al diagnóstico	Fecha de desarrollo de metástasis
Estadio máximo alcanzado	Localización metástasis
T máximo	Exitus S/N
N máximo	Causa de éxitos relacionada con linfoma
M máximo	Fecha de exitus
B máximo	
Fecha de estadio máximo	
Fecha de última revisión	

Tabla 5: Resumen de variables recogidas. Leyenda S/N (si/no). H hombre. M mujer.

En los casos en los que el paciente se encontraba en remisión completa se consideró estadio 0. La remisión completa se consideró cuando el paciente presentaba desaparición completa de todas las lesiones cutáneas, y expresiones en otros órganos si las hubiera.

La recogida de estos datos se realizó desde 2017 hasta 2019.

En el caso del 12 de octubre la recogida de información se realizó a través de una base de datos (FileMaker Pro Advanced 14.0.5, Filemaker Ink© 1984-2016)

En los casos de los otros hospitales se recurrió a la historia del paciente en formato papel y electrónico.

Base de datos

La recogida de datos clínicos se realizó a través del programa FileMaker Pro Advanced 14.0.5. Este programa garantiza la confidencialidad de los datos, siendo necesaria una clave para acceder.

En la base de datos se almacena información de filiación y también de tipo clínico, anatomopatológico, inmunohistoquímico y genético. La información puede ser actualizada periódicamente fechando los datos añadidos.

Variables genéticas

Respecto a las variables de expresión genética se adjunta anexo con los 4982 genes estudiados.

Ver anexo I

Ver anexo II con la relación de genes con el 80% de la información.

La selección de genes para la validación se puede encontrar en el anexo III.

Consideraciones éticas

En todos los casos se obtuvo un consentimiento informado por parte de los pacientes del estudio bajo la supervisión del comité de ética de cada centro y de acuerdo a la declaración de Helsinki. (anexo IV)

Histología

Para confirmar el diagnóstico, las muestras de tejido parafinadas fueron revisadas por un panel de patólogos (Ana María Dotor, José Luis Rodríguez Peralto, Juan F. García, Javier Fraga, and Miguel Ángel Piris) y se utilizaron criterios diagnósticos uniformes basados en información clínica, histológica, inmunofenotípica y molecular tal y como describe la siguiente tabla. Se realizó una clasificación siguiendo las indicaciones de la OMS-EORTC. (ver tabla 2)

Se utilizaron tinciones hematoxilina/eosina, inmunohistoquímica para CD3, CD4, CD8 y PCR para TCR gamma.

Se utilizaron tinciones de hematoxilina eosina para todas las muestras para confirmar el diagnóstico de MF, estadificar y seleccionar las muestras con mayor carga tumoral.

Para realizar el estudio inmunológico se utilizaron tinciones específicas.

Para CD3, marcador de célula T, DakoCytomation, Glostrup, Denmark en dilución 1:200.

Para CD4, marcador de célula T, Master Diagnóstica, Granada, Spain en dilución 1:3.

Para CD8, marcador de célula T, DakoCytomation, Glostrup, Denmark en dilución 1:25.

Para Ki67, como marcador de proliferación, DakoCytomation, Glostrup, Denmark, en dilución 1:100.

Para CD7 como marcador de linfoma, Novocastra Laboratories, Newcastle upon Tyne, United Kingdom dilución 1:25.

Para CD30 como marcador de transformación a célula grande, Novocastra Laboratories, Newcastle upon Tyne, United Kingdom, dilución 1:101.

Para BCL-2, como marcador de linfoma B, DakoCytomation, Glostrup, Denmark en dilución 1:25.

Para definir la positividad de la tinción se tuvo en cuenta el porcentaje de células positivas y la intensidad de la tinción, en estos casos el control fueron los linfocitos no neoplásicos de la muestra. Considerando negativo el resultado cuando menos de un 5% de las células neoplásicas se teñían. Positivo débil cuando las células teñidas eran de entre 5-30% y positivo intenso con un más del 30% de las células teñidas.

El fenotipo más frecuente fue CD3⁺/CD4⁺ /CD8⁻/CD7⁺, mientras que otros fenotipos se consideraron aberrantes. Cuando los niveles de Ki66 eran >30% se determinó un índice de proliferación elevado o intermedio, en las células tumorales.

Procesamiento de las muestras

El procesamiento de las muestras se realizó entre los años 1999-2003 de acuerdo a lo descrito en la siguiente bibliografía por el consiguiente equipo:

. Tracey L, Villuendas R, Ortiz P, Dopazo A, Spiteri I, Lombardia L, Rodríguez-Peralto JL, Fernández-Herrera J, Hernández A, Fraga J, Dominguez O, Herrero J, Alonso MA, Dopazo J, Piris MA. Identification of genes involved in resistance to interferon-alpha in cutaneous T-cell lymphoma. Am J Pathol. 2002 Nov;161(5):1825-37. doi: 10.1016/s0002-9440(10)64459-8. PMID: 12414529; PMCID: PMC1850769.

. Tracey L, Villuendas R, Dotor AM, Spiteri I, Ortiz P, Garcia JF, Peralto JL, Lawler M, Piris MA. Mycosis fungoides shows concurrent deregulation of multiple genes

involved in the TNF signaling pathway: an expression profile study. *Blood*. 2003 Aug 1;102(3):1042-50. doi: 10.1182/blood-2002-11-3574. Epub 2003 Apr 10. PMID: 12689942.

Se resume el procedimiento a continuación.

Aislamiento de ARN

El tejido congelado se cortó en secciones utilizando un microtomo a -20°C. A estas secciones se les añadió 1ml del reactivo Trizol (Life Technologies, Grand Island, NY) para impedir la degradación del ARN y se mantuvieron en hielo seco hasta su homogenización utilizando el homogenizador polytron. Se añadió 1µl de acrilamida lineal (Life technologies Inc.) y esta nueva mezcla se incubó a temperatura ambiente durante 5-10 minutos. Posteriormente se añadió 200 µl de cloroformo y se mezcló durante 15 segundos. Se realizó una segunda incubación a temperatura ambiente durante 10 minutos con posterior centrifugación a 12,000xg durante 15 minutos a 4°C. Tras la centrifugación se recogió el precipitado que contenía el ARN descartando el sobrenadante. El ARN se precipitó usando isopropanol y se lavó usando 1ml de etanol al 70% por ml de Trizol utilizado.

Posteriormente se centrifugó durante 5 minutos a 7500xg. Una vez más se descartó el sobrenadante, se dejó secar el precipitado durante 5-10 minutos para ser resuspendido en agua libre de RNAsas.

A continuación se purificó la muestra resultante usando el kit RNeasy (Qiagen Inc., Valencia, CA) y se aplicó un taponador salino para permitir la unión del ARN con la membrana del RNeasy. Las muestras fueron homogenizadas en presencia de un tamponador desnaturante de guanidina-tiocianato para inactivar las RNAsas. Se añadió etanol aplicando el RNeasy a la muestra donde el ARN se une a la membrana y los contaminantes quedaron atrás. El ARN purificado se eluyó en 30 µl de agua.

Para el proceso de digestión de ADN se utilizó el DNase I libre de RNAsas (Qiagen Inc., Valencia, CA) según instrucciones del fabricante. De esta manera se eliminó posible ADN sin afectar al ARN de la muestra.

La integridad del ARN extraído fue verificada mediante electroforesis y utilizando el bioanalizador 2100 (Agilent Technologies, Palo Alto, CA). La calidad del ARN se midió mediante espectrofotometría o utilizando el bioanalizador 2100.

Amplificación y síntesis de ARNa

El ARN objeto de estudio (1 microgramo) fue amplificado utilizando el sistema de transcripción *in vitro* basado en T-7 descrito en la introducción. El proceso de transcripción T7 *in vitro* se realizó utilizando el kit Ampliscribe T7 (Epicentre Technologies, Madison, WI) o el kit Megascript T7 (Ambion, Austin, TX) siguiendo las instrucciones del fabricante. El ADN complementario (ADNc) de doble cadena fue limpiado y sometido a transcripción *in vitro* basada en T7 con los kits anteriormente descritos para obtener ARNa según la metodología descrita previamente.^(390, 391)

0.5-5µg del ARN total fueron convertidos a ADNc de doble cadena usando el superscript choice system (Life technologies Inc.).

Para la síntesis del ADN uncatenario el procedimiento se realizó mezclando ARNm con los oligos o primers, sometiéndolo a 3 ciclos de desnaturalización a 80 grados incubando en hielo durante 3 minutos tras cada ciclo. La transcripción inversa y posterior síntesis de ADNc de doble cadena se realizó usando superscript choice system y oligo-dT primers que contienen promotores de la polimerasa de ARN T7 (que se unen a la polimerasa mediante el punto de unión 5'-AAACGA CGG CCA GTG AAT TGT AAT ACG ACT CAC TAT AGG GCG T,5-3') (Ambion, Austin, TX).

Se añadió a la mezcla la transcriptasa inversa Superscript II Reverse Transcriptase o inversa AMV Access RT-PCR System; Promega, Madison, WI) según el procedimiento indicado por el fabricante, los hexámeros aleatorios (random primers, Promega), el DTT (Dithiothreitol), dNTPs (2'- Deoxyribonucleoside-5'-triphosphates) y el inhibidor de RNasa (RNAsin) incubando todo 2 horas a 42°C. ^(359, 390)

Para la síntesis de la segunda cadena de ADNc se utilizó a ADN polimerasa, Escherischia coli ADN ligasa, RNasaH y dNTPs incubando a 16°C durante 2 horas. El ADN de doble cadena resultante fue purificado usando fenol-clorofolmo-isoamil alcohol (25:24:1) Ph8 (Ambion) y se precipitó utilizando etanol, acetato de amonio 7.5M Sigma Chemical Company) y acrilamida linear (Ambion). La transcripción *in vitro* T7 se realizó usando el kit de transcripción *in vitro* T7 (Ambion) siguiendo las instrucciones del fabricante. Se mantuvo la reacción durante 2-14 horas a 37°C dependiendo de la cantidad y calidad del total de ARN utilizado.

El ARNa sintetizado de la muestra de MF, fue marcado con cianina 5 (Cy5) conjugada con dUTP, mientras que el ARNa de la muestra control tomada del ARN de

Referencia Universal Humana (Stratagene, La Jolla, CA) fue marcado con cianina 3 (Cy3) conjugada con dUTP.

Microarray

Los estudios de expresión genética se realizaron con el microarray de ADNc OncoChip desarrollado por el CNIO en el año 1999. Se trata de un microarray específicamente diseñado para estudiar genes relacionados con el cáncer, no específico de MF, que incluye genes relacionados con cáncer además de genes relacionados con respuesta a tratamientos, específicos de tejido y genes de control. Se incorporaron un total de 6386 genes por 7237 clones representados por 13057 puntos en el array. 5253 clones representan genes conocidos y 1984 marcadores de secuencias expresadas (EST). La selección de genes se hizo en base a su relación con el desarrollo y progresión de tumores de acuerdo con la evidencia que se disponía en ese momento y a criterio de investigadores del CNIO.

Los genes seleccionados se pueden agrupar en 3 grupos. El primero que supone 2489 genes, aproximadamente un 40% del total comprende genes con función conocida que interfieren en el ciclo celular, apoptosis, angiogénesis y adhesión. Procesos especialmente implicados en cáncer. Además, se incluyeron genes implicados en respuesta a tratamientos con IFN o taxol, genes implicados en cáncer hereditario, genes oncogénicos y genes relacionados con la supresión de tumores. Sobre los genes relacionados con cáncer se hicieron 2 análisis.

El segundo grupo de genes, 3899, está compuesto por un grupo de genes seleccionados por su localización cromosómica, genes específicos de tejidos normales o neoplásicos y genes seleccionados de acuerdo a la información de Hibridación Genómica Comparada y Pérdida de heterocigocidad en cáncer. A este respecto se incluyeron genes localizados en cromosomas 9,11,13,17,19 y X para los fenómenos de hibridación genómica comparada y en regiones de los genes 1,9 y 10 para la pérdida de heterocigocidad.

El tercer grupo abarca genes de control con genes con expresión similar en todos los tejidos y estados como controles positivos y genes de otras especies no humanas (genes de resistencia antibiótica en *Escherischia coli* y genes de *Arabidopsis thaliana*) como controles negativos. También se incluyeron pocillos con agua, buffer y clones PCR negativos como controles.

La medida de intensidad de fluorescencia para cada elemento del array se realizó con una substracción automática del fondo. Para la normalización de datos del ratio Cy3/Cy5 se ajustó a un factor igual al coeficiente medio en relación a todos los

puntos de array.

Se excluyeron además los puntos con intensidades de señal menores de 500 unidades de fluorescencia (suma de la mediana de los fondos). Las zonas con defectos fueron marcadas manualmente. Se realizó una transformación logarítmica de todos los valores.

Se hizo la media del ratio Cy3: Cy5 de los puntos duplicados consistentes, en los casos de valores duplicados inconsistentes los datos fueron desechados para el análisis, así como en los casos de genes con menos del 80% de datos disponibles. Para minimizar el ruido de fondo producido por células normales en el tejido cada muestra se normalizó frente a una muestra de piel normal. Se tomaron 6 muestras de piel no fotoexpuesta y se calculó la media de cada gen (con un mínimo de datos de 4/6 muestras) Los genes se designaron como sobre o infra regulados si la diferencia con el ratio era como mínimo del doble.

Después de eliminar los genes duplicados y aquellos de los cuales no se recogió información quedaron 4982. La lista de genes se encuentra en el anexo I.

Validación

Una limitación de nuestro estudio es la n reducida de pacientes que además hubo que dividir debido a la falta de homogeneidad de las muestras. Además, es necesario recordar que estamos trabajado con microarrays desarrollados hace 20 años, en los inicios de la técnica y que el estudio es de cohortes históricas. Para intentar superar estas limitaciones diseñamos un estudio de validación.

Este estudio se realizó gracias a la ayuda y colaboración de las Marta Rodríguez Moreno y Ruth Alonso Alonso y Miguel Ángel Piris Pinilla del Hospital Fundación Jiménez Díaz, así como de José Luis Rodríguez Peralto y Pablo Luis Ortiz Romero del Hospital Universitario 12 de Octubre.

Para la validación se realizó un estudio de casos y controles. Se recogieron, durante el año 2021, 52 muestras de 51 pacientes diagnosticados de MF entre 1991-2018 junto con sus datos evolutivos (ver tabla 5). Los controles fueron 30 pacientes que no progresaron, diagnosticados de micosis fungoide en estadio IA-IIA entre los años 1993-2009 para asegurar un seguimiento de al menos 13 años. Los casos fueron 21 pacientes que si progresaron, diagnosticados de micosis fungoide en estadio IA-IIA entre los años 1991-2018.

La totalidad de los pacientes procedían del Hospital 12 de Octubre y se realizó el análisis mediante tecnología NanoString en la Fundación Jiménez Díaz. Estas

muestras correspondían a biopsias al diagnóstico de MF en estadios iniciales IA-IIA.

La validación de las muestras estuvo a cargo del Dr. José Luis Rodríguez Peralto, siguiéndose los criterios anteriormente descritos. (ver tabla 2)

Se utilizó un láser de microdissección para seleccionar de la totalidad de la muestra la sección con más densidad de células neoplásicas para el estudio del ARN.

Preparación del ARN

El material se extrajo de bloques de parafina de 52 muestras. Se realizó la extracción del ARN total de las muestras utilizando el kit RNeasy (Qiagen, Hilden, Germany) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. La calidad del ARN se aseguró utilizando el kit de ScreenTape de ARN utilizando la tecnología de TapeStation Systems (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA).

Estudio de expresión genética mediante NanoString

Se utilizó un panel personalizado que incluía 97 genes relevantes en la patogénesis de la MF junto con genes conocidos por ser dianas terapéuticas en la MF con el panel nCounter® Flex Analysis System (NanoString Technologies, Seattle, WA, USA).

Se puede ver la lista de genes analizados en el anexo III.

La selección de genes en este panel se basó en los resultados obtenidos en el primer estudio en base al análisis GSEA y en estudios previos realizados por el grupo de investigación. Se incluyeron genes como marcadores de células T y B, marcadores de diferentes subpoblaciones T, dianas terapéuticas, señalización de citoquinas, migración, citoesqueleto de actina, apoptosis, y genes involucrados en las vías de señalización PI3K/AKT/MTOR, MAPK y ZEB1.

Las sondas se hibridaron con 100 ng del ARN total durante 16 horas a 65 °C. La eliminación automática del exceso de sonda y la inmovilización de complejos de transcripción de sonda en un cartucho recubierto de estreptavidina se llevaron a cabo en la estación de preparación annCounter. Luego, el cartucho de la estación de preparación nCounter se colocó en el analizador digital nCounter® para el recuento digital directo. Los valores de expresión génica se normalizaron con respecto a ocho genes domésticos.

En los casos de pacientes con muestras duplicadas se seleccionó la que vertió resultados de mejor calidad.

Análisis estadístico

El análisis estadístico se realizó gracias a la ayuda y colaboración de David Lora Pablos CIBER de Epidemiología y Salud Pública (imas12-CIBERESP) del Hospital Universitario 12 de Octubre.

Estadística descriptiva

Se realizó un análisis de datos epidemiológicos estudiando media con DS, percentiles y curvas de supervivencia de Kaplan-Meier para representación de curvas de supervivencia hasta eventos como muerte, muerte por linfoma, eritrodermia, ganglios, expresión leucémica en sangre, tumores y metástasis.

Estadística analítica

Se realizó una preselección inicial utilizando sólo los genes que tenían información del 80% de los pacientes o más (ver anexo II).

Se utilizó el lenguaje programación R para el estudio estadístico de los datos (versión 3.5.2 <https://www.R-project.org>, R Foundation for Statistical Computing, Viena, Austria) y el software de análisis estadístico GraphPad Prism 8.4.0 (San Diego, CA, EE.UU.).

Se utilizó el software de análisis Morpheus (Broad Institute, Cambridge, MA, EE.UU.) para representar los mapas de calor agrupados.

Los datos de expresión genética que inicialmente se transcribieron en forma logarítmica fueron normalizados y transformados mediante la técnica de z score, a media 0 con una desviación estándar (DS) de 1.

Análisis de progresión de la enfermedad: se consideró desde la fecha de inicio de la enfermedad a la fecha de progresión según el caso. Este análisis, que tiene en cuenta el tiempo, se ha realizado con el modelo de regresión de Cox, utilizado de forma univariante, empleando el test de Wald para obtener la significación estadística.

Análisis de agrupación

Se utilizó el análisis bi-cluster para agrupar los genes significativos en el análisis de expresión diferencia y los pacientes. La medida de distancia fue la euclídeana y el método completo de agrupamiento. El número óptimo de cluster fue identificado a través del paquete NbClust de R (Malika Charrad, Nadia Ghazzali, Veronique Boiteau, Azam Niknafs (2014). NbClust: An R Package for Determining the Relevant Number

of Clusters in a Data Set. Journal of Statistical Software, 61(6), 1-36. URL <http://www.jstatsoft.org/v61/i06/>). Se seleccionó aquel número de cluster con mayor coincidencia de los índices.

Análisis de diferenciación de genes

Se estudió la asociación entre cada uno de los genes con cada uno de los eventos tiempo-dependiente considerados: mortalidad global, muerte por linfoma, desarrollo de tumores, ganglios, eritrodermia, metástasis, expresión leucémica y progresión (abarcando cualquiera de los siguientes eventos: muerte por linfoma, desarrollo de tumores, ganglios, eritrodermia, metástasis, expresión leucémica) a través de los modelos de regresión de Cox. El p-valor obtenido fue corregido a través del método de Benjamini & Hochberg (1995). Aquellos genes con p-valor corregido inferior a 0,05 fueron identificados en el gráfico de volcán (volcano plot).

Para el estudio de genes diferentemente expresados se utilizó estudio del p valor, k-cambios de pliegues (k-fold change) y model bases analysis para hacer los grupos, según el evento de interés.

Para el estudio de asociación de supervivencia (evento) con los diferentes genes se estudió el coeficiente de riesgo (Hazard Ratio, HR) y el p valor.

Se consideró significativo un p valor de 0,05.

Se realizó el procedimiento de Benjamini-Hochbert con el objetivo de minimizar los errores de tipo I y corregir el p valor. El estudio de HR fue realizado con los datos normalizados y transformados y sin normalizar y transformar para valorar coherencia de resultados.

La representación gráfica se realizó mediante gráficos de volcán con HR representado en el eje x con la variable transformada teniendo HR de 0 como valor nulo y valores + como riesgo y - como protectores. En la fase de validación también se utilizaron gráficos de volcán representado en el eje x el fold change en escala logarítmica. En ambos casos el eje y representó el p valor transformando la variable en - logaritmo 10 teniendo como valor nulo 0,05 y siendo los valores por encima significativos.

Para el análisis por grupos se excluyeron los marcadores de secuencias expresadas y los genes con función desconocida.

Realizamos un análisis de clusters no jerarquizado mediante mapas de calor (heat map) para el estudio de las muestras.

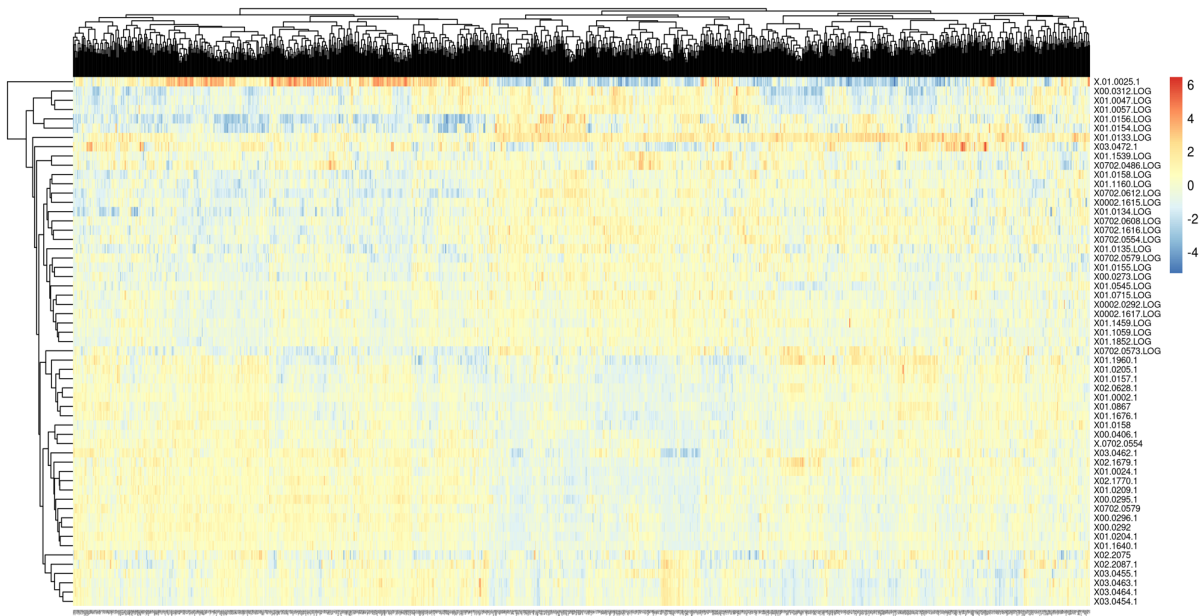


Figura 4: Heatmap que muestra la distribución en dos grupos (predominancia de azul vs amarillo/rojo)

Lo que reveló este análisis fue que las muestras se distribuían de forma espontánea en dos grupos (grupo uno marcado con log). Estas diferencias parecían deberse al momento en el que se realizó el microarray (efecto batch) ya que el análisis de la primera mitad de las muestras se hizo con un año de anterioridad al otro y probablemente las distintas condiciones de laboratorio y la configuración del chip causaron estas diferencias.

Se realizó un boxplot para mostrar la intensidad de expresión en las distintas muestras y una vez más se aprecian dos grupos diferentes, donde el grupo marcado con LOG tiene un rango de expresión más amplio.

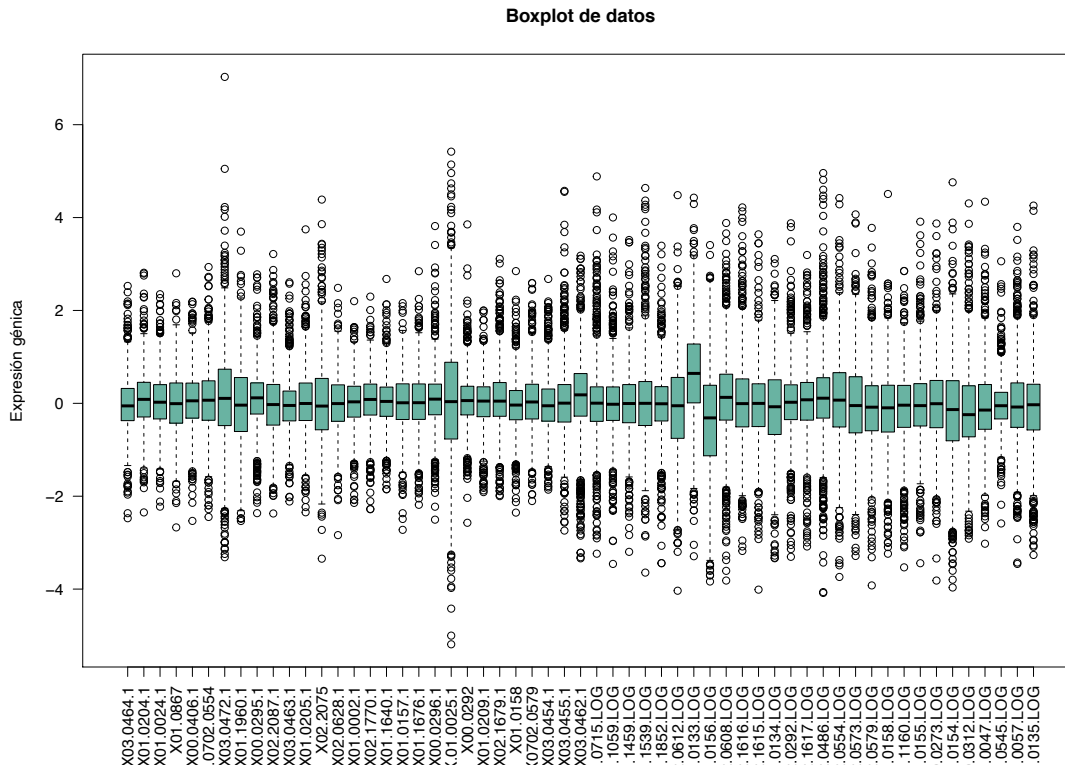


Figura 5: Boxplot de datos que muestra la diferencia de rango de expresión génica entre ambos grupos marcados con X/LOG)

La consecuencia de esto es que al normalizar y transformar las muestras estábamos ocultando las diferencias entre los pacientes del grupo dos. Las diferencias entre estos grupos se justificaron por el momento en el que se hizo el microarray ya que hubo una diferencia de un año entre el primer grupo y el segundo grupo. Las diferencias en las condiciones de laboratorio y la construcción del propio microarray justificaban las diferencias encontradas.

Por ello se decidió dividir la muestra en dos grupos de pacientes de 29 y 28 pacientes respectivamente de acuerdo al momento en el que se hizo el análisis. Posteriormente se realizó una normalización y transformación de los datos de forma separada y análisis de expresión, de gráficos de volcán y un el estudio de enriquecimiento de grupos de genes mediante GSEA de forma separada.

Grupo 1 representa los pacientes 1-29 y el grupo dos pacientes 30 a 57.

Análisis de expresión génica

Las funciones biológicas de los genes expresados se asignaron utilizando la base de datos GENECARDS (<https://www.genecards.org/>).

Se realizó el análisis de enriquecimiento de genes (gene set enrichment analysis) mediante el software **GSEA** y Molecular Signature Database (MSigDB) (Subramanian, Tamayo, et al. (2005), PNAS 102, 15545-15550, <http://www.broad.mit.edu/gsea/>).

Se utilizaron los datos completos de expresión genética en lugar de prefiltrar una lista de genes fuertemente expresados de manera diferente para capturar cambios coordinados de bajo nivel en genes que pertenecen a vías comunes y están regulados por las mismas redes transcripcionales.

RESULTADOS

RESULTADOS

Estadística descriptiva

La media de tiempo de seguimiento en nuestra serie fue de 13,54 años.

La distribución por sexos de nuestra muestra fue de un 54,4% eran mujeres (45,6% varones). La edad media al diagnóstico fue de 50 años con una media de 46 años edad en mujeres y 53 años de edad en el caso de los hombres.

El 96,5% tenían un estadio inicial I (IA 49,1%, IB 47,4%) en el momento de comenzar el estudio. El 3,5% restante se encontraban en estadio II (2 pacientes).

Durante los años que se realizó el seguimiento un 54,4% de los pacientes mantuvieron como estadio máximo IA o IB y un 63% no pasó del estadio IIA durante los 20 años de evolución del seguimiento de la enfermedad. En la última visita recogida se encontraban en remisión completa un 35% de los pacientes.

La supervivencia global de la muestra desde diagnóstico fue de 14,3 años (DS 6.11). Durante el seguimiento un 35% de los pacientes fallecieron. Un 17,5% de la n total corresponde a fallecimientos causados en relación a la MF, es decir la mitad de los fallecimientos fueron en relación al linfoma. El total de los fallecimientos por linfoma sucedieron antes de los 15 años de seguimiento.

A continuación, se muestran las curvas de supervivencia de Kaplan-Meier para los distintos desenlaces.

Muerte por todas las causas:

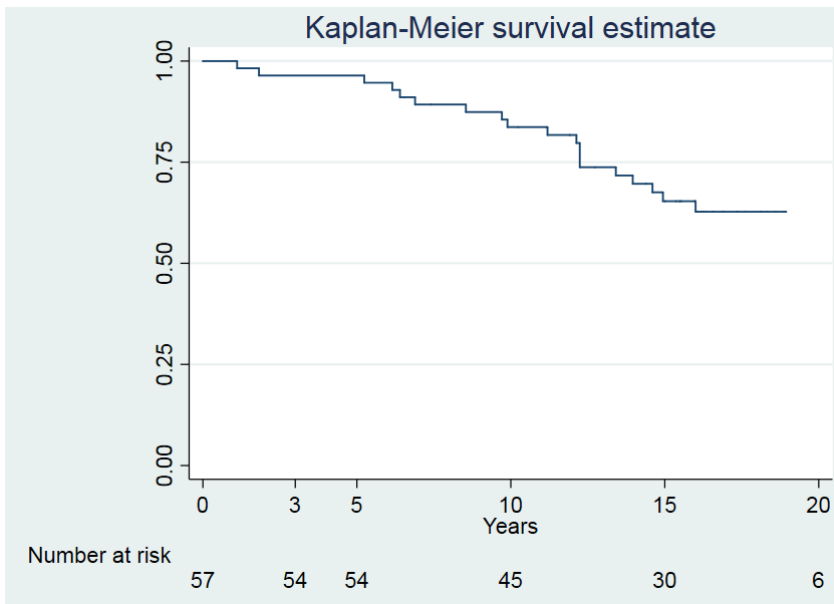


Figura 6: Curva de supervivencia de Kaplan-Meier para fallecimiento por cualquier causa.

Muerte por linfoma:

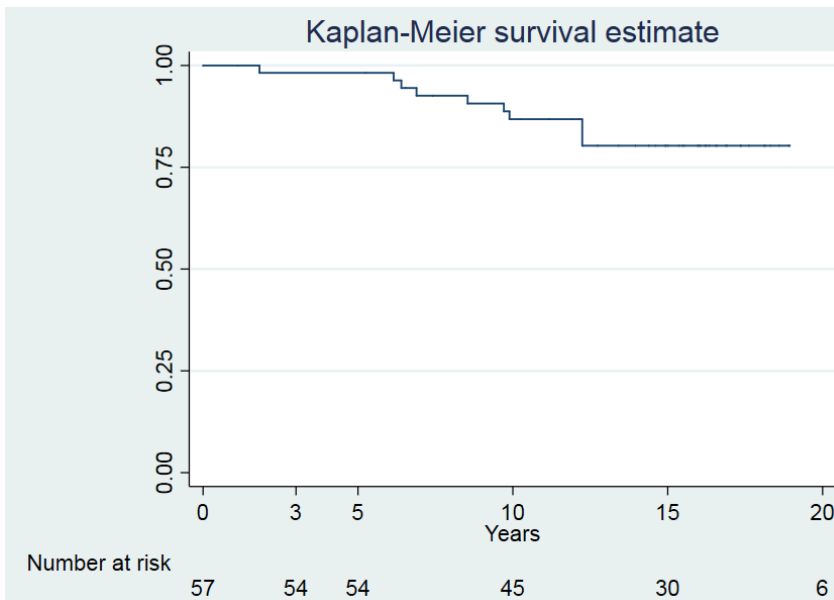


Figura 7: Curva de supervivencia de Kaplan-Meier para fallecimiento por linfoma.

Se aprecia un aumento de fallecimientos y fallecimientos por linfoma con forme avanzan los años.

Respecto a los hitos de seguimiento (eritrodermia, ganglios, expresión leucémica, tumores, metástasis) estos son los resultados:

- Eritrodermia: un 8,8% de los pacientes desarrolló eritrodermia con una media de 13 años (DS 6,88) hasta su desarrollo. En este caso a los 10 años del diagnóstico la supervivencia libre de enfermedad fue del 89% (Intervalo de confianza 95% (IC) 77-95%). La tendencia se mantuvo estable durante el resto del seguimiento.

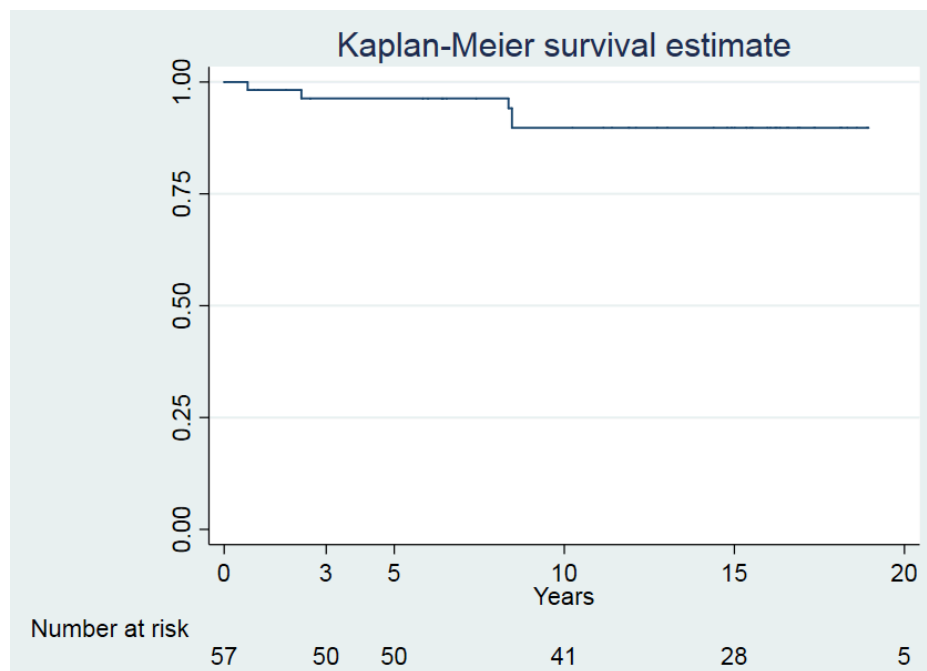


Figura 8: Curva de supervivencia de Kaplan-Meier para eritrodermia.

- Ganglios (estadios N1 a N3): fueron observados en el 22,8% de los pacientes, con una media de 12,8 (DS 7,13) años hasta su desarrollo. En este caso a los 10 años del diagnóstico la supervivencia libre de enfermedad fue del 82% (IC 69-90%), bajando hasta un 74% (IC 59-85%) a los 15 años.

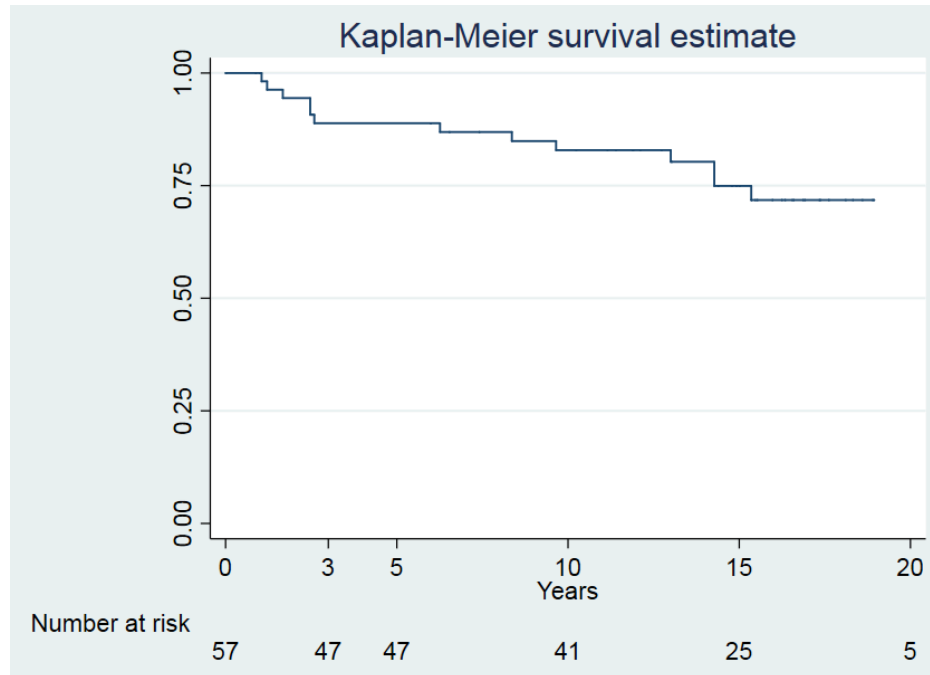


Figura 9: Curva de supervivencia de Kaplan-Meier para desarrollo de adenopatías.

- Expresión leucémica en sangre: fue detectada en el 10,5% de los pacientes con una media de 13,1 años (DS 7) hasta su desarrollo. La supervivencia libre de enfermedad a los 10 años fue del 94% (IC 83-98%), bajando a un 87% a los 15 años (IC 73-94%).

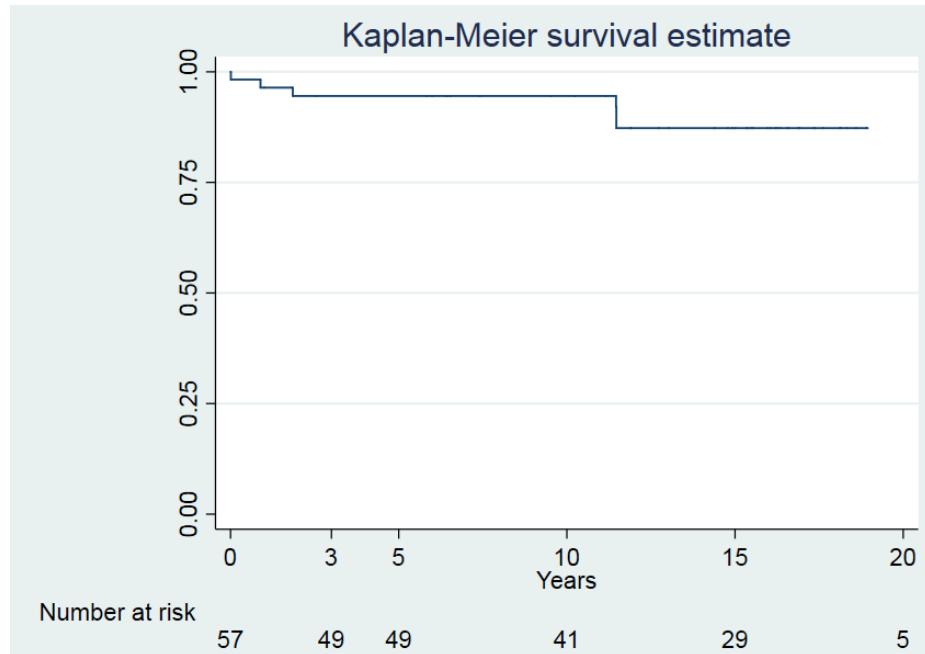


Figura 10: Curva de supervivencia de Kaplan-Meier para desarrollo de expresión leucémica en sangre.

- Tumores: se detectó la aparición de lesiones tumorales hasta en un 29,8% de los pacientes con una media de 12 años (DS 7,5) hasta su desarrollo. La supervivencia libre de enfermedad a los 10 años fue del 73% (IC 59-83%) bajando a un 66% (IC 51-77%) a los 15 años.

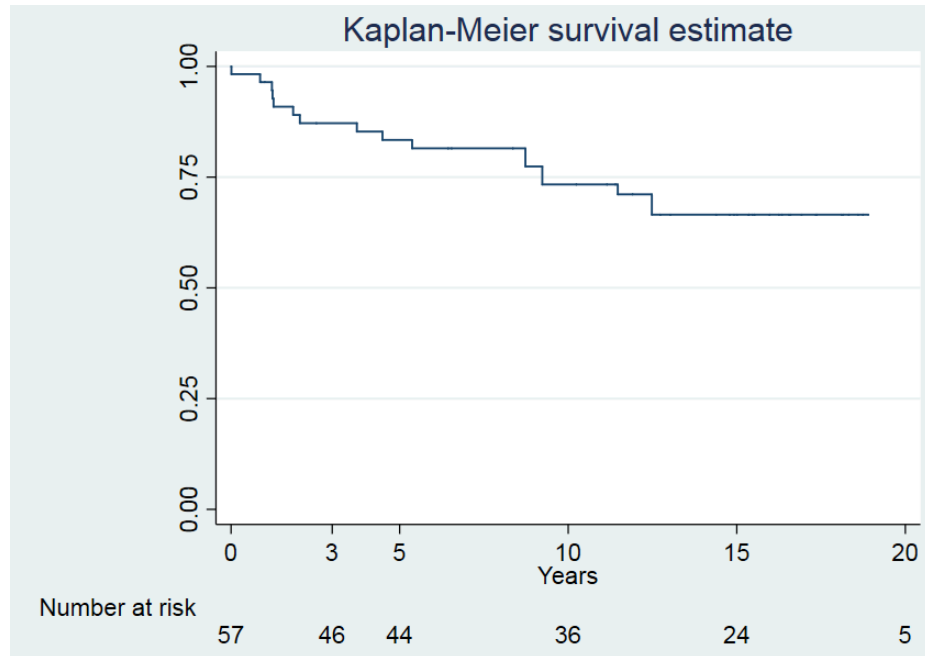


Figura 11: Curva de supervivencia de Kaplan-Meier para desarrollo de tumores.

- Metástasis: fueron los fenómenos más raros recogidas en hasta un 3,5% de los pacientes, en esos casos con una media de 13,7 años (DS 6,5) hasta su aparición. La localización de las lesiones fue cerebral y laringe. La supervivencia libre de enfermedad a los 10 años fue del 96% (IC 85-99%), esta tendencia se mantuvo hasta el final del seguimiento.

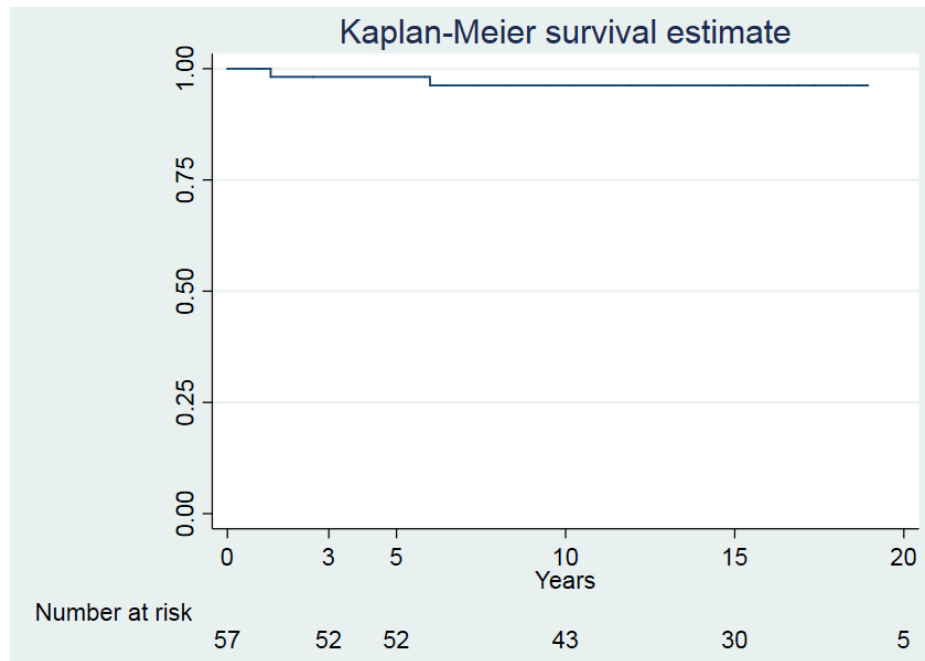


Figura 12: Curva de supervivencia de Kaplan-Meier para desarrollo de metástasis.

- Progresión: A los 20 años se registró progresión, entendiéndose como cualquier fenómeno de desarrollo de eritrodermia, ganglios, tumores, metástasis, expresión leucémica en sangre o muerte por linfoma en un 40,35% de los pacientes. Con una media de 10,9 años (DS 8) hasta su desarrollo. La supervivencia libre de enfermedad a los 10 años fue del 64% (IC 50-75%) bajando a un 58% (IC 43-70%) a los 15 años.

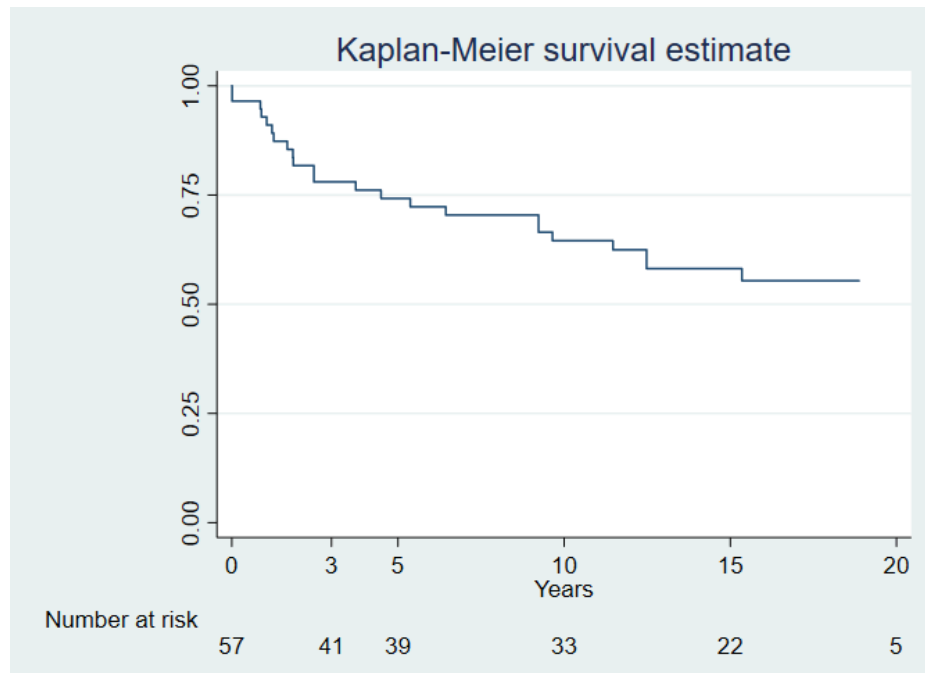


Figura 13: Curva de supervivencia de Kaplan-Meier para progresión

Podemos ver en la siguiente tabla los diferentes datos relativos a supervivencia y como cambia con el paso de los años.

	Años	Supervivencia	ES	95% IC
Eritrodermia	10	0.89	0.04	0.77-0,95
	15	0.89	0.04	0.77-0,95
	20	0.89	0.04	0.77-0,95
Ganglios	10	0.82	0,05	0.69-0.90
	15	0.80	0.06	0.59-0.85
	20	0.71	0.06	0.55-0.82
Expresión Leucémica	10	0.94	0.03	0.83-0.98
	15	0.87	0.04	0.73-0.94
	20	0.87	0.04	0.73-0.94
Tumores	10	0.73	0.05	0.59-0.83
	15	0.66	0.06	0.51-0.77
	20	0.66	0.06	0.51-0.77
Metástasis	10	0.96	0.02	0.85-0.99
	15	0.96	0.02	0.85-0.99
	20	0.96	0.02	0.85-.99

Tabla 6: Análisis de supervivencia para los distintos eventos a 10,15 y 20 años. IC (intervalo de confianza). ES (error estándar).

Se realizó un análisis de regresión de Cox multivariante entre las variables clínicas, edad al diagnóstico y sexo, para valorar si existían diferencias significativas respecto al pronóstico. No hubo diferencias significativas entre las diferentes variables.

Vemos los resultados en las siguientes tablas, donde se muestra el coeficiente de riesgo (Hazard Ratio, HR), la desviación estándar (DS), el p valor y el intervalo de confianza (IC).

Supervivencia global:

	HR	DS	P VALOR	IC
SEXO H:M	1,13	0,51	0,78	(0,46-2,76)
EDAD	1,01	0,01	0,21	(0,99-1,04)

Tabla 7: Análisis de HR de fallecimiento por cualquier causa para la n total

GRUPO 1	HR	DS	P VALOR	IC
SEXO H:M	0,88	0,70	0,88	(0,18-4,20)
EDAD	1,00	0,02	0,80	(0,95-1,05)

Tabla 8: Análisis de HR de fallecimiento por cualquier causa para el grupo 1.

GRUPO 2	HR	DS	P VALOR	IC
SEXO H:M	1,73	1,02	0,34	(0,54-5,53)
EDAD	1,01	0,01	0,61	(0,97-1,04)

Tabla 9: Análisis de HR de fallecimiento por cualquier causa para el grupo 2.

Riesgo de muerte por linfoma

	HR	DS	P VALOR	IC
SEXO H:M	0,93	0,62	0,92	(0,25-3,44)
EDAD	0,96	0,19	0,06	(0,92-1,00)

Tabla 10: Análisis de HR de fallecimiento por linfoma para la n total.

GRUPO 1	HR	DS	P VALOR	IC
SEXO H:M	0,41	0,44	0,41	(0,48-3,48)
EDAD	0,95	0,03	0,18	(0,89-1,02)

Tabla 11: Análisis de HR de fallecimiento por linfoma para el grupo 1.

GRUPO 2	HR	DS	P VALOR	IC
SEXO H:M	1,81	1,67	0,49	(0,33-9,91)
EDAD	0,95	0,02	0,12	(0,90-1,01)

Tabla 12: Análisis de HR de fallecimiento por linfoma para el grupo 2.

Riesgo de eritrodermia

	HR	DS	P VALOR	IC
SEXO H:M	1,91	0,21	0,14	(0,20-1,74)
EDAD	0,98	0,27	0,71	(0,93-1,04)

Tabla 13: Análisis de HR de desarrollo de eritrodermia para la n total.

GRUPO 1	HR	DS	P VALOR	IC
SEXO H:M	3,12E-37	2,31E-29	1,00	(0)
EDAD	0,01	38816,7	1,00	(0)

Tabla 14: Análisis de HR de desarrollo de eritrodermia para el grupo 1.

GRUPO 2	HR	DS	P VALOR	IC
SEXO H:M	0,34	0,39	0,35	(0,03-3,29)
EDAD	1,01	0,03	0,68	(0,95-1,07)

Tabla 15: Análisis de HR de desarrollo de eritrodermia para el grupo 2.

Riesgo de adenopatías

	HR	DS	P VALOR	IC
SEXO H:M	0,50	0,29	0,24	(0,16-1,58)
EDAD	1,00	0,01	0,78	(0,97-1,03)

Tabla 16: Análisis de HR de desarrollo de adenopatías para la n total.

GRUPO 1	HR	DS	P VALOR	IC
SEXO H:M	0,23	0,30	0,27	(0,16-3,19)
EDAD	0,96	0,03	0,40	(0,89-1,04)

Tabla 17: Análisis de HR de desarrollo de adenopatías para el grupo 1.

GRUPO 2	HR	DS	P VALOR	IC
SEXO H:M	0,67	0,43	0,54	(0,18-2,40)
EDAD	1,01	0,01	0,62	(0,97-1,04)

Tabla 18: Análisis de HR de desarrollo de adenopatías para el grupo 2.

Riesgo de expresión leucémica en sangre

	HR	DS	P VALOR	IC
SEXO H:M	1,44	1,29	0,43	(0,25-8,26)
EDAD	0,99	0,02	0,06	(0,94-1,04)

Tabla 19: Análisis de HR de desarrollo de expresión leucémica en sangre para la n total.

GRUPO 1	HR	DS	P VALOR	IC
SEXO H:M	0,49	0,74	0,64	(0,26-9,40)
EDAD	0,98	0,04	0,68	(0,89-1,07)

Tabla 20: Análisis de HR de desarrollo de expresión leucémica en sangre el grupo 1.

GRUPO 2	HR	DS	P VALOR	IC
SEXO H:M	3,00	3,49	0,34	(0,30-29,41)
EDAD	0,99	0,03	0,79	(0,93-1,05)

Tabla 21: Análisis de HR de desarrollo de expresión leucémica en sangre el grupo 2.

Riesgo de tumores

	HR	DS	P VALOR	IC
SEXO H:M	0,78	0,39	0,63	(0,29-2,09)
EDAD	0,98	0,14	0,17	(0,95-1,00)

Tabla 22: Análisis de HR de desarrollo de tumores para la n total.

GRUPO 1	HR	DS	P VALOR	IC
SEXO H:M	0,76	0,55	0,70	(0,46-2,76)
EDAD	0,98	0,02	0,58	(0,99-1,04)

Tabla 23: Análisis de HR de desarrollo de tumores para el grupo 1.

GRUPO 2	HR	DS	P VALOR	IC
SEXO H:M	0,95	0,67	0,94	(0,23-3,82)
EDAD	0,96	0,02	0,13	(0,92-1,01)

Tabla 24: Análisis de HR de desarrollo de tumores para el grupo 2.

Riesgo de metástasis

	HR	DS	P VALOR	IC
SEXO H:M	3,71E15	1,76E23	1	(0-.)
EDAD	0,95	0,04	0,36	(0,87-1,05)

Tabla 25: Análisis de HR de desarrollo de metástasis para la n total.

GRUPO 1	HR	DS	P VALOR	IC
SEXO H:M	9,30E14	5,10E22	1,00	(0-.)
EDAD	0,95	0,06	0,48	(0,83-1,09)

Tabla 26: Análisis de HR de desarrollo de tumores para la el grupo 1.

GRUPO 2	HR	DS	P VALOR	IC
SEXO H:M	1,53E16	.	.	(0-.)
EDAD	0,94	0,07	0,36	(0,80-1,11)

Tabla 27: Análisis de HR de desarrollo de tumores para la el grupo 2.

Riesgo de progresión

	HR	DS	P VALOR	IC
SEXO H:M	0,67	0,28	0,36	(0,29-1,56)
EDAD	0,99	0,01	0,86	(0,97-1,02)

Tabla 28: Análisis de HR de progresión para la n total.

GRUPO 1	HR	DS	P VALOR	IC
SEXO H:M	0,57	0,39	0,45	(0,14-2,22)
EDAD	0,98	0,01	0,61	(0,95-1,02)

Tabla 29: Análisis de HR de progresión para el grupo 1.

GRUPO 2	HR	DS	P VALOR	IC
SEXO H:M	0,79	0,44	0,67	(0,26-2,37)
EDAD	1,00	0,01	0,95	(0,96-1,03)

Tabla 30: Análisis de HR de progresión para el grupo 2.

Análisis de diferenciación de genes

Se realizó un análisis mediante gráficos de volcán de asociación de genes con riesgo de progresión y del resto de variables estudiadas.

Las variables: muerte por linfoma, tumores, expresión leucémica en sangre, metástasis y muerte por cualquier y progresión causa no mostraron genes con una asociación significativa lo cual se muestra en los siguientes gráficos de volcán.

Se relacionó la expresión logarítmica de la p en el eje y con la hazard ratio en el eje X.

Muerte por cualquier causa

Grupo 1

Grupo 2

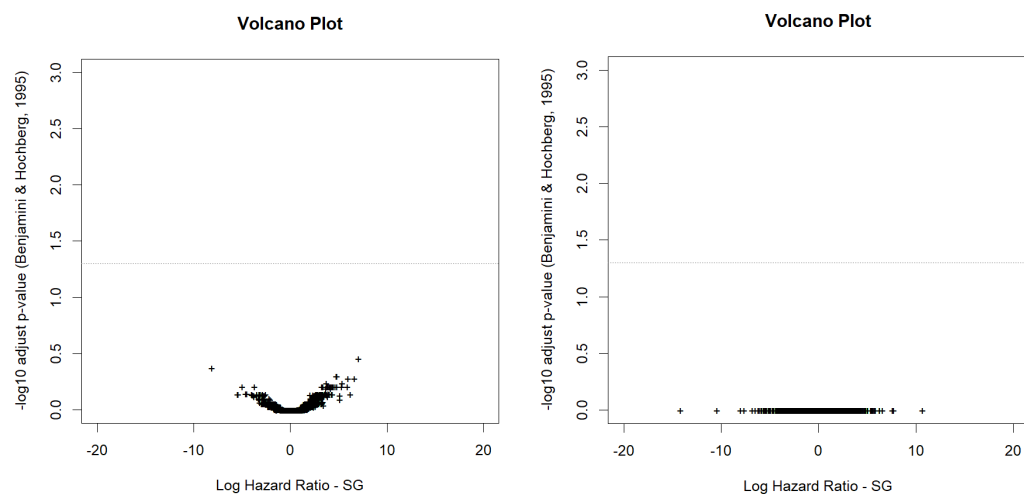


Figura 14: Gráfico de volcán de diferencia de expresión de genes para fallecimiento por cualquier causa en los grupos 1 y 2.

Muerte por linfoma

Grupo 1

Grupo 2

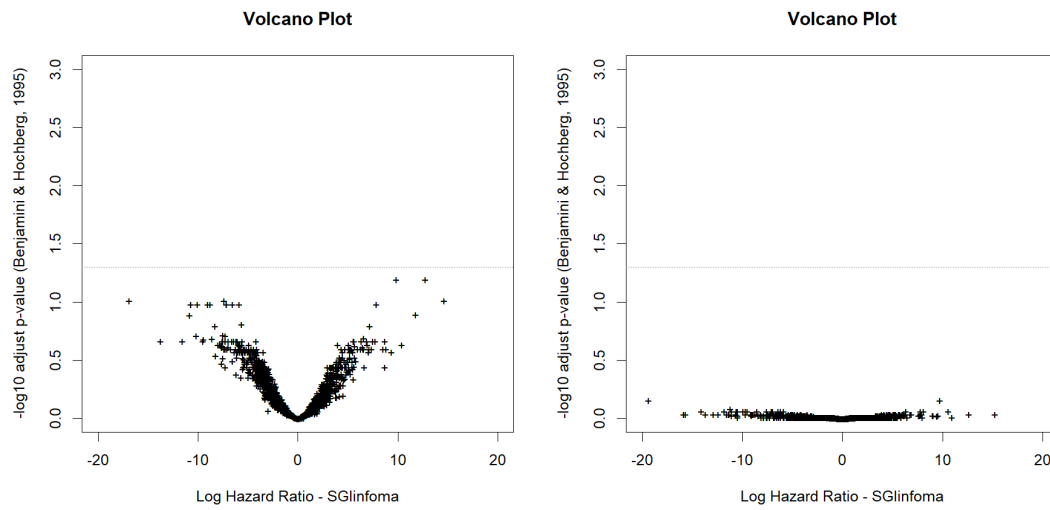


Figura 15: Gráfico de volcán de diferencia de expresión de genes para fallecimiento por linfoma en los grupos 1 y 2.

Metástasis

Grupo 1

Grupo 2

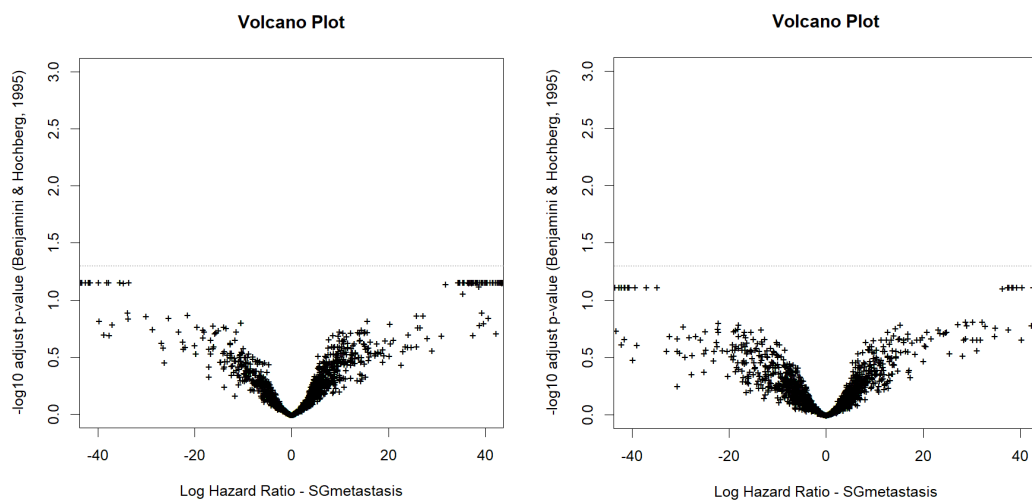


Figura 16: Gráfico de volcán de diferencia de expresión de genes para desarrollo de metástasis en los grupos 1 y 2.

Expresión leucémica en sangre

Grupo 1

Grupo 2

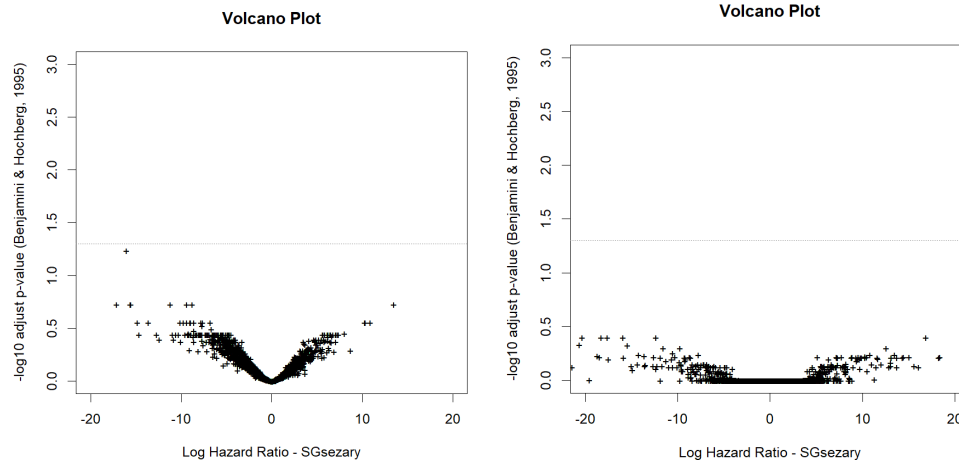


Figura 17: Gráfico de volcán de diferencia de expresión de genes para desarrollo de expresión leucémica en sangre en los grupos 1 y 2.

Desarrollo de tumores

Grupo 1

Grupo 2

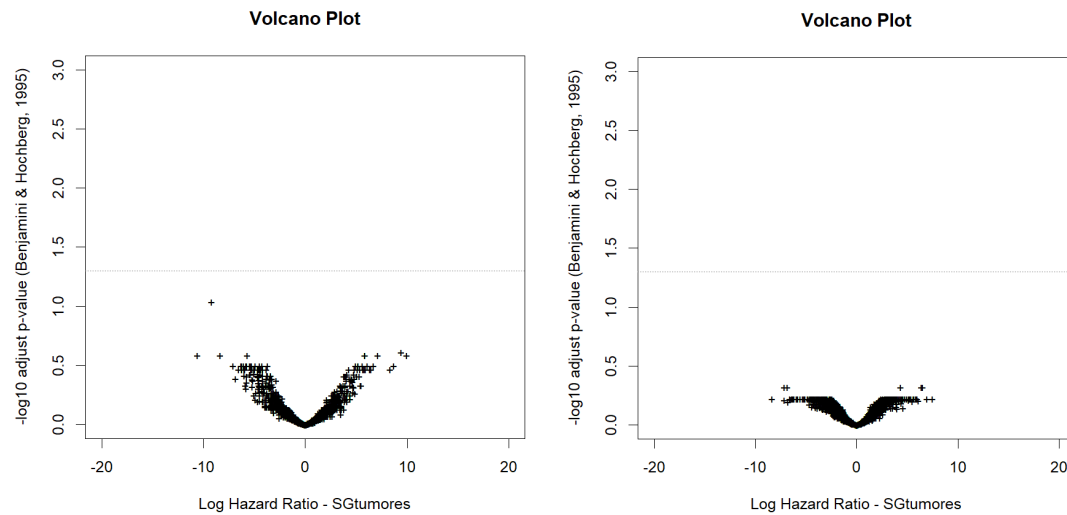
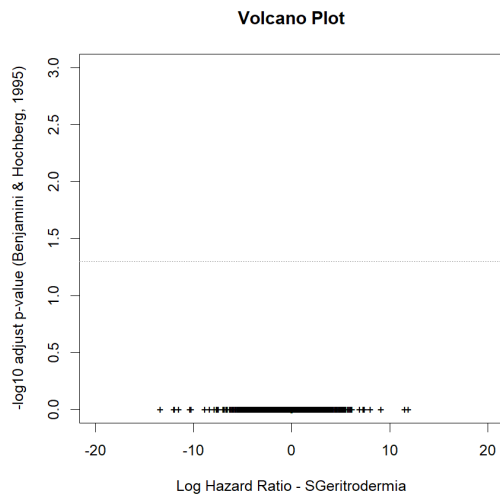


Figura 18: Gráfico de volcán de diferencia de expresión de genes para desarrollo de tumores en los grupos 1 y 2.

Eritrodermia

Grupo 1



Grupo 2

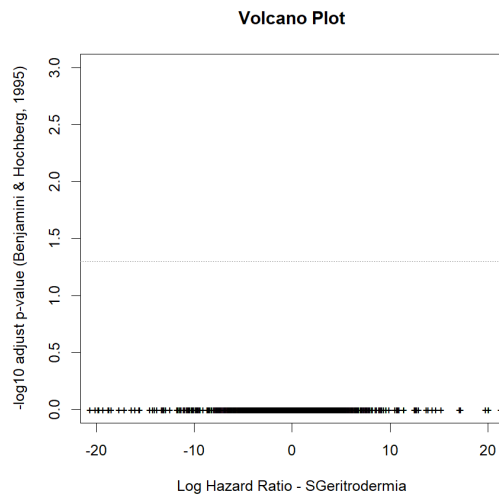
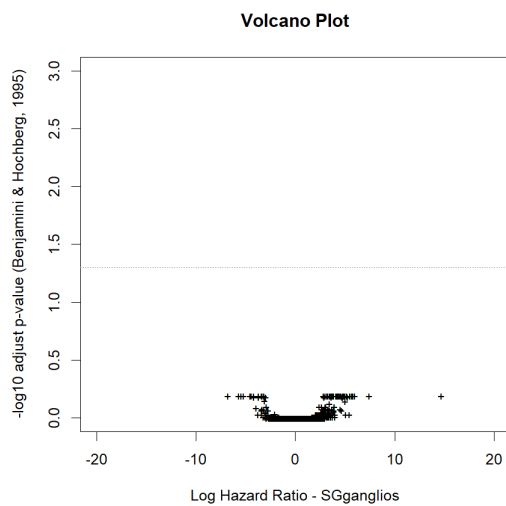


Figura 19: Gráfico de volcán de diferencia de expresión de genes para desarrollo de eritrodermia en los grupos 1 y 2.

Ganglios

Grupo 1



Grupo 2

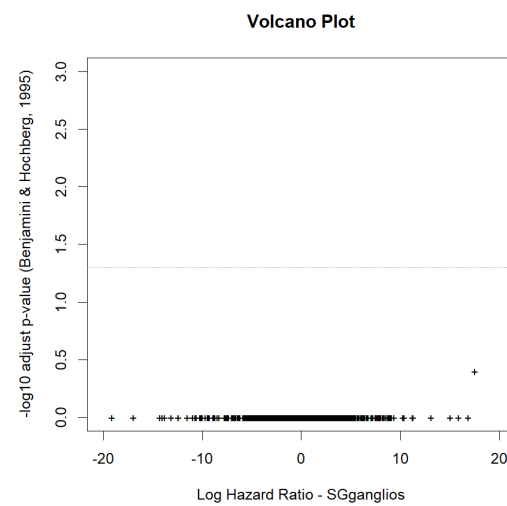


Figura 20: Gráfico de volcán de diferencia de expresión de genes para desarrollo de adenopatías en los grupos 1 y 2.

Progresión

Entendiendo como progresión cualquier evento como ganglios, tumores, eritrodermia, expresión leucémica, metástasis y muerte por linfoma, durante el seguimiento.

Grupo 1

Grupo 2

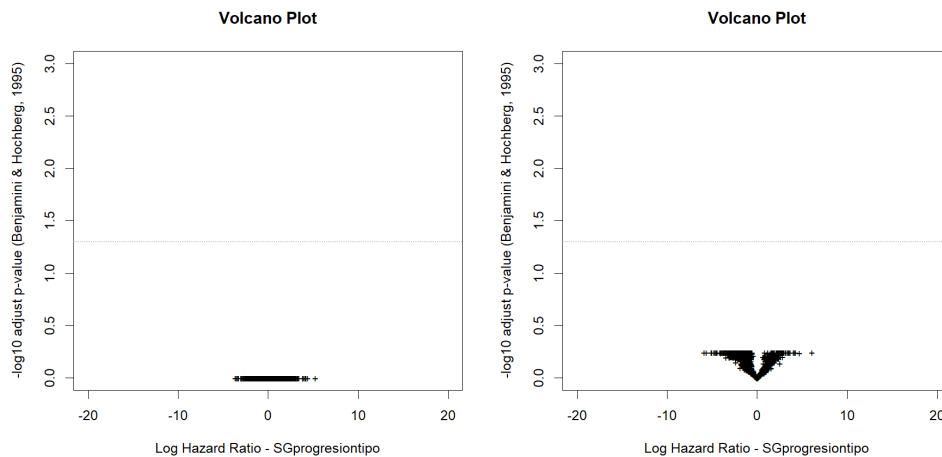


Figura 21: Gráfico de volcán de diferencia de expresión de genes progresión en los grupos 1 y 2.

Como se aprecia no hubo genes significativos en el estudio mediante gráficos de volcán.

Análisis de grupos

Selección mediante GSEA de heat map de los genes más implicados en progresión mediante el análisis de grupos (clusters).

Grupo 1

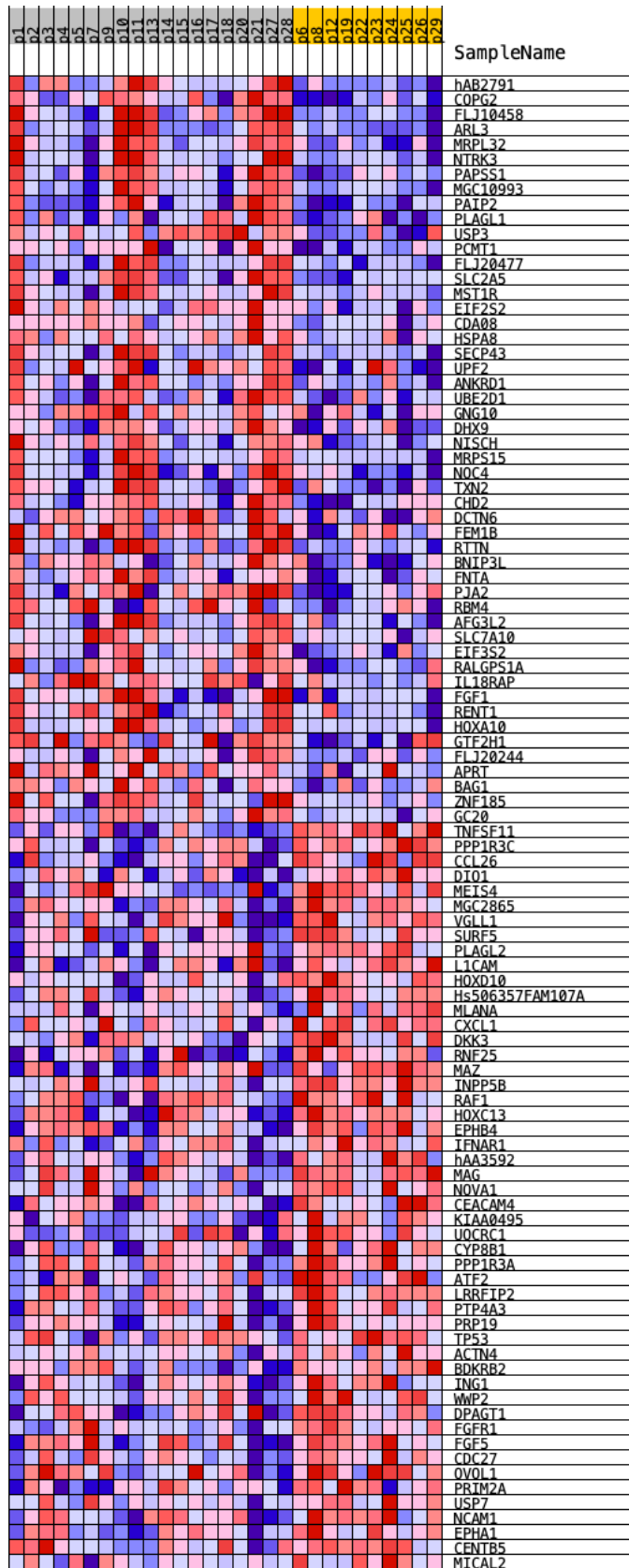


Figura 22: Heat Map de diferencia de expresión de genes en progresión del grupo 1. Azul representa infraexpresión y rojo sobreexpresión. En amarillo los pacientes que no progresaron.

Grupo 2

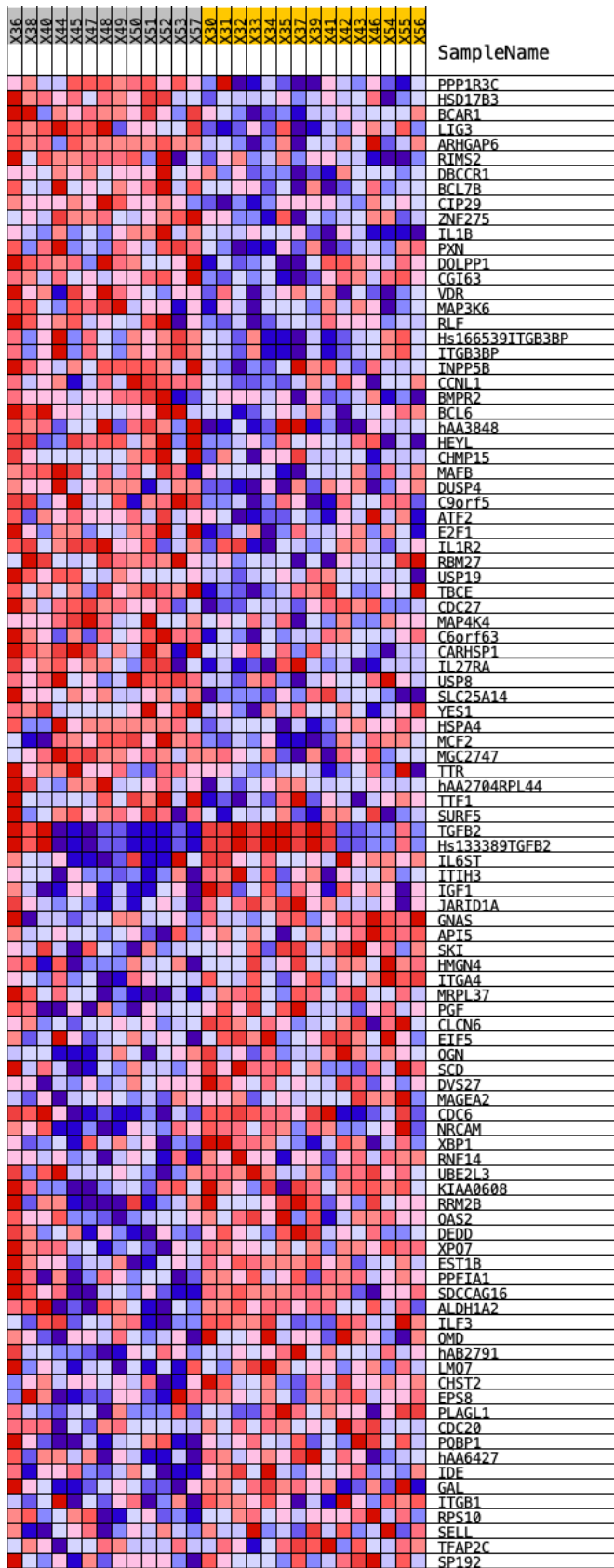


Figura 23: Heat Map de diferencia de expresión de genes en progresión del grupo 2. Azul representa infraexpresión y rojo sobreexpresión. En amarillo los pacientes que no progresaron.

En el heat map del grupo 1 destaca la presencia de TP53 sobreexpresado en no progresión, infraexpresado en progresión.

En el heatmap del grupo 2 destaca la presencia de SELL, ITGB1 y ITGA4 sobreexpresados en no progresión, infraexpresados en progresión.

Además, en ambos grupos se repiten los genes PPP1R3C y PLAGL1.

Análisis de enriquecimiento GSEA

Se realizó el análisis de enriquecimiento GSEA con todos los genes estudiados para buscar vías metabólicas alteradas en los casos de progresión.

Para ambos grupos se analizaron 2293 genes recogidos en el anexo II. Se estudiaron los conjuntos de genes de dos bases de datos la base de datos del CNIO para linfomas con 119 grupos de genes y la base de datos H.all (HALLMARK) con 50 grupos de genes. Localizando cambios de expresión relevantes en varias de esas vías.

Rutas y genes diferencialmente expresados. Grupo 1

El estudio mediante las bases del CNIO mostró 2 grupos de genes expresados diferencialmente con una $p < 5\%$ en progresión.

Vía del receptor de interferón alfa 1 (IFNAR1) $p 0,012$, NES (normalized enrichment score) $-1,51$, FDR 1. Compuesta por los genes: IFNAR1, JAK1, IFNAR2.

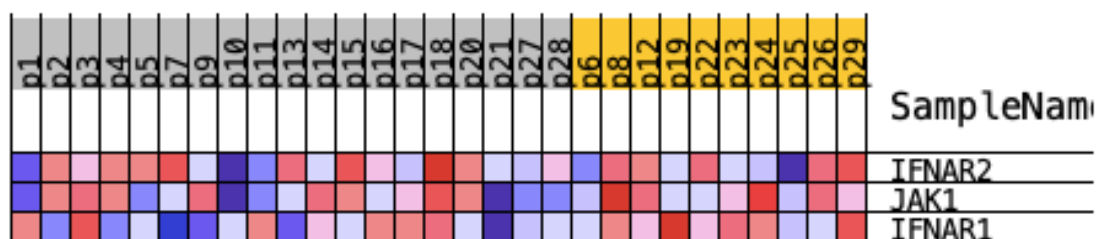


Figura 24: Heat Map de diferencia de expresión en la vía del receptor de interferón alfa 1. Grupo 1. Azul representa infraexpresión y rojo sobreexpresión. En amarillo los pacientes progresaron.

Vía P53 $p0,032$. NES $-1,48$, FDR 1. Compuesta por los genes: MDM2, ABCB1 (ATP Binding Cassette Subfamily B Member 1), TP53.

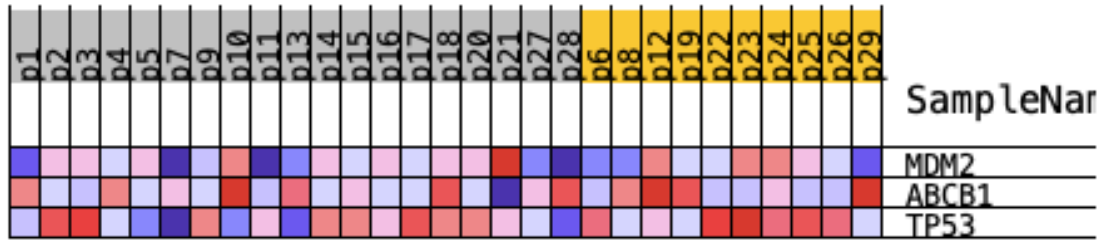


Figura 25: Heat Map de diferencia de expresión en la vía de p53. Grupo 1. Azul representa infraexpresión y rojo sobreexpresión. En amarillo los pacientes progresaron.

Sin llegar a ser significativo también se observó diferente expresión en no progresión de vías relacionadas con IL2, KRAS, MAPK, IL6, NOTCH, ERK.

No hubo grupos de genes significativos en asociación con no progresión, pero si observó diferente expresión en vías relacionadas con mTOR, AKT.

Con las bases de HALLMARK no hubo grupos de genes con diferencias significativas en progresión, pero si observó diferente expresión en vías relacionadas con p53, IL2-JAK-STAT, KRAS (Kirsten rat sarcoma viral oncogene), MYC, PIK-AKT-mTOR, IL6-JAK-STAT.

El estudio mediante las bases de HALLMARK mostró 1 grupo de genes expresados diferencialmente con una $p < 1\%$ en no progresión.

Este fue el grupo de genes relacionados con la respuesta a UV P 0,007, NES 1,62, FDR 0,40. Compuesto por los genes:

NTRK3 (neurotrophic receptor tyrosine kinase 3), CCNE1 (ciclina E1), RAB27A, LYN, CEBPG (CCAAT enhancer binding protein gamma), IL6ST (interleukin 6 cytokine family signal transducer), GAL (galanin), PSMC3, RRAD (Ras related glycolysis inhibitor and calcium channel regulator), ATF3 (activating transcription factor 3), SOD2 (superoxide dismutase 2), BAK1 (brassinosteroid-insensitive 1 (BRI1) associated receptor kinase 1), STIP1 (stress-induced-phosphoprotein 1), GCH1 (GTP cyclohydrolase 1), BMP2 (bone morphogenetic protein 2), PRKCD (protein kinase C delta), RFC4 (replication factor C subunit 4), E2F2, IRF1(interferon regulatory factor 1), RASGRP1 (RAS guanyl-releasing protein 1), BTG3, CDKN1C (cyclin dependent kinase inhibitor 1C), ATP6V1F (ATPase H⁺ transporting V1 subunit F), CHKA (choline kinase alpha), EIF5 (eukaryotic translation initiation factor 5), POLE3, CDC5 (cell division cycle 5), UROD (uroporphyrinogen decarboxylase), CDC34 (cell division cycle 34, ubiquitin conjugating enzyme), NR4A1 (nuclear receptor subfamily 4 group A member 1), ENO2 (enolase 2), JUNB, SLC6A8 (solute carrier family 6 member 8), DNAJB1 (DnaJ heat shock protein family (Hsp40) member B1), IGFB2(insulin like growth factor binding protein 2), CDK2, PPIF (Peptidylprolyl Isomerase F), ABCB1, RXRB (retinoid X receptor beta), PPT1 (palmitoyl-protein thioesterase 1), SPOP (speckle type BTB/POZ protein), KIT, MET, EIF5, FURIN.

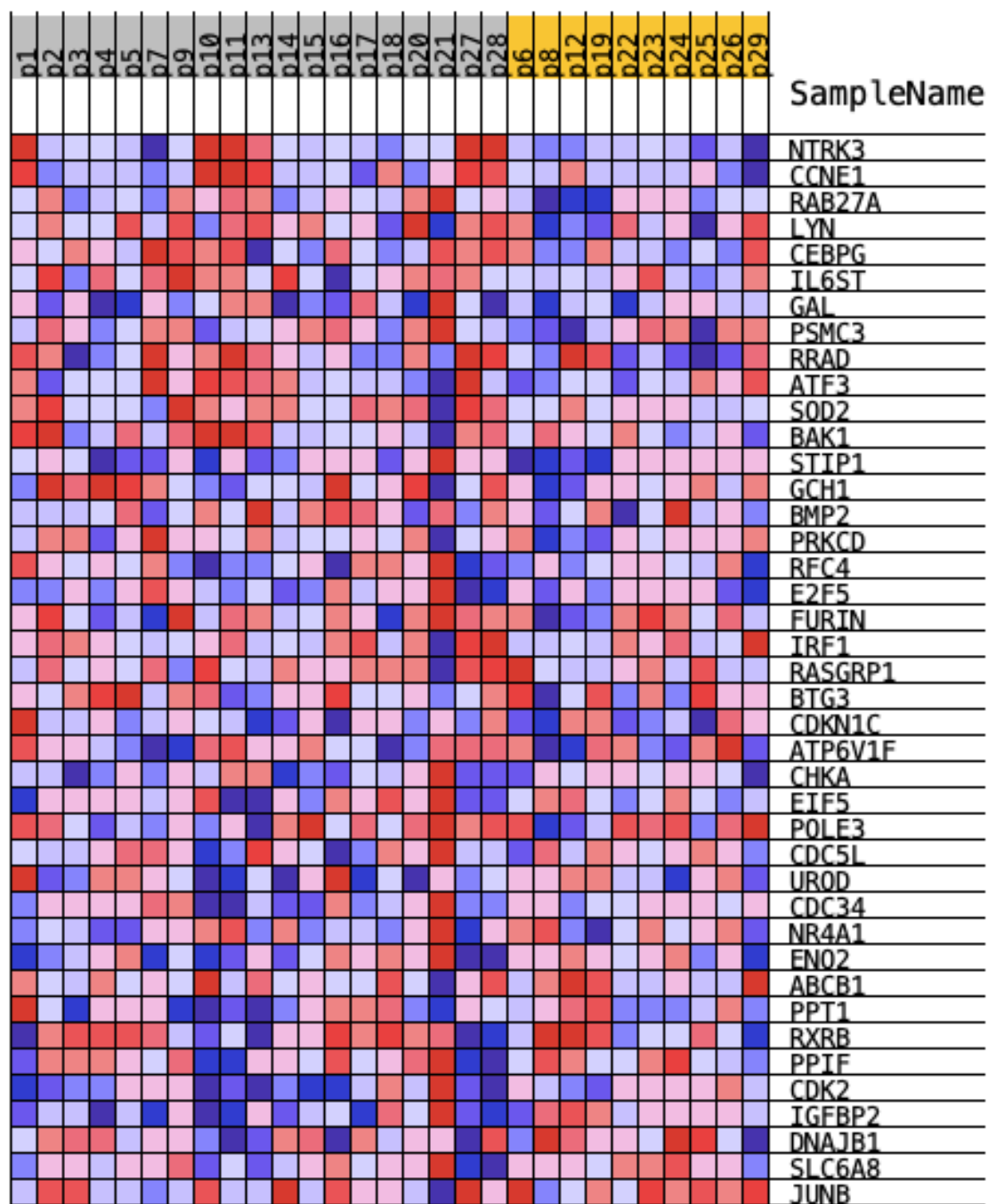


Figura 26: Heat Map de diferencia de expresión en la vía de respuesta a UV. Grupo 1. Azul representa infraexpresión y rojo sobreexpresión. En amarillo los pacientes progresaron.

Sin llegar a ser significativo también se observó diferente expresión en no progresión de vías relacionadas con c MYC y mTOR.

Por lo tanto, a modo de resumen se apreciaron diferencias de expresión en las vías relacionadas con PI3K/AKT/mTOR, MAPK/ERK, JAK/STAT, NOTCH/MYC y ciclo celular.

Rutas y genes diferencialmente expresados. Grupo 2

Estudio mediante bases del CNIO para progresión:

1 grupo de genes mostró diferencias significativas con una FDR < 25% y p < 1%.

4 grupos de genes resultaron significativos con una p < 5%.

El primer grupo corresponde a la vía CXCR4 p 0,000, NES 1.91 y FDR de 0,027.

Esta vía está formada por los genes BCAR1 (breast cancer anti-estrogen resistance protein 1), PXN (paxillin), PIK3CA (phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase catalytic subunit alpha), PTK2 (protein tyrosine kinase 2), PIK3R1, PRKCA (protein kinase C alfa), HRAS, RAF1, CXCL12 (C-X-C motif chemokine ligand 12), PIK3C2G (phosphatidylinositol-4-phosphate 3-kinase catalytic subunit type 2 gamma), GNB1(G protein subunit beta 1).

Como se puede ver en el heatmap del estudio realizado, aunque la vía CXCR4 estaba enriquecida en progresión, la expresión de CXCL12 estaba inhibida. CXCR4 lamentablemente no formaba parte de los genes analizados mediante GSEA.

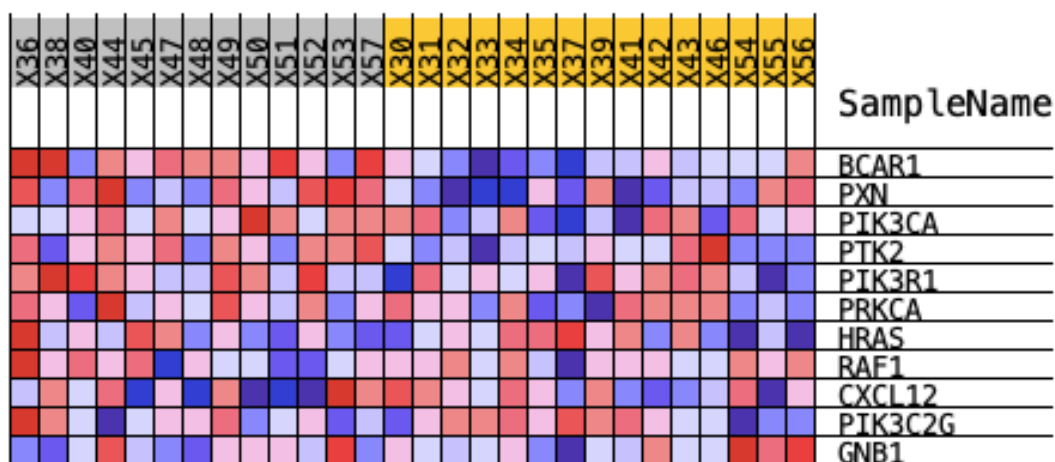


Figura 27: Heat Map de diferencia de expresión en la vía CXCR4. Grupo 2. Azul representa infraexpresión y rojo sobreexpresión. En amarillo los pacientes que no progresaron.

Las otras vías diferencialmente expresadas con una p < 5% fueron:

La vía ERK5 (MAPK7, Mitogen-activated protein kinase 7) p 0,035, NES 1,15, FDR q 0,92 compuesta por los genes:

PIK3CA, PIK3R1, HRAS, RPS6KA1, SHC1.

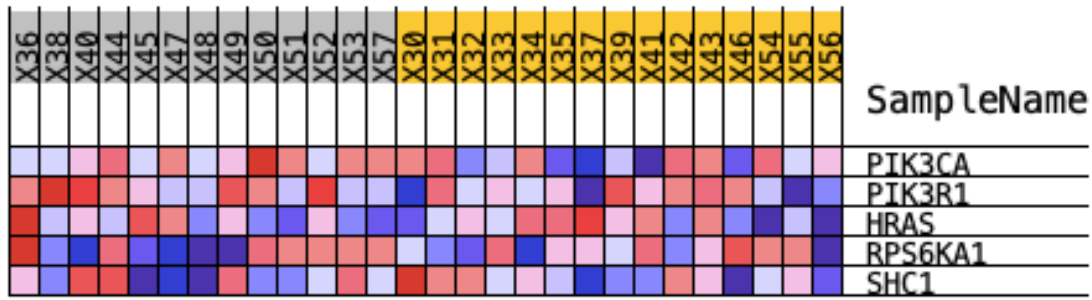


Figura 28: Heat Map de diferencia de expresión en la vía ERK5. Grupo 2. Azul representa infraexpresión y rojo sobreexpresión. En amarillo los pacientes que no progresaron.

La vía AKT p 0,049, NES 1,52, FDR q 0,70 compuesta por los genes: PIK3CA, PIK3R1, GHR (growth hormone receptor), CASP9 (caspase 9), YWHAH.

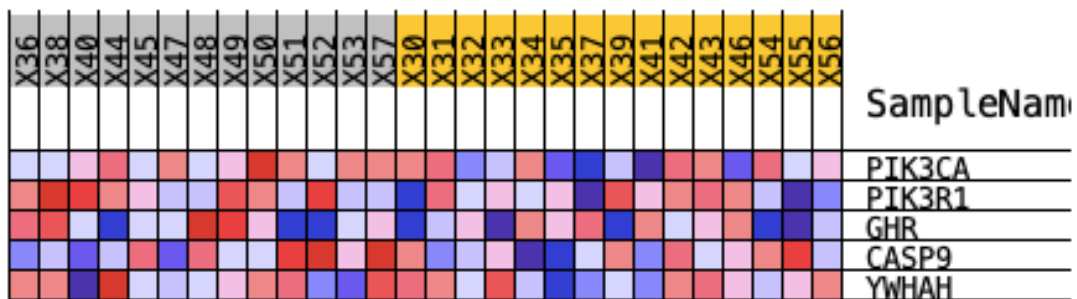


Figura 29: Heat Map de diferencia de expresión en la vía AKT. Grupo 2. Azul representa infraexpresión y rojo sobreexpresión. En amarillo los pacientes que no progresaron.

La vía de citoquinas p 0,034, NES 1,49 y FDR q 0,66 compuesta por los genes: SOCS6 (suppressor of cytokine signaling 6), SOD2, CCL2 (C-C motif chemokine ligand 2).

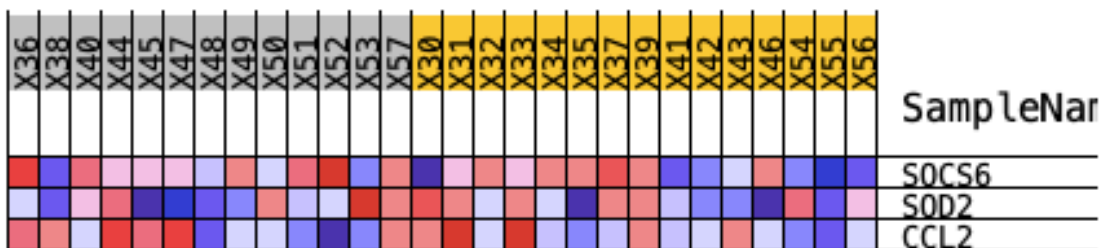


Figura 30: Heat Map de diferencia de expresión en la de las citoquinas. Grupo 2. Azul representa infraexpresión y rojo sobreexpresión. En amarillo los pacientes que no progresaron.

La vía PIK 3-CL1 p 0,035, NES 1,39, FDR 0,63 compuesta por los genes: PIK3CA y PIK3CD (phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase catalytic subunit delta).

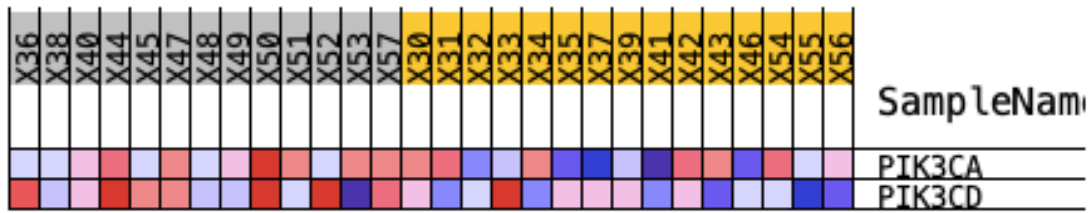


Figura 31: Heat Map de diferencia de expresión en la de PIK 3-CL1. Grupo 2. Azul representa infraexpresión y rojo sobreexpresión. En amarillo los pacientes que no progresaron.

Sin llegar a ser significativo también se observó diferente expresión en progresión de vías relacionadas con mTOR, P53, IL2, NOTCH.

Para no progresión hubo 1 grupo de genes significativo con una $p < 1\%$ y otro con una $p < 5\%$. Estos fueron:

-Vía de los linfocitos ($P 0,000$), FDR 0,31 NES -1,67. Compuesta por los genes: ITGA1 (integrin subunit alpha 1), ITGB1 (integrin subunit beta 1), SELL (selectin L), SELP (selectin P).



Figura 32: Heat Map de diferencia de expresión en la vía de los linfocitos. Grupo 2. Azul representa infraexpresión y rojo sobreexpresión. En amarillo los pacientes que no progresaron.

Vía ERK con una $p 0,048$, NES -1.48 y FDR $q 0,93$. Compuesta por los genes. SRC, NGFB (nerve growth factor b), HRAS; IGF1R (insulin like growth factor 1 receptor), RPS6KA1, MYC, EGFR (epidermal growth factor receptor), RAF, SHC1, PDGFRA (platelet derived growth factor receptor alpha), GNB1, STAT3, NGFR (nerve growth factor receptor), ITGB1, GNAS.

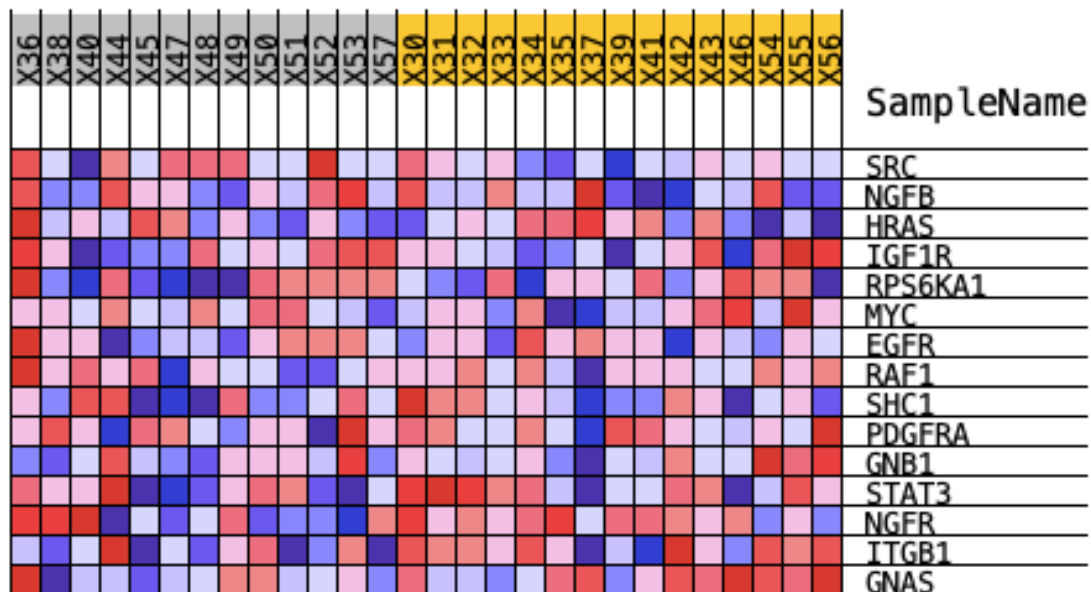


Figura 33: Heat Map de diferencia de expresión en la vía ERK. Grupo 2. Azul representa infraexpresión y rojo sobreexpresión. En amarillo los pacientes que no progresaron

Sin llegar a ser significativo también se observó diferente expresión en no progresión de vías relacionadas con ERK/MAPK, JAK-STAT, IL2, cMYC, IL6.

Para el estudio con las bases HALLMARK no hubo grupos de genes significativos en progresión, pero si observó diferente expresión en vías relacionadas con TNF a, IL6-AKT-JAK-STAT, PI3K-AKT-MTOR y KRAS.

Tampoco hubo grupos de genes significativos en no progresión, pero si observó diferente expresión en vías relacionadas con respuesta a radiación UV, IL2-STAT5 y KRAS.

Resultados de la validación

Dentro del grupo de validación de 51 pacientes 30 de ellos fueron los controles compuestos por 13 mujeres y 17 varones que no progresaron tras un seguimiento medio de 12 años, con muestras recogidas entre los años 1993 y 2009. El grupo que progresó, los casos, eran un total de 21 pacientes, compuesto por 13 mujeres y 8 varones, con una media de seguimiento de 8 años hasta progresión y muestras recogidas entre 1991 y 2018.

No se encontraron diferencias significativas en el riesgo de progresión en la distribución por sexos. Odds Ratio 2,13 mujer vs hombre 0,68-0,63 z 1,29 p 0,19.

Se realizó un estudio mediante NanoString de 97 genes relacionados con MF (anexo

receptor C), TNFRSF25 (TNF receptor superfamily member 25), CXCL13, CIT (citron rho-interacting serine/threonine kinase), CD28, CD19, CD52, IKZF2 (IKAROS family zinc finger 2), Lselectina/SELL, CD79A, CD5, TRBC1 (T cell receptor beta constant 1), CCR7 (C-C motif chemokine receptor 7), PIK3CA, CD3, TNFRSF8 (TNF receptor superfamily member 8), PTEN, CD4, CCDC32 (coiled-coil domain containing 32), MAPK13 (mitogen-activated protein kinase 13), CD26/DPP4 (dipeptidyl peptidase 4), TRGC1/2 (T cell receptor gamma, constant 1/2), MAPK1.

En el **anexo V** se encuentran los datos desglosados del análisis.

Representando gráficamente las diferentes poblaciones celulares en progresión vs no progresión:

Se aprecia un aumento estadísticamente significativo de CD8 en no progresión.

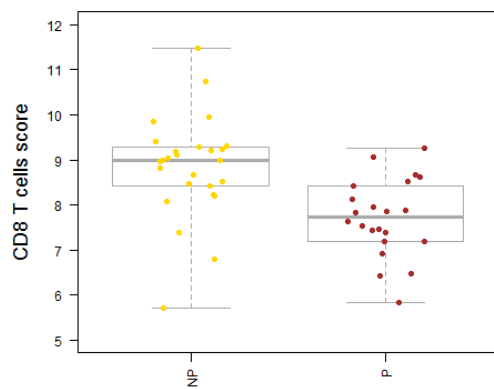


Figura 35: Gráfico representando la diferencia de expresión de CD8 entre progresión y no progresión.

Aunque no es significativo también se encuentran aumentados neutrófilos, células citotóxicas, linfocitos Th1 y T reguladores.

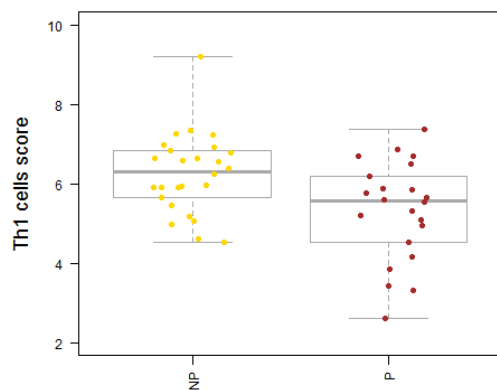


Figura 36: Gráfico representando la diferencia de expresión de Th1 entre progresión y no progresión.

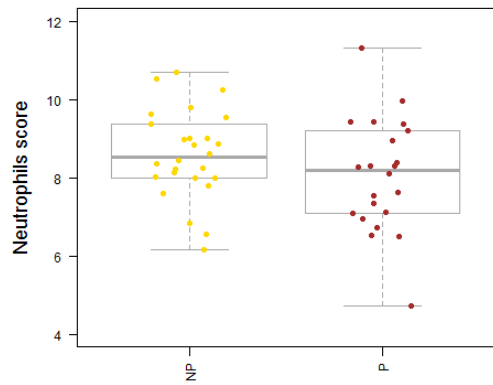


Figura 37: Gráfico representando la diferencia de expresión de neutrófilos entre progresión y no progresión.

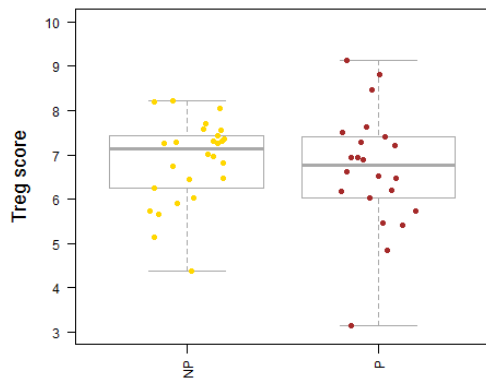


Figura 38: Gráfico representando la diferencia de expresión de células T reguladoras entre progresión y no progresión.

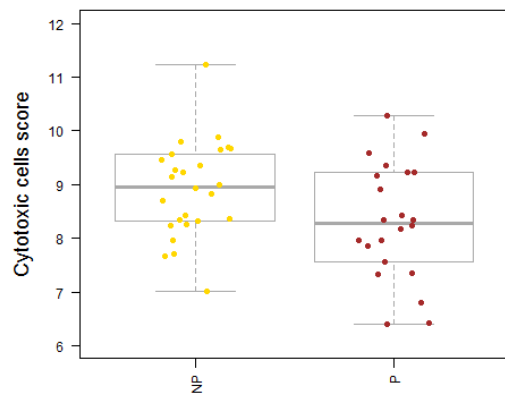


Figura 39: Gráfico representando la diferencia de expresión de células citotóxicas entre progresión y no progresión.

En el grupo de progresión se aprecia un aumento, aunque no estadísticamente significativo de linfocitos B y células T.

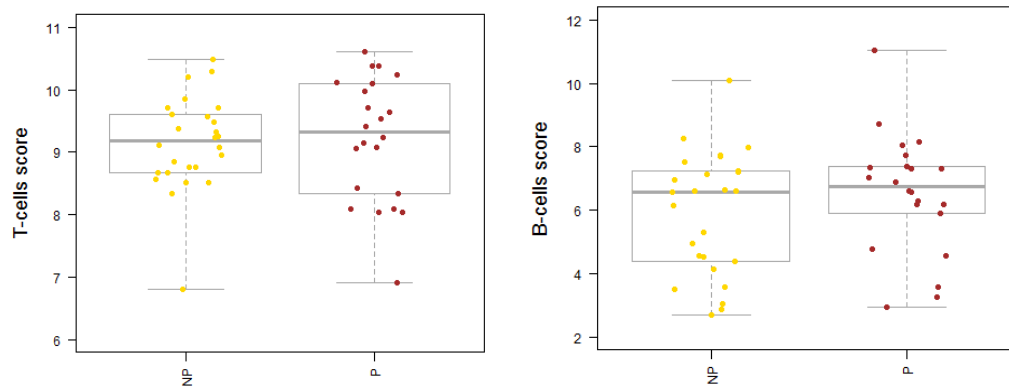


Figura 40: Gráfico representando la diferencia de expresión de células B entre progresión y no progresión.

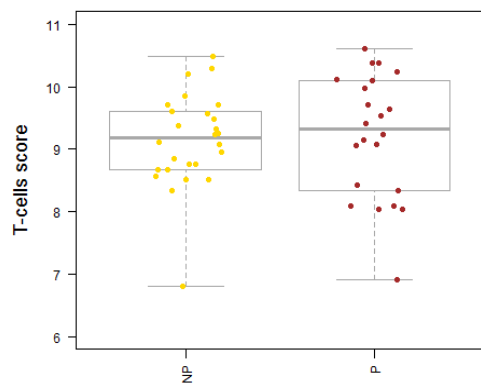


Figura 41: Gráfico representando la diferencia de expresión de células T entre progresión y no progresión.

Podemos resumir los hallazgos en el siguiente gráfico donde vemos la distribución de las diferentes poblaciones celulares en progresión vs no progresión.

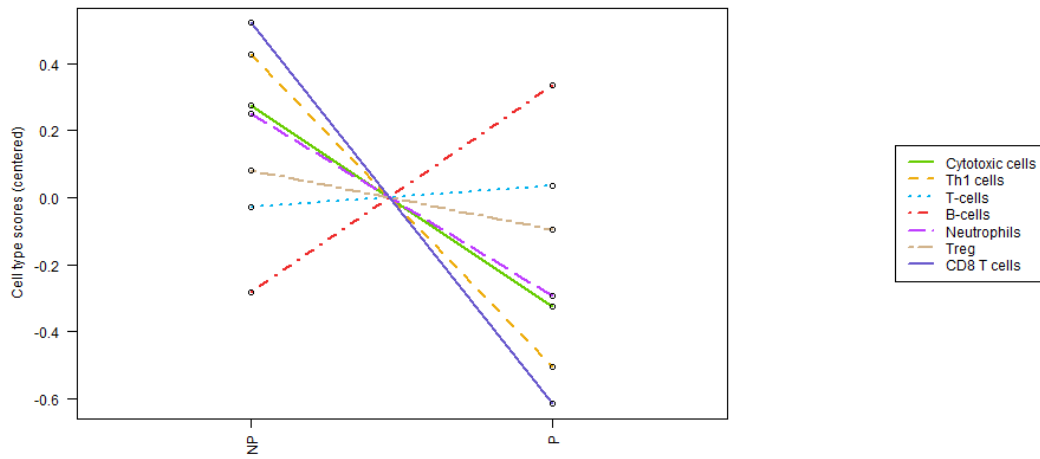


Figura 42: Gráfico representando la diferencia de expresión de los distintos grupos celulares entre progresión y no progresión.

Se realizó un heat map no supervisado de los casos pero no se pudo apreciar ninguna agrupación destacable.

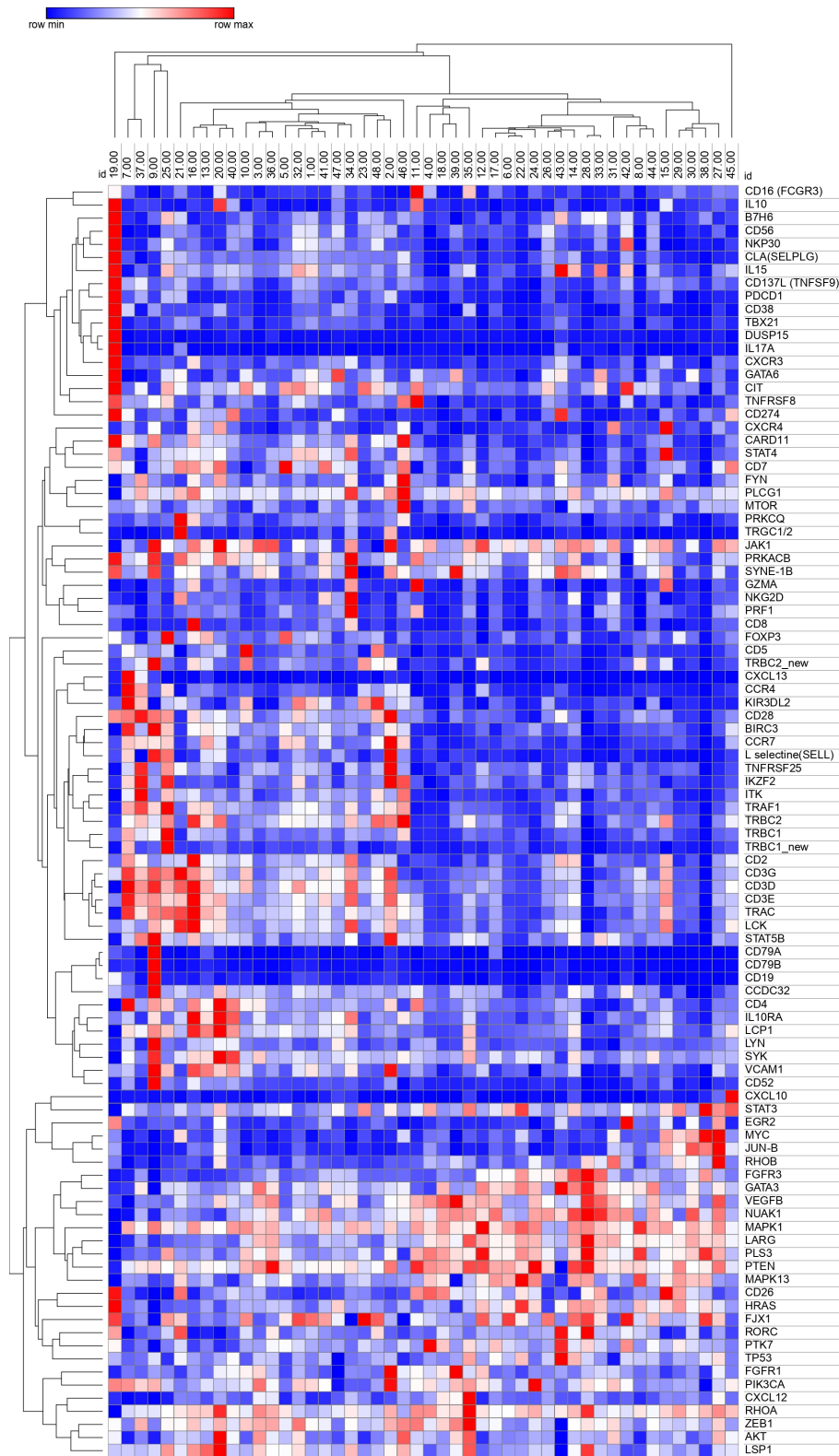


Figura 43: Heat map no supervisado entre las diferentes expresiones de genes en el grupo de validación.

DISCUSIÓN

DISCUSIÓN

Epidemiología

En los datos epidemiológicos de nuestro grupo de estudio existe una discreta predominancia femenina (H:M 1:1,17) lo cual contradice los datos epidemiológicos recogidos hasta la fecha con una incidencia en la literatura de H:M 1,6:1⁽¹⁾ aunque esto puede deberse a algún tipo de sesgo de inclusión o al limitado tamaño muestral.

La edad media al diagnóstico es considerablemente menor que en las publicaciones conocidas (60 años).⁽¹⁾ Esto significa o bien que nuestra población padece la enfermedad de forma precoz o bien, y por esto nos inclinamos los autores, que en centros especializados el retraso diagnóstico es menor al tener un mayor grado de sospecha de una enfermedad en un principio indolente, que puede simular dermatosis inflamatorias. En otras series centradas en el estudio de MF temprana también se ha demostrado una edad de comienzo menor, de 58 años, con respecto a la media de diagnóstico de las MF avanzadas (69 años), estipulando una posible asociación entre detección temprana/edad joven/menor estadio.⁽³²⁾

La edad avanzada se considera un factor de mal pronóstico y aunque en nuestra muestra no ha sido significativo la p de 0,064 está cerca de esos valores.⁽¹⁾

Respecto a la evolución, los estadios iniciales tienen una supervivencia global del alrededor del 86-89%, valores que se asemejan a los obtenidos con una supervivencia de 82,5% en nuestra cohorte.^(7, 32)

Se detectó progresión de la enfermedad durante el seguimiento a 20 años en el 40,35% de los casos. Un dato algo mayor al que se supone que es el riesgo de progresión a 20 años en pacientes en estadios I- IIA, un 35%.⁽⁷⁾ En estudios de MF temprana la progresión a 5 años ha sido de un 15,5-16% sin embargo podemos decir que este tiempo de seguimiento es insuficiente dado que en nuestro estudio la media de tiempo hasta progresión fue de 10,9 años.⁽³²⁾ Otras cohortes han mostrado datos de progresión de un 21.9% teniendo en cuenta en este caso que el fallecimiento por causa de la enfermedad no se consideró como progresión a diferencia de en nuestro estudio,⁽³⁹²⁾ otros estudios que si incluyeron el fallecimiento por MF como progresión arrojan cifras del 57.2%, algo más elevadas que en nuestra cohorte. Una vez más estas diferencias pueden deberse a diferencias entre poblaciones, de acceso al sistema de salud o de estadio al inicio del seguimiento.⁽²⁶⁴⁾

La mortalidad en nuestra cohorte, directamente por el linfoma fue de un 17,5% de

los casos. En otros estudios a largo plazo se han reportado mortalidades algo superiores, como en estudios en Estados Unidos con datos de entre 19,3 - 23% con tiempos de seguimiento medios de unos 5 años.^(264, 392) Estas cifras son superiores en comparación con el 17,5% de mortalidad en 13,5 años de media de seguimiento de nuestra cohorte. Las diferencias encontradas se pueden deber a que en algunas de estas series se incluyeron también pacientes con SS y además el acceso a la sanidad es más limitado en otros países con respecto a España.

En nuestra cohorte los fenómenos más frecuentes fueron la aparición de tumores en un 29,8% de los casos y la aparición de adenopatías patológicas en un 22,8%, en la mayoría de los casos no específicas. Destaca que en otras series estudiadas el fenómeno más frecuentemente encontrado sea la eritrodermia, estas diferencias pueden deberse a diferentes formas de clasificación o variantes poblacionales, sin olvidar que en muchas series se trata la MF y el SS como un conjunto.^(264, 392)

Resultados del estudio GSEA

El análisis mutacional, como ya se ha comentado en la introducción se encuentra la limitación de que la mayoría de estudios previamente publicados han tenido una enorme variabilidad en sus resultados, en parte porque se trata de tumores con mucha heterogeneidad intratumoral pero también porque se han incluido pacientes con diferentes enfermedades bajo el paraguas de linfomas T cutáneos, junto con el hecho de que se incluían pacientes y muestras en diferentes estadios y se trabajaba en muchas ocasiones con muestras de piel completa por lo que al no estar microdisecada y seleccionada la porción tumoral la presencia de células tumorales era baja.^(393, 394) Además existen numerosos subclones y patrones de mutaciones en linfomas cutáneos lo cual dificulta obtener conclusiones.⁽³⁹³⁾

En nuestro caso la principal limitación fue el pequeño tamaño de la muestra al tener que dividirla en dos grupos de 29 y 28 pacientes respectivamente y el estudio de datos sobre microarrays que se desarrollaron en el año 2000, al inicio del perfeccionamiento de la técnica.

Los resultados respecto al estudio GSEA reflejaron un aumento en varias vías.

1. Vías relacionadas con expresión de citocinas y sus receptores

La vía CXCR4 p0,000 Normalized Enrichment Score (NES) 1.91 y FDR de 0,027 Se encuentra sobreexpresada en pacientes que progresan.

CXCR4 es un receptor de superficie de siete dominios transmembrana acoplado a proteínas G que se une al factor de crecimiento 1 derivado de células estromales

(SDF- 1, Stromal cell-derived factor 1) también conocido como CXCL12.⁽³⁷⁾ CXCL12 también puede unirse al receptor de quimiocinas C-X-C de tipo 7 (CXCR7, C-X-C motif chemokine receptor 7) que se encuentra formando heterodímeros con CXCR4.⁽³⁷⁾

CXCR4 actúa como correceptor para los virus de la inmunodeficiencia humana en los linfocitos CD4+.⁽³⁹⁵⁾

La expresión de CXCR4 se regula a nivel de transcripción genética a través del factor inducible por hipoxia tipo 1 (HIF1, hypoxia-inducible factor 1) a través de la vía PI3K/PTEN/AKT/mTOR.⁽³⁹⁶⁾ Además de por otras vías de señalización como Notch, Wnt, NFκB y JAK/STAT.^(397, 398) Por otro lado se sospecha que existe cierta retroalimentación positiva sobre estas vías a través del propio CXCR4.^(37, 397-400)

La activación de CXCR4 mediante su ligando CXCL12 estimula la actividad de la tirosin kinasa Src que activa la vía RAS/MEK/ERK, y como consecuencia se produce la modulación del ciclo celular.⁽³³⁾ En paralelo a estos cambios se produce una migración mediada por PI3K. PI3K regula la transcripción de genes relacionados con migración y adhesión celular a través de AKT y varios componentes de adhesión focal.⁽³⁴⁾ Además, también se puede activar PLC que produce IP3, que favorece la movilización de calcio intracelular, y DAG que favorece la activación de PKC y MAPK.^(35, 36)

Como hemos visto, la unión de CXCL12 a CXCR4 activa diferentes vías, entre las que destaca PI3K/AKT, RAS/MEK/ERK y proteína kinasa C/MAPK.^(44, 401) La activación de PI3K desencadena la activación de Akt que determina una cascada que activa PDK1, quinasa sintetasa de glicógeno 3 (GSK3, glycogen synthase kinase 3), mTOR, p70S6K, factor de la familia transcripción Fox 1 (forkhead box) FOXO (forkhead box, sub-group O) y otras proteínas de señalización.⁽³⁷⁾

La activación de la vía de las MAPK puede llevar a cambios en expresión genética, alteraciones en el citoesqueleto y la en la polimerización de la actina y migración celular.⁽⁴⁴⁾

La expresión de CXCR4 es escasa en la mayoría de tejidos normales pero si se ha encontrado sobreexpresión del mismo en 23 tipos de tumores como pueden ser, próstata, páncreas, ovario, melanoma, riñón y mama.^(39, 402-404) Recientemente un metaanálisis demostró como la sobreexpresión de CXCR4 se relacionaba con peor pronóstico en cánceres hematológicos, de mama, colon, renal, esofágico, ginecológico, pancreático y hepático.⁽⁴⁰⁵⁾ También se ha relacionado junto con su ligando CXCL12 con proliferación tumoral, migración y metástasis.⁽⁴⁵⁾

La señalización a través del eje CXCL12-CXCR4 puede ser capaz de regular la migración celular hacia tejidos con expresión de esos ligandos incluyendo ganglios linfáticos, pulmón, hígado y huesos favoreciendo el desarrollo de metástasis.⁽³⁸⁾

A nivel molecular CXCR4 es un factor mediador importante en la interacción del tumor con la matriz extracelular (laminina, fibronectina y colágeno) y esta relación justifica el papel muy relevante en la diseminación y metástasis tumoral en aproximadamente el 75% de todos los cánceres incluyendo varias formas de leucemia.^(37, 39-43)

Estudios en modelos preclínicos de cáncer han demostrado que metástasis en células tumorales están mediadas por la activación de CXCR4 que hace que las células tumorales migren hacia tejidos expresores de CXCL12.⁽⁴⁴⁾ De hecho se ha demostrado en la leucemia mieloide aguda FLT3 (fms related receptor tyrosine kinase 3) no mutado que la sobreexpresión de CXCR4 se correlaciona con peor pronóstico y supervivencia.⁽⁴⁰⁶⁾

Sin embargo, un estudio demostró como en cáncer de mama la expresión de CXCL12 se asociaba con mayor supervivencia, lo cual se relacionó con un mecanismo de secreción autocrino que como consecuencia saturaba el receptor CXCR4 evitando la quimiotaxis hacia tejidos secretores de CXCL12 que actuaran como dianas metastásicas.⁽⁴⁸⁾

Otros cánceres donde la sobreexpresión de CXCR4 se ha relacionado con peor pronóstico incluyen cáncer renal, de mama y colorectal.⁽⁴⁰⁷⁻⁴¹¹⁾

Además, la activación CXCL12/CXCR4 puede estar implicada en la tumorigénesis a través de la activación del receptor EGFR, del receptor del factor de crecimiento fibroblástico (FGFR, fibroblast growth factor receptor) y IGF1R.^(37, 412)

CXCL12/CXCR4 también actúa suprimiendo la apoptosis de las células tumorales a través de la vía NF κ B, la sobreexpresión de Bcl-2 y mediante la inhibición de factores proapoptóticos como BAD (BCL2 associated agonist of cell death).⁽⁴¹³⁾

Específicamente en MF se ha visto que la expresión de CXCL12 y CXCR4 es mayor en pacientes con MF que en sujetos sanos y mayor en lesiones tipo mancha/placa que en lesiones tumorales, es decir, esta expresión se pierde en fases avanzadas (tumorales).⁽⁴⁶⁾ Si nos centramos solo en CXCL12 su expresión es incluso mas interesante ya que alcanza su pico en estadio placa vs tumores o manchas donde se expresa con menor intensidad.⁽⁴⁶⁾ Como se puede ver en el heatmap del estudio realizado, aunque la vía CXCR4 estaba enriquecida en progresión, la expresión de CXCL12 estaba inhibida (es decir era mayor en pacientes que no progresaban) lo cual probablemente corresponde con esta pérdida de expresión en fases avanzadas. Otra explicación al igual que ocurría en el cáncer de mama es la secreción autocrina.

Estudios celulares con modelos de células de MF y fibroblastos de pacientes de MF versus normales (no MF) demuestran que las células tumorales expresoras de CXCR4 tienden ser quimiotácticamente atraídos hacia fibroblastos de MF secretores de CXCL12.⁽⁴⁷⁾ No sólo eso, la expresión de CXCL12 por parte de los fibroblastos de

MF protegía a las células tumorales de los efectos citotóxicos de la doxorubicina, pudiendo estar relacionado con resistencia a estos tratamientos.⁽⁴⁷⁾

El resultado del **estudio de validación**, aunque con escasa significación estadística (**p ajustada <0,5**) situó la expresión de **CXCL12 y CXCR4 en asociación con no progresión**. Lo cual se corresponde con lo observado en el estudio inicial. Lamentablemente en dicho estudio no está recogida la expresión de CXCR4 ya que no existía información suficiente de este gen como para incluirlo en el análisis GSEA. Este resultado puede deberse a la diferente expresión de CXCR4/CXCL12 en estadios mancha vs placa vs tumor como se ha discutido previamente.

La expresión de CD26 (p ajustada <0,5) se relacionó con peor pronóstico en el estudio de validación. CD26 o DDP4 se expresa de forma ubicua en tejidos y sangre y su función es remover el dominio de los dipéptidos NH2 terminal de proteínas como CXCL2 (C-X-C motif chemokine ligand 2), CXCL6 (C-X-C motif chemokine ligand 6), CXCL9 (C-X-C motif chemokine ligand 9), CXCL10, CXCL11 (C-X-C motif chemokine ligand 11), CXCL12, CCL3L1 (C-C motif chemokine ligand 3 like 1), CCL4 (C-C motif chemokine ligand 4), CCL5 (C-C motif chemokine ligand 5), CCL11 (C-C motif chemokine ligand 11), CCL14 (C-C motif chemokine ligand 14) y CCL22 (C-C motif chemokine ligand 22), incrementando o inactivando la función de las quimiocinas.⁽⁴¹⁴⁾ En el caso de CXCL12 actúa como un inactivador de CXCL12 y estudios demuestran que a pesar de haber niveles elevados en sangre de CXCL12 puede no tratarse de una molécula funcional si ha sido truncada por CD26.⁽⁴¹⁴⁾

Paradójicamente la inhibición de esta vía se ha relacionado con progresión tumoral en cáncer de mama vía activación del eje CXCL12/CXCR4/mTOR.⁽⁴¹⁵⁾

Respecto a CD26 en MF, se ha reportado que su expresión predomina en estadios tempranos y se va perdiendo con la progresión.⁽⁴¹⁶⁾ La asociación de CD26 con el pronóstico aporta datos contradictorios, un estudio de MF con transformación a célula grande determinó que su baja expresión podía relacionarse con peor pronóstico mientras otro estudio de linfoma cutáneo eritrodérmico (MF/SS) determinó que no se podía usar como marcador de progresión.^(10, 417) Nuestros resultados no son concluyentes.

Otra vía sobreexpresada en progresión fue la vía de citoquinas p 0,034, NES 1,49 y FDR q 0,66. En la vía de las citoquinas se encuentran los genes SOCS6, SOD2, CCL2.

CCL2 es uno de los ligandos del receptor CCR4 que ha demostrado tener un papel importante en la generación de metástasis en varios tipos de cáncer.⁽⁴⁹⁾ En MF el receptor CCR4 es un ligando fundamental que activa diversas cascadas (PI3K/AKT, MAPK, NFkB) relacionadas con progresión celular.⁽¹⁹⁶⁾ Se ha demostrado que altas expresiones de CCR4 se relacionan con peor pronóstico y supervivencia en MF.⁽⁵⁰⁾ Esto explica que una de las moléculas para el tratamiento de la micosis fungoide, mogamulizumab, sea un anticuerpo monoclonal humanizado que se une a CCR4.⁽⁵¹⁾

El estudio de validación así mismo demostró que niveles de **expresión de CCR4** (p ajustada <0,5) elevados se relacionan con **peor pronóstico**.

Destacar también en los datos de la validación la presencia de **CCR7 como marcador de progresión** (p ajustada <0,5). CCR7 es un receptor de quimiocinas cuyo ligando es CCL21 (C-C motif chemokine ligand 21), se ha relacionado con MF tumoral, extensión linfática y subcutánea.^(52, 53) Estudios in vitro demuestran que la activación de CCR7 induce migración celular a través de la activación de la vía mTOR tal y como sucede en otros tumores.^(52, 54-56)

2. Vías de ciclo celular, proliferación y supervivencia

La vía AKT p 0,049, NES 1,52, FDR q 0,70 y la vía PIK 3-CL1 p 0,035, NES 1,39, FDR 0,63 también se encontraron sobreexpresadas en pacientes que progresaban.

La vía PI3K/AKT aparece sobreexpresada en pacientes que progresan. Esta vía está implicada en múltiples funciones entre las que destacan supervivencia y proliferación celular, es fundamental en muchos procesos celulares y se encuentra entre una de las más frecuentemente alteradas en la carcinogénesis humana.⁽⁴¹⁸⁾

Uno de los efectores finales de la vía PI3K/AKT es mTOR y se compone como uno de los ejes centrales de acción de esta vía.⁽⁵⁷⁾ mTOR actúa sobre 4E-BP1 y P70S6K. La fosforilación por parte de mTOR de 4E-BP1 libera a la molécula de su unión con el factor de iniciación de la traducción eucariota 4E (EIF4E) lo cual permite la traslación de ARN mensajero favoreciendo la proliferación celular.⁽⁵⁸⁾

La fosforilación de P70S6K activa su función fosforiladora de la proteína S6 de la subunidad 40S del ribosoma, favoreciendo la síntesis de proteína y proliferación celular.^(59, 419) La sobreexpresión de fosfo P70S6K se ha detectado en la mayoría de linfomas B de células grandes, así como en linfoma de Hodgkin y linfoma de Burkitt.^(59, 60) P70S6K puede ser fosforilado directamente por Akt en lugar de mTOR.⁽¹⁹⁾

Esta vía se ha relacionado con el pronóstico de la MF ya que la expresión de pAKT, p4E-BP1 y p-p70S6K se asocia con progresión en estadios avanzados.⁽¹⁷⁾ No sólo eso, la expresión de PTEN, inhibidor de la señal PI3K, se corresponde con mejor pronóstico.⁽¹⁹⁾

mTOR puede así mismo influir sobre las alteraciones en la diferenciación Th1/Th2 de los linfocitos T CD4+.⁽⁴²⁰⁾ El papel que tiene mTOR en la alteración en la diferenciación Th1/Th2 que existe en la MF y cómo se produce un viraje hacia Th2

en la progresión de la enfermedad no está dilucidado.⁽¹⁾ Sin embargo, la sobreexpresión de esta vía y su asociación con progresión hace pensar que puede tener un papel en este viraje hacia la polarización celular.

Otra de las funciones de AKT es fosforilar e inhibir FOXO, que queda atrapado en el citoplasma, por lo que no puede ejercer su función como agente pro apoptótico e inhibidor de la proliferación celular.⁽⁴²¹⁾ Como consecuencia se inactivan los inhibidores del ciclo celular p27 y p21 y se promueven proteínas como cMYC y ciclinaD1 que favorecen la progresión del ciclo celular.⁽⁴²²⁾

La activación de Akt puede llevar a la deslocalización citoplasmática de p21 y p27, al aumento de cMYC y ciclina D y a la supresión de p130 teniendo como efectos directos la progresión en el ciclo celular a nivel G1/S pero también alterando las respuestas en los puntos de control G2/M.⁽⁴²³⁾

La fosforilación de 4E-BP1 o p70S6K ha demostrado la relación de la misma con la supervivencia o recurrencias en varios tipos de cáncer así como con la expresión de Akt.⁽¹⁹⁾ Es por eso que pese a no ser la única molécula capaz de realizar estas fosforilaciones, nuestro estudio implica una activación de la vía AKT/mTOR como factor determinante en progresión.

Existen varias moléculas en desarrollo frente a la vía AKT entre las que se encuentran los análogos de la rapamicina y algunos de ellos como el temsirolimus ya se usan para tratar algunos linfomas.⁽¹⁹⁾ En linfomas cutáneos se ha demostrado en estudios in vitro con células de pacientes con SS y líneas celulares de LCCT la activación constitutiva de mTOR y la eficacia de la rapamicina inhibiendo la proliferación celular.^(61, 62)

En lo relativo al microARN, MIR155, codificado por el gen MIR155HG, se encuentra sobreexpresado en linfomas y se puede utilizar como biomarcador pronóstico en múltiples tipos de cáncer.^(424, 425) MIR155 se ha implicado en la patogenia y progresión de la MF.^(426, 427) Y se ha relacionado positivamente con la actividad de las vías PI3K/AKT, JAK/STAT, NFkB y MAPK.^(426, 428-431) Además el uso de cobomarsen como inhibidor de MIR155 reduce la señalización de las vías PI3K/AKT, JAK/STAT y MAPK14 (mitogen-activated protein kinase 14) en cultivos de células T estimuladas y en células de MF.⁽⁴²⁸⁾

En nuestro estudio, aunque no fue estadísticamente significativo sí que encontramos una tendencia a la activación de Notch en los pacientes que progresaban. Esto puede estar justificado por la activación de Myc y PI3K/AKT a través de Notch.^(19, 432) Además Notch es capaz de inhibir la transcripción de PTEN que actúa como inhibidor de AKT, a la vez que activa PP2A (serine/threonine protein phosphatase 2A) aumentando la fosforilación de AKT, p70S6K y p4E-BP1 para cuya expresión se ha encontrado una correlación positiva con los niveles de

Notch.^(19, 432)

En leucemia linfática crónica se ha demostrado que los niveles altos de AKT se relacionan con la presencia de mutaciones TP53 y Notch1 que en conjunto representa un mayor riesgo de progresión.⁽⁴³³⁾

Respecto a la vía PI3K/AKT/mTOR el estudio de **validación** dio a luz a resultados contradictorios, si bien escasamente significativos. Por un lado, se demostró un **aumento de PIK3CA en progresión** (p ajustada <0,5) lo cual valida la teoría de sobre expresión de PI3K/AKT en progresión, sin embargo, la **expresión de AKT y mTOR se relacionó con no progresión** (p ajustada <0,5). No sólo eso si no que la expresión de **PTEN** (inhibidor de la vía AKT) se relacionó con **progresión** (p ajustada <0,5). Estos resultados contradicen los datos de la literatura y del primer estudio. Sin embargo, puede que la activación de PI3K como parte superior de la vía ejerza funciones diferentes, activando otras vías aún no reconocidas y que esto justifique los resultados. Cabe destacar que en el primer estudio la mayor parte de las diferencias en expresión se encontraron en genes relacionados directamente con PI3K, por lo que consideramos que puede ser una vía de estudio valorar otras posibles funciones de esta vía previas o distintas a la activación de AKT/mTOR.

La vía ERK5 p 0,035, NES 1,15, FDR q 0,92 se encontraba sobreexpresada en pacientes que progresaban mientras que la vía ERK con una p 0,048, NES -1.48 y FDR q 0,93. Se encontraba infraexpresada en los pacientes que progresaban.

ERK también es capaz de fosforilar 4E-BP1 y se ha mostrado correlación entre su expresión en aproximadamente un 50% de las MF y la presencia de p4E-BP1 por lo que podemos establecer una vía común entre ERK y AKT que actúan de forma sinérgica.^(19, 218)

Los resultados de la **validación** mostraron un aumento de la **expresión de MAPK13 y MAPK1 en progresión** (p ajustada <0,5). Estudios han demostrado que el aumento de expresión de la vía RAS/RAF/MEK (MAP kinase-ERK kinase) se puede relacionar con estadios mayores y menores tasas de supervivencia en LCCT.^(20, 21) La validación también demostró un aumento de expresión de HRAS en progresión, pero sin significación estadística.

En el estudio de validación se demostró con escasa significación estadística un **aumento de la expresión de MYC en no progresión** (p ajustada <0,5). La proteína cMyc suele estar sobreexpresada en múltiples cánceres incluyendo linfomas T, sin embargo, esta sobreexpresión proteica suele suceder sin amplificación genética, lo que puede explicar en parte, estos inesperados resultados.⁽⁴³⁴⁾

RhoB fue también asociada con no progresión en la validación (p ajustada <0,5). Se trata de una proteína de unión de GTP que tiene actividad en la reorganización

del citoesqueleto y de traducción de señal.⁽⁴³⁵⁾ Estudios en carcinoma escamoso han demostrado como la expresión de RhoB inhibe la apoptosis inducida por UVB, por lo que favorece el inicio de la tumorigénesis, pero al mismo tiempo limita la agresividad del tumor y su inhibición se asocia a progresión.⁽⁴³⁶⁾

FYN se asoció con no progresión (p ajustada <0,5) en los resultados de la validación. FYN es una tirosin kinasa presente en los linfocitos T que responde a la estimulación del linfocito T mediante el receptor TCR.⁽⁴³⁷⁾ Se han demostrado mutaciones activadoras de FYN en linfomas de células T y su inducción de la vía NFKB, por lo que su relación con progresión no está dilucidada.^(167, 438)

CIT se asoció con progresión (p ajustada <0,5) en los resultados de la validación. Se trata de una serina/teonina kinasa que actúa como efector de RHOA y se relaciona con la regulación de la citoquinesis.⁽⁴³⁹⁾ Su sobreexpresión se ha relacionado con peor pronóstico en cáncer de vejiga, páncreas y mieloma múltiple.⁽⁴³⁹⁻⁴⁴¹⁾

IKZF2 se asoció con progresión (p ajustada <0,5) en los resultados de la validación. IKZF2 actúa controlando el desarrollo y diferenciación del linfocito y su expresión se ha relacionado con peor pronóstico y estadios más avanzados de MF.⁽⁴⁴²⁾ Se postula que esto sucede inhibiendo la apoptosis y favoreciendo el escape inmune del complejo mayor de histocompatibilidad II además de aumentando la producción de IL10 (interleuquina antiinflamatoria).⁽⁴⁴²⁾

Vía INFAR1 p 0,012, NES -1,51, FDR 1. compuesta por los genes: IFNAR1, JAK1, IFNAR2. Se encontraba sobreexpresada en progresión.

El interferón alfa se ha utilizado desde finales de los años 80 como una terapia eficaz para el tratamiento de la MF.^(443, 444)

En la vía JAK-STAT también apreciamos cierta tendencia no significativa a encontrarse sobreactivada en pacientes que progresaban. Cabe recordar que mTOR fosforila el factor de transcripción STAT3 que como hemos visto se encuentra activado en MF.^(152, 156, 445) Además se ha demostrado una correlación entre los niveles de STAT3 y AKT lo cual demuestra la posible relación entre ambas vías a través de mTOR.⁽¹⁹⁾ Se ha relacionado la presencia de mutaciones en JAK1, JAK3, STAT3 y STAT5 con MF avanzada pudiendo constituir un factor pronóstico.⁽²¹⁾ STAT3 puede actuar de forma diferente sobre las células T CD4+ favoreciendo el infiltrado tumoral y en células T CD8+ inhibiendo la acumulación de estas células en el tumor.⁽⁶⁷⁾

En el estudio de **validación** la expresión de **JAK1 estaba aumentada en progresión** al igual que en el estudio inicial, aunque sin significación estadística por lo que no podemos validar este resultado. De la misma manera, la expresión de

STAT3 y STAT4 se asoció con no progresión de forma no significativa y con **progresión la expresión de STAT5B**, también de forma no significativa.

Si que fue significativo, aunque con una p ajustada $<0,5$ la **expresión de TNFRSF25 (DR3) en asociación con progresión**. Estudios con agonistas de TNFRSF25 han demostrado un aumento de células T reguladoras, regulación de la apoptosis y estimulación de la actividad NFKB con su estimulación.^(446, 447) El aumento de células T reguladoras se ha relacionado con progresión e inmunosupresión en MF y SS lo que puede justificar estos resultados.⁽⁴⁴⁸⁾

3. Poblaciones celulares

Vía de los linfocitos (p 0,000), FDR 0,31 NES -1,67. compuesta por los genes: ITGA, ITGB1, SELL, SELP. Se encontraba infraexpresada en progresión.

La integrina VLA-4 (very late antigen-4) se encuentra codificada por los genes ITGA4 e ITGB1, presentes en esta vía, se expresa en los leucocitos y se une al receptor VCAM (vascular cell adhesion molecule) favoreciendo la migración de los leucocitos.⁽⁴⁴⁹⁾ Existen estudios que han demostrado que esta unión VLA-4/VCAM no sólo se relaciona con la migración celular, si no que actúa inhibiendo la apoptosis, y que cuando se utilizan tratamientos anti VLA4 aumenta la apoptosis en las células T.⁽⁴⁵⁰⁾ El hecho de que esta vía esté inhibida en los pacientes que progresaban se ha relacionado en algunos estudios con la pérdida de epidermotropismo ya que otro de los ligandos de VLA-4 es la fibronectina y parece que VLA-4 juega un papel fundamental en la adhesión del linfocito al estroma.^(451, 452)

Otro de los genes de esta vía que está infraexpresado en progresión es SELL. En LCCT se ha demostrado que células del endotelio tumoral presentan mayores cantidades de selectina L (SELL) y se cree que la expresión de SELL puede estar relacionada con el reclutamiento de células CD8 naïve y de memoria en la lesión, pero no así de células CD8 efectoras.⁽⁶³⁾ En MF se ha visto como el número de células CD8 efectoras es similar al de los controles sanos, sin embargo en LCCT avanzado, existe una reducción importante del número de CD8, atribuyéndose esta disminución a células CD8 naïve y de memoria.^(63, 64) La selectina E relacionada con la extravasación de CD8 efectoras se encuentra infraexpresada en MF y se postula que las células CD8 efectoras se quedarían atrapadas en la circulación no pudiendo extravasarse lo cual puede relacionarse con mayor propensión a infecciones y peor pronóstico.⁽⁶³⁾

En el estudio de **validación** se demostró un **aumento de SELL en progresión** (p ajustada $<0,5$) con escasa significación estadística y de **VCAM** sin significación estadística. La función de las selectinas en la progresión o no de la MF está por lo tanto aún por dilucidar sin embargo sería interesante profundizar en su estudio, su

función sobre los diferentes tipos celulares CD8 y su relación con el pronóstico.

4. Reparación ADN

Vía P53 p0,032. NES -1,48, FDR 1. Compuesta por los genes: MDM2, ABCB1, TP53. Se encontraba infraexpresada en progresión.

La mutación de p53 es frecuente en la MF y se ha demostrado su asociación con una disminución en la supervivencia global en MF avanzada.⁽²²⁾ Sin embargo hasta ahora no se había demostrado su relación con progresión en MF temprana.

En el estudio de **validación TP53 se expresaba en progresión**, pero sin significación estadística.

5. Otros

Grupo de genes relacionados con **respuesta a UV P 0,007, NES 1,62, FDR 0,40.**

Compuesto por los genes:

NTRK3, CCNE1, RAB27A, LYN, CEBPG, IL6ST, GAL, PSMC3, RRAD, ATF3, SOD2, BAK1, STIP1, GCH1, BMP2, PRKCD, RFC4, E2F2, IRF1, RASGRP1, BTG3, CDKN1C, ATP6V1F, CHKA, EIF5, POLE3, CDC5, UROD, CDC34, NR4A1, ENO2, JUNB, SLC6A8, DNAJB1, IGFB2, CDK2, PPIF, ABCB1, RXRB, PPT1, SPOP, KIT, MET, EIF5, FURIN.

Se encontraba sobreexpresada en no progresión

En esta vía encontramos un grupo heterogéneo de genes, que no se relacionan con una vía metabólica concreta, sino que abarca múltiples vías relacionadas con la respuesta a radiación ultravioleta. Esta asociación es lógica ya los tratamientos para la MF incluyen la fototerapia y la fotoféresis extracorpórea en los que la radiación UV se utiliza.

En el estudio de validación destaca con una p ajustada < 0,05 la expresión de JUNB prevalente en no progresión.

JUNB forma parte del grupo de genes de respuesta a UV. Su expresión se relaciona con una expresión de interleuquinas Th2 como IL4 y favorece la diferenciación Th2.^(435, 453)

Además tiene una función doble como promotora de la división celular pero también como inhibidora de la misma dependiendo de factores del ambiente celular y de la fase del ciclo celular.⁽⁴⁵⁴⁾ Se postula que la actividad antiproliferativa de JUNB se da cuando se forma un complejo cJUN-JUNB pero no así cuando se expresa de forma aislada.⁽⁴⁵⁴⁾

Al no encontrarse cJUN en el listado de la validación no podemos afirmar si el efecto protector observado viene de la mano de la unión a cJUN y su posible actividad antiproliferativa como complejo o si tiene que ver con el mantenimiento de la diferenciación Th2 que como hemos visto se iba perdiendo conforme progresaba la enfermedad.

ZEB1 y TWIST

La infraexpresión de ZEB1 y la sobreexpresión de Twist en biopsias de MF se ha relacionado con una mayor probabilidad de progresión de la enfermedad durante el seguimiento.⁽²³⁾ En el panel inicial de genes ZEB1 no estaba incluido en la lista para estudio por lo que se decidió incluirlo en la validación al ser un gen de especial interés. Sin embargo, el estudio de **validación asoció de forma no significativa la expresión de ZEB1 con progresión** por lo que no se puede corroborar los resultados obtenidos por otros compañeros en nuestra muestra.

Resultados adicionales del estudio de validación

El estudio de validación también volcó resultados muy interesantes respecto a la expresión de varios genes que no formaban parte de las vías anteriormente comentadas pero que vamos a pasar a exponer por su especial interés y lo revelador de los resultados.

1. Interleuquinas, quimiocinas y sus receptores

Expresión de IL15 en no progresión (p ajustada <0.5).

IL 15 es una citocina similar a IL2 con funciones comunes, ya que ambas activan la expresión JAK3/STAT3 y la estimulan las células T citotóxicas y NK, pero también diferentes ya que IL15 es una interleuquina crítica en la supervivencia de células CD8 a diferencia de IL2.^(69, 70)

Respecto a la función de IL 15 en cáncer es posible que pueda actuar como inhibidor o promotor de tumores dependiendo del microambiente de expresión de citoquinas del tumor ejerciendo efectos citotóxicos (antitumorales) o anti apoptóticos (pro tumorales).⁽⁷¹⁾ En MF se ha demostrado aumento de expresión de IL15 sin asociarse esta expresión a progresión.⁽⁷¹⁾ Sin embargo, puede que su función sobre las células CD8 explique el papel protector observado.

Expresión de CXCL10 en no progresión (p ajustada <0,01) y de **CXCR3**, receptor de CXCL10 (p ajustada <0,5).

La expresión de CXCL10 se asoció de manera muy significativa con no progresión. CXCR3 (C-X-C motif chemokine receptor 3)/CXCL10 se ha asociado con epidermotropismo en MF.^(46, 50, 78)

La activación del eje CXCL10/CXCR3 a través de INFgamma ha demostrado facilitar el reclutamiento y extravasación de células CD8+ a la vez que han mostrado capacidad de predecir buen pronóstico en cáncer renal y melanoma.^(67, 68)

En dos casos de MF resistente a mogamulizumab tratada con una combinación de mogamulizumab y etopósido se demostró como se produjo un cambio en el microambiente tumoral con un aumento de expresión de CXCL10 a la par que se producía la remisión de las lesiones.⁽⁴⁵⁵⁾

Estudios en linfoma cutáneo T han demostrado que la expresión de CXCR3 en células CD4 y CD8 está disminuida respecto a la de controles sanos.⁽⁶³⁾ Esta disminución de expresión se correlaciona con la carga tumoral y con la incapacidad de reclutar células CD8+ en las lesiones de MF.⁽⁶³⁾ Además se ha demostrado como la expresión de CXCR3 está aumentada en MF de bajo grado, en relación con el epidermotropismo pero esta se pierde cuando se estudia en MF progresada o transformada.⁽⁴⁵⁶⁾

Expresión de CXCL13 en asociación con progresión (p ajustada <0,5).

Esta quimiocina cuyo receptor es CXCR5 (C-X-C motif chemokine receptor 5) tiene la función de atraer células B CXCR5 positivas en los linfomas cutáneos.⁽⁷⁸⁾

2. Poblaciones celulares

Expresión de TRBC2 (p ajustada <0,1), **CD4** (p ajustada <0,5), y **CD3G** (p ajustada <0,5) en relación con **progresión**.

TRBC2 (T cell receptor beta constant 2) codifica la cadena beta del receptor de células T, TCR y está presente en células terminalmente diferenciadas.⁽⁴⁵⁷⁾ Se ha encontrado diferencia de expresión en reordenamientos de TCR gamma V1-8 en MF inicial vs avanzada pero no hay descrito diferencias de expresión en la región beta.⁽⁴⁵⁸⁾

Al igual que con la expresión de CD4 y CD3 puede que el aumento de expresión de TRBC2 simplemente traduzca mayor carga tumoral y de ahí su asociación con peor pronóstico.

Expresión de CD28 en progresión (p ajustada <0,5).

Como hemos visto CD28 codifica una proteína de superficie en las células T que se une a CD80 y CD86 en la superficie de células presentadoras de antígenos y su función se puede ver hiperactivada en MF.⁽⁸²⁾ En SS se ha demostrado in vitro que la proliferación de las células tumorales puede activarse mediante la coestimulación CD28.⁽⁸³⁾

Expresión de CD8 en relación con no progresión (p ajustada <0,05).

Estudios recientes de microambiente tumoral en MF han demostrado mediante citometría de flujo que la presencia de una mayor cantidad de CD8+ CD45RO+ en sangre lesional y periférica se correlaciona con un menor mSWAT (modified severity-weighted assessment tool) y una mayor supervivencia debido al efecto antitumoral de las células CD8.^(65, 66) La sangre lesional se obtiene de las biopsias diagnósticas y se supone que contiene células residentes de la lesión, células de los capilares y sangre que rebosa de los vasos capilares hacia el área de la lesión.⁽⁶⁵⁾ Esta relación entre la presencia de CD8 y la gravedad de la micosis fungoide puede deberse al efecto antitumoral de las células CD8. Además, mediante inmunohistoquímica se ha demostrado que una alta proporción de CD8 citotóxicos en las lesiones de micosis fungoide suponen un factor de buen pronóstico independiente del estadio.⁽⁶⁴⁾

Muchos de los resultados obtenidos como la expresión de CXCL10, CXCR3 y SELL se asocian con la presencia de CD8 lo cual corrobora que la presencia de células CD8 en el microambiente tumoral puede ser un pivote central de control tumoral en la MF su determinación desde estadios tempranos podría suponer una herramienta tremendamente útil para determinar el pronóstico.

Expresión de PRF1 (p ajustada <0,5) y **NKG2D** (p ajustada <0,5) **en relación con no progresión.** La importancia de las células citotóxicas como marcadores de no progresión se refleja también en la expresión de PRF1 y NKG2D.

La perforina forma parte de la familia de proteínas del complejo de ataque a la membrana y es esencial para la actividad citotóxica gránulo dependiente de linfocitos T y células NK.⁽⁷²⁾ La presencia de PRF1 se ha asociado con mejor pronóstico en varios cánceres.⁽⁷³⁾

Así mismo NKG2D es un receptor expresado principalmente en células T citotóxicas NK y linfocitos CD8+.⁽⁷⁴⁾ Estudios en cáncer han demostrado el efecto antitumoral de NKG2D.⁽⁷⁵⁾

Expresión de CD79b (p ajustada <0,05) y **CD79a** (p ajustada <0,5), **CD19** (p<ajustada 0,5) **en relación con progresión.**

Tanto CD79 y como CD19 son marcadores de células B.

La presencia en altas o bajas cantidades, de células B utilizando el marcador CD20 con un porcentaje de positividad en la muestra de <10% ó >50% se ha asociado con peor pronóstico en MF, por lo que parece un aumento de células B en el microambiente tumoral tiene relación con peor pronóstico.⁽⁷⁹⁾ Además dos casos publicados en la literatura han demostrado como la infusión con rituximab (anticuerpo anti CD20) tiene efectos positivos sobre la MF llegando a obtener remisiones completas.^(80, 81) La relación entre la presencia de células B, la expresión de CXCL13, que ya hemos visto incrementada en los resultados, y la progresión tumoral está siendo estudiada ya que puede tener efectos opuestos en diferentes

tumores y es posible que esto esté condicionado a la presencia de subpoblaciones concretas y microambientes tumorales específicos en los que según el caso puedan tener un efecto protector y en otros negativo.⁽⁴⁵⁹⁾

También se ha demostrado que en sangre periférica de pacientes con MF avanzada existe una disminución de la población B reguladora encargada de producir IL10.⁽⁴⁶⁰⁾ Aunque nuestro estudio no se focalizó en subpoblaciones de células B, y por lo tanto no podemos decir que tipos están aumentados o disminuidos, es muy probable que subtipos concretos estén en proporciones diferentes y eso justifique las distintas respuestas. En relación a esto el estudio de validación demostró que la **expresión del receptor alfa de IL10 se asociaba con no progresión (p ajustada <0,5)**. IL10 tiene un efecto antitumoral y se secreta por células B reguladoras. El papel de las células B en progresión y la posibilidad de utilizar rituximab parecen vías de trabajo muy interesantes de cara al futuro.

Expresión de CD52 (p ajustada <0,5) en progresión.

CD52 es una molécula que se encuentra en la superficie de linfocitos maduros, cuya función biológica no está definida pero su anticuerpo monoclonal anti CD52, alemtuzumab, es una molécula utilizada en el tratamiento de linfomas cutáneos T al producir la unión del mismo a CD52 una lisis y por lo tanto muerte celular.⁽³¹⁶⁾

Expresión de RORC en progresión (p ajustada <0,5)

RORC es un gen inducible por STAT3 que funciona como regulador de células Th17.^(461, 462)

RORC induce la transcripción de genes IL17 y de IL17 F en células T helper CD4+ naive, y en relación con MF, estudios de cohortes históricas han demostrado como la expresión de IL17 se relaciona con progresión.^(462, 463) Puede que moléculas anti IL17F ya utilizadas en dermatología para el tratamiento de enfermedades inflamatorias tengan cabida en el tratamiento de la MF.

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

Hemos demostrado como existen vías diferentemente expresadas desde el inicio de la enfermedad entre los pacientes de MF que progresan y los que no.

Existe un aumento de la actividad PI3K en progresión, sin poder demostrar en la validación un aumento de la cascada descendente de esta vía. También de la actividad CCL2/CCR4 y de la vía de las MAPK/ERK está aumentada en progresión. La vía CXCR4 es prometedora, pero son necesarios más estudios para llegar a conclusiones sobre su efecto o no en progresión.

La disminución de la actividad de SELL se ha relacionado con progresión aunque este dato no se ha podido validar. SELL facilita reclutamiento de células CD8 naïve y de memoria en la lesión tumoral. La validación ha reforzado la importancia de las células CD8 del microambiente tumoral al mostrar el efecto protector de la cascada CXCL10/CXCR3, de IL15 y de la expresión de CD8.

Respecto al microambiente tumoral la validación también ha demostrado la importancia de las células B como factor de mal pronóstico/progresión con marcadores como CD79b/CD79a/CD19 y ejes de citoquinas como CXCL13/CXCR5 en asociación con progresión. Estas observaciones abren la puerta al uso de rituximab como tratamiento en MF.

El uso de marcadores de células B y CD8 nos permitiría seleccionar a los pacientes de riesgo desde el inicio de la enfermedad mediante el estudio del microambiente tumoral.

ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS

ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS

Índice de figuras

Figura 1: Esquema que muestra la inmunopatogénesis de la MF.	Pág. 50
Figura 2: Alteraciones moleculares presentes recurrentemente en MF.	Pág. 60
Figura 3: representación matemática del t-test.	Pág. 87
Figura 4: Heatmap que muestra la distribución en dos grupos (predominancia de azul vs amarillo/rojo).	Pág. 106
Figura 5: Boxplot de datos que muestra la diferencia de rango de expresión genética entre ambos grupos marcados con X/LOG)	Pág. 107
Figura 6: Curva de supervivencia de Kaplan-Meier para fallecimiento por cualquier causa.	Pág. 111
Figura 7: Curva de supervivencia de Kaplan-Meier para fallecimiento por linfoma.	Pág. 111
Figura 8: Curva de supervivencia de Kaplan-Meier para eritrodermia.	Pág. 112
Figura 9: Curva de supervivencia de Kaplan-Meier para desarrollo de adenopatías.	Pág. 113
Figura 10: Curva de supervivencia de Kaplan-Meier para desarrollo de expresión leucémica en sangre.	Pág. 114
Figura 11: Curva de supervivencia de Kaplan-Meier para desarrollo de tumores.	Pág. 115
Figura 12: Curva de supervivencia de Kaplan-Meier para desarrollo de metástasis.	Pág. 116
Figura 13: Curva de supervivencia de Kaplan-Meier para progresión.	Pág. 117
Figura 14: Gráfico de volcán de diferencia de expresión de genes para fallecimiento por cualquier causa en los grupos 1 y 2.	Pág. 124
Figura 15: Gráfico de volcán de diferencia de expresión de genes para fallecimiento por linfoma. en los grupos 1 y 2.	Pág. 125
Figura 16: Gráfico de volcán de diferencia de expresión de genes para desarrollo de metástasis en los grupos 1 y 2.	Pág. 125
Figura 17: Gráfico de volcán de diferencia de expresión de genes para desarrollo de expresión leucémica en sangre en los grupos 1 y 2.	Pág. 126
Figura 18: Gráfico de volcán de diferencia de expresión de genes para desarrollo de tumores en los grupos 1 y 2.	Pág. 126
Figura 19: Gráfico de volcán de diferencia de expresión de genes para desarrollo de eritrodermia en los grupos 1 y 2.	Pág. 127

Figura 20: Gráfico de volcán de diferencia de expresión de genes para desarrollo de adenopatías en los grupos 1 y 2.	Pág. 127
Figura 21: Gráfico de volcán de diferencia de expresión de genes progresión en los grupos 1 y 2.	Pág. 128
Figura 22: Heat Map de diferencia de expresión de genes en progresión del grupo 1.	Pág. 129
Figura 23: Heat Map de diferencia de expresión de genes en progresión del grupo 2.	Pág. 130
Figura 24: Heat Map de diferencia de expresión en la vía del receptor de interferón alfa 1. Grupo 1.	Pág. 131
Figura 25: Heat Map de diferencia de expresión en la vía de p53. Grupo 1.	Pág. 132
Figura 26: Heat Map de diferencia de expresión en la vía de respuesta a UV. Grupo 1.	Pág. 133
Figura 27: Heat Map de diferencia de expresión en la vía CXCR4. Grupo 2.	Pág. 134
Figura 28: Heat Map de diferencia de expresión en la vía ERK5. Grupo 2.	Pág. 135
Figura 29: Heat Map de diferencia de expresión en la vía AKT. Grupo 2.	Pág. 135
Figura 30: Heat Map de diferencia de expresión en la vía de las citoquinas. Grupo 2.	Pág. 135
Figura 31: Heat Map de diferencia de expresión en la de PIK 3-CL1. Grupo 2.	Pág. 136
Figura 32: Heat Map de diferencia de expresión en la vía de los linfocitos. Grupo 2.	Pág. 136
Figura 33: Heat Map de diferencia de expresión en la vía ERK. Grupo 2.	Pág. 137
Figura 34: Gráfico de volcán representando el fold change y la p valor entre progresión y no progresión.	Pág. 138
Figura 35: Gráfico representando la diferencia de expresión de CD8 entre progresión y no progresión.	Pág. 139
Figura 36: Gráfico representando la diferencia de expresión de Th1 entre progresión y no progresión.	Pág. 139
Figura 37: Gráfico representando la diferencia de expresión de neutrófilos entre progresión y no progresión.	Pág. 140
Figura 38: Gráfico representando la diferencia de expresión de células T reguladoras entre progresión y no progresión.	Pág. 140
Figura 39: Gráfico representando la diferencia de expresión de células citotóxicas entre progresión y no progresión.	Pág. 140
Figura 40: Gráfico representando la diferencia de expresión de células B entre progresión y no progresión.	Pág. 141
Figura 41: Gráfico representando la diferencia de expresión de células T entre progresión y no progresión.	Pág. 141
Figura 42: Gráfico representando la diferencia de expresión de los distintos grupos celulares entre progresión y no progresión.	Pág. 142
Figura 43: Heat map no supervisado entre las diferentes expresiones de genes en el grupo de validación.	Pág. 143

Índice de tablas

Tabla 1: Vías moleculares mutadas en MF y SS y su relación con la terapéutica.	Pág. 61
Tabla 2: Algoritmo diagnóstico de MF en estadios iniciales.	Pág. 65
Tabla 3: Sistema de estadiaje TNM.	Pág. 69
Tabla 4: Cuadro explicativo de estadiaje y su asociación con la supervivencia.	Pág. 70
Tabla 5: Resumen de variables recogidas.	Pág. 96
Tabla 6: Análisis de supervivencia para los distintos eventos a 10,15 y 20 años.	Pág. 118
Tabla 7: Análisis de HR de fallecimiento por cualquier causa para la n total.	Pág. 119
Tabla 8: Análisis de HR de fallecimiento por cualquier causa para el grupo 1.	Pág. 119
Tabla 9: Análisis de HR de fallecimiento por cualquier causa para el grupo 2.	Pág. 119
Tabla 10: Análisis de HR de fallecimiento por linfoma para la n total.	Pág. 119
Tabla 11: Análisis de HR de fallecimiento por linfoma para el grupo 1.	Pág. 120
Tabla 12: Análisis de HR de fallecimiento por linfoma para el grupo 2.	Pág. 120
Tabla 13: Análisis de HR de desarrollo de eritrodermia para la n total.	Pág. 120
Tabla 14: Análisis de HR de desarrollo de eritrodermia para el grupo 1.	Pág. 120
Tabla 15: Análisis de HR de desarrollo de eritrodermia para el grupo 2.	Pág. 120
Tabla 16: Análisis de HR de desarrollo de adenopatías para la n total.	Pág. 121
Tabla 17: Análisis de HR de desarrollo de adenopatías para el grupo 1.	Pág. 121
Tabla 18: Análisis de HR de desarrollo de adenopatías para el grupo 2.	Pág. 121
Tabla 19: Análisis de HR de desarrollo de expresión leucémica en sangre para la n total.	Pág. 121
Tabla 20: Análisis de HR de desarrollo de expresión leucémica en sangre el grupo 1.	Pág. 121
Tabla 21: Análisis de HR de desarrollo de expresión leucémica en sangre el grupo 2.	Pág. 122
Tabla 22: Análisis de HR de desarrollo de tumores para la n total.	Pág. 122
Tabla 23: Análisis de HR de desarrollo de tumores para el grupo 1.	Pág. 122
Tabla 24: Análisis de HR de desarrollo de tumores para el grupo 2.	Pág. 122
Tabla 25: Análisis de HR de desarrollo de metástasis para la n total.	Pág. 122
Tabla 26: Análisis de HR de desarrollo de tumores para la el grupo 1.	Pág. 123
Tabla 27: Análisis de HR de desarrollo de tumores para la el grupo 2.	Pág. 123
Tabla 28: Análisis de HR de progresión para la n total.	Pág. 123

Tabla 29: Análisis de HR de progresión para el grupo 1.

Pág. 123

Tabla 30: Análisis de HR de progresión para el grupo 2.

Pág. 123

Pág. 123

BIBLIOGRAFÍA

BIBLIOGRAFÍA

1. Larocca C, Kupper T. Mycosis Fungoides and Sézary Syndrome: An Update. *Hematol Oncol Clin North Am.* 2019;33(1):103-20.
2. Cerroni L, Sander CA, Smoller BR, Willemze R, Siebert R. WHO Classification of Hematological Malignancy. 4 ed. Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, Jaffe ES, Pileri SA, Stein H, et al., editors. Lyon, France 2017.
3. Pimpinelli N, Olsen EA, Santucci M, Vonderheid E, Haeffner AC, Stevens S, et al. Defining early mycosis fungoides. *J Am Acad Dermatol.* 2005;53(6):1053-63.
4. Scarisbrick JJ, Quaglino P, Prince HM, Papadavid E, Hodak E, Bagot M, et al. The PROCLIFI international registry of early-stage mycosis fungoides identifies substantial diagnostic delay in most patients. *Br J Dermatol.* 2019;181(2):350-7.
5. Jawed SI, Myskowski PL, Horwitz S, Moskowitz A, Querfeld C. Primary cutaneous T-cell lymphoma (mycosis fungoides and Sézary syndrome): part I. Diagnosis: clinical and histopathologic features and new molecular and biologic markers. *J Am Acad Dermatol.* 2014;70(2):205.e1-16; quiz 21-2.
6. Muñoz-González H, Molina-Ruiz AM, Requena L. Clinicopathologic Variants of Mycosis Fungoides. *Actas Dermosifiliogr.* 2017;108(3):192-208.
7. Agar NS, Wedgeworth E, Crichton S, Mitchell TJ, Cox M, Ferreira S, et al. Survival outcomes and prognostic factors in mycosis fungoides/Sézary syndrome: validation of the revised International Society for Cutaneous Lymphomas/European Organisation for Research and Treatment of Cancer staging proposal. *J Clin Oncol.* 2010;28(31):4730-9.
8. Scarisbrick JJ, Prince HM, Vermeer MH, Quaglino P, Horwitz S, Porcu P, et al. Cutaneous Lymphoma International Consortium Study of Outcome in Advanced Stages of Mycosis Fungoides and Sézary Syndrome: Effect of Specific Prognostic Markers on Survival and Development of a Prognostic Model. *J Clin Oncol.* 2015;33(32):3766-73.
9. Shipp MA, Harrington DP, Anderson JR, et al. A predictive model for aggressive non-Hodgkin's lymphoma. *N Engl J Med.* 1993;329(14):987-94.
10. Vural S, Akay BN, Botsalı A, Atilla E, Parlak N, Okçu Heper A, et al. Transformation of Mycosis Fungoides/Sézary Syndrome: Clinical Characteristics and Prognosis. *Turk J Haematol.* 2018;35(1):35-41.

11. Vergier B, de Muret A, Beylot-Barry M, Vaillant L, Ekouevi D, Chene G, et al. Transformation of mycosis fungoides: clinicopathological and prognostic features of 45 cases. French Study Group of Cutaneous Lymphomas. *Blood*. 2000;95(7):2212-8.
12. Danish HH, Liu S, Jhaveri J, Flowers CR, Lechowicz MJ, Esiashvili N, et al. Validation of cutaneous lymphoma international prognostic index (CLIPi) for mycosis fungoides and Sézary syndrome. *Leuk Lymphoma*. 2016;57(12):2813-9.
13. Kempf W, Zimmermann AK, Mitteldorf C. Cutaneous lymphomas-An update 2019. *Hematol Oncol*. 2019;37 Suppl 1:43-7.
14. Lovgren ML, Scarisbrick JJ. Update on skin directed therapies in mycosis fungoides. *Chin Clin Oncol*. 2019;8(1):7.
15. Alpdogan O, Kartan S, Johnson W, Sokol K, Porcu P. Systemic therapy of cutaneous T-cell lymphoma (CTCL). *Chin Clin Oncol*. 2019;8(1):10.
16. Quaglino P, Maule M, Prince HM, Porcu P, Horwitz S, Duvic M, et al. Global patterns of care in advanced stage mycosis fungoides/Sezary syndrome: a multicenter retrospective follow-up study from the Cutaneous Lymphoma International Consortium. *Ann Oncol*. 2017;28(10):2517-25.
17. Rendón-Serna N, Correa-Londoño LA, Velásquez-Lopera MM, Bermudez-Muñoz M. Cell signaling in cutaneous T-cell lymphoma microenvironment: promising targets for molecular-specific treatment. *Int J Dermatol*. 2021.
18. Papadavid E, Korkolopoulou P, Levidou G, Saetta AA, Papadaki T, Siakantaris M, et al. In situ assessment of PI3K and PTEN alterations in mycosis fungoides: correlation with clinicopathological features. *Exp Dermatol*. 2014;23(12):931-3.
19. Levidou G, Siakantaris M, Papadaki T, Papadavid E, Vassilakopoulos TP, Angelopoulou MK, et al. A comprehensive immunohistochemical approach of AKT/mTOR pathway and p-STAT3 in mycosis fungoides. *J Am Acad Dermatol*. 2013;69(3):375-84.
20. Kiessling MK, Oberholzer PA, Mondal C, Karpova MB, Zipser MC, Lin WM, et al. High-throughput mutation profiling of CTCL samples reveals KRAS and NRAS mutations sensitizing tumors toward inhibition of the RAS/RAF/MEK signaling cascade. *Blood*. 2011;117(8):2433-40.
21. Wobser M, Roth S, Appenzeller S, Houben R, Schrama D, Goebeler M, et al. Targeted Deep Sequencing of Mycosis Fungoides Reveals Intracellular Signaling Pathways Associated with Aggressiveness and Large Cell Transformation. *Cancers (Basel)*. 2021;13(21).
22. Wooler G, Melchior L, Ralfkiaer E, Rahbek Gjerdrum LM, Gniadecki R. TP53 Gene Status Affects Survival in Advanced Mycosis Fungoides. *Front Med (Lausanne)*. 2016;3:51.
23. Häyrynen MJ, Uotila PM, Sahi H, Haapasaari KM, Teppo HR, Soini Y, et al. Twist and Zeb1 expression identify mycosis fungoides patients with low risk of disease progression. *J Eur Acad Dermatol Venereol*. 2020;34(2):e95-e8.
24. Bilitewski U. DNA microarrays: an introduction to the technology. *Methods Mol Biol*. 2009;509:1-14.
25. Page GP, Zakharkin SO, Kim K, Mehta T, Chen L, Zhang K. Microarray analysis. *Methods Mol Biol*. 2007;404:409-30.
26. Eastel JM, Lam KW, Lee NL, Lok WY, Tsang AHF, Pei XM, et al. Application of NanoString technologies in companion diagnostic development. *Expert Rev Mol Diagn*. 2019;19(7):591-8.

27. Tsang HF, Xue VW, Koh SP, Chiu YM, Ng LP, Wong SC. NanoString, a novel digital color-coded barcode technology: current and future applications in molecular diagnostics. *Expert Rev Mol Diagn.* 2017;17(1):95-103.
28. Veldman-Jones MH, Brant R, Rooney C, Geh C, Emery H, Harbron CG, et al. Evaluating Robustness and Sensitivity of the NanoString Technologies nCounter Platform to Enable Multiplexed Gene Expression Analysis of Clinical Samples. *Cancer Res.* 2015;75(13):2587-93.
29. Geiss GK, Bumgarner RE, Birditt B, Dahl T, Dowidar N, Dunaway DL, et al. Direct multiplexed measurement of gene expression with color-coded probe pairs. *Nat Biotechnol.* 2008;26(3):317-25.
30. Chen X, Deane NG, Lewis KB, Li J, Zhu J, Washington MK, et al. Comparison of Nanostring nCounter® Data on FFPE Colon Cancer Samples and Affymetrix Microarray Data on Matched Frozen Tissues. *PLoS One.* 2016;11(5):e0153784.
31. Imam MH, Shenoy PJ, Flowers CR, Phillips A, Lechowicz MJ. Incidence and survival patterns of cutaneous T-cell lymphomas in the United States. *Leuk Lymphoma.* 2013;54(4):752-9.
32. Maguire A, Puelles J, Raboisson P, Chavda R, Gabriel S, Thornton S. Early-stage Mycosis Fungoides: Epidemiology and Prognosis. *Acta Derm Venereol.* 2020;100(1):adv00013.
33. Chang F, Steelman LS, Shelton JG, Lee JT, Navolanic PM, Blalock WL, et al. Regulation of cell cycle progression and apoptosis by the Ras/Raf/MEK/ERK pathway (Review). *Int J Oncol.* 2003;22(3):469-80.
34. Teicher BA, Fricker SP. CXCL12 (SDF-1)/CXCR4 pathway in cancer. *Clin Cancer Res.* 2010;16(11):2927-31.
35. Sun Y, Cheng Z, Ma L, Pei G. Beta-arrestin2 is critically involved in CXCR4-mediated chemotaxis, and this is mediated by its enhancement of p38 MAPK activation. *J Biol Chem.* 2002;277(51):49212-9.
36. Pozzobon T, Goldoni G, Viola A, Molon B. CXCR4 signaling in health and disease. *Immunol Lett.* 2016;177:6-15.
37. Cojoc M, Peitzsch C, Trautmann F, Polishchuk L, Telegeev GD, Dubrovskaya A. Emerging targets in cancer management: role of the CXCL12/CXCR4 axis. *Oncotargets Ther.* 2013;6:1347-61.
38. Balkwill F. Cancer and the chemokine network. *Nat Rev Cancer.* 2004;4(7):540-50.
39. Balkwill F. The significance of cancer cell expression of the chemokine receptor CXCR4. *Semin Cancer Biol.* 2004;14(3):171-9.
40. Monaco G, Belmont JW, Konopleva M, Andreeff M, Tavor S, Petit I, et al. Correlation between CXCR4 and homing or engraftment of acute myelogenous leukemia. *Cancer Res.* 2004;64(18):6832 author reply -3.
41. Burger JA, Burger M, Kipps TJ. Chronic lymphocytic leukemia B cells express functional CXCR4 chemokine receptors that mediate spontaneous migration beneath bone marrow stromal cells. *Blood.* 1999;94(11):3658-67.
42. Sun YX, Fang M, Wang J, Cooper CR, Pienta KJ, Taichman RS. Expression and activation of alpha v beta 3 integrins by SDF-1/CXC12 increases the aggressiveness of prostate cancer cells. *Prostate.* 2007;67(1):61-73.
43. Goel HL, Li J, Kogan S, Languino LR. Integrins in prostate cancer progression. *Endocr Relat Cancer.* 2008;15(3):657-64.

44. Domanska UM, Kruizinga RC, Nagengast WB, Timmer-Bosscha H, Huls G, de Vries EG, et al. A review on CXCR4/CXCL12 axis in oncology: no place to hide. *Eur J Cancer*. 2013;49(1):219-30.
45. Spender LC, Inman GJ. Fatal attractions? Correlations of CXCL12-CXCR4-CXCR7 expression with disease progression in melanoma and Kaposi sarcoma. *Br J Dermatol*. 2016;175(6):1140-1.
46. Daggett RN, Kurata M, Abe S, Onishi I, Miura K, Sawada Y, et al. Expression dynamics of CXCL12 and CXCR4 during the progression of mycosis fungoides. *Br J Dermatol*. 2014;171(4):722-31.
47. Aronovich A, Moyal L, Gorovitz B, Amitay-Laish I, Naveh HP, Forer Y, et al. Cancer-Associated Fibroblasts in Mycosis Fungoides Promote Tumor Cell Migration and Drug Resistance through CXCL12/CXCR4. *J Invest Dermatol*. 2021;141(3):619-27.e2.
48. Mirisola V, Zuccarino A, Bachmeier BE, Sormani MP, Falter J, Nerlich A, et al. CXCL12/SDF1 expression by breast cancers is an independent prognostic marker of disease-free and overall survival. *Eur J Cancer*. 2009;45(14):2579-87.
49. Zhong Y, Lin Z, Lu J, Lin X, Xu W, Wang N, et al. CCL2-CCL5/CCR4 contributed to radiation-induced epithelial-mesenchymal transition of HPAEpiC cells via the ERK signaling pathways. *Am J Transl Res*. 2019;11(2):733-43.
50. Shono Y, Suga H, Kamijo H, Fujii H, Oka T, Miyagaki T, et al. Expression of CCR3 and CCR4 Suggests a Poor Prognosis in Mycosis Fungoides and Sézary Syndrome. *Acta Derm Venereol*. 2019;99(9):809-12.
51. Miao M, De Clercq E, Li G. Clinical significance of chemokine receptor antagonists. *Expert Opin Drug Metab Toxicol*. 2020;16(1):11-30.
52. Hu SC, Lin CL, Hong CH, Yu HS, Chen GS, Lee CH. CCR7 expression correlates with subcutaneous involvement in mycosis fungoides skin lesions and promotes migration of mycosis fungoides cells (MyLa) through mTOR activation. *J Dermatol Sci*. 2014;74(1):31-8.
53. Kallinich T, Muche JM, Qin S, Sterry W, Audring H, Kroczeck RA. Chemokine receptor expression on neoplastic and reactive T cells in the skin at different stages of mycosis fungoides. *J Invest Dermatol*. 2003;121(5):1045-52.
54. Sabatini DM. mTOR and cancer: insights into a complex relationship. *Nat Rev Cancer*. 2006;6(9):729-34.
55. Liu FY, Zhao ZJ, Li P, Ding X, Zong ZH, Sun CF. Mammalian target of rapamycin (mTOR) is involved in the survival of cells mediated by chemokine receptor 7 through PI3K/Akt in metastatic squamous cell carcinoma of the head and neck. *Br J Oral Maxillofac Surg*. 2010;48(4):291-6.
56. Hong CH, Lin SH, Lee CH. CCL21 Induces mTOR-dependent MALAT1 Expression, Leading to Cell Migration in Cutaneous T-Cell Lymphoma. *In Vivo*. 2019;33(3):793-800.
57. Albert V, Hall MN. mTOR signaling in cellular and organismal energetics. *Curr Opin Cell Biol*. 2015;33:55-66.
58. Qin X, Jiang B, Zhang Y. 4E-BP1, a multifactor regulated multifunctional protein. *Cell Cycle*. 2016;15(6):781-6.
59. Zhao XF, Gartenhaus RB. Phospho-p70S6K and cdc2/cdk1 as therapeutic targets for diffuse large B-cell lymphoma. *Expert Opin Ther Targets*. 2009;13(9):1085-93.

60. Egervári G, Márk A, Hajdu M, Barna G, Sápi Z, Krenács T, et al. Mitotic lymphoma cells are characterized by high expression of phosphorylated ribosomal S6 protein. *Histochem Cell Biol.* 2011;135(4):409-17.
61. Kremer M, Sliva K, Klemke CD, Schnierle BS. Cutaneous T-cell lymphoma cells are sensitive to rapamycin. *Exp Dermatol.* 2010;19(9):800-5.
62. Marzec M, Liu X, Kasprzycka M, Witkiewicz A, Raghunath PN, El-Salem M, et al. IL-2- and IL-15-induced activation of the rapamycin-sensitive mTORC1 pathway in malignant CD4+ T lymphocytes. *Blood.* 2008;111(4):2181-9.
63. Winter D, Moser J, Kriehuber E, Wiesner C, Knobler R, Trautinger F, et al. Down-modulation of CXCR3 surface expression and function in CD8+ T cells from cutaneous T cell lymphoma patients. *J Immunol.* 2007;179(6):4272-82.
64. Vermeer MH, van Doorn R, Dukers D, Bekkenk MW, Meijer CJ, Willemze R. CD8+ T cells in cutaneous T-cell lymphoma: expression of cytotoxic proteins, Fas Ligand, and killing inhibitory receptors and their relationship with clinical behavior. *J Clin Oncol.* 2001;19(23):4322-9.
65. Torii K, Okada Y, Morita A. Determining the immune environment of cutaneous T-cell lymphoma lesions through the assessment of lesional blood drops. *Sci Rep.* 2021;11(1):19629.
66. Abeni D, Frontani M, Sampogna F, Sera F, Bolli S, Corona R, et al. Circulating CD8+ lymphocytes, white blood cells, and survival in patients with mycosis fungoides. *Br J Dermatol.* 2005;153(2):324-30.
67. Yue C, Shen S, Deng J, Priceman SJ, Li W, Huang A, et al. STAT3 in CD8+ T Cells Inhibits Their Tumor Accumulation by Downregulating CXCR3/CXCL10 Axis. *Cancer Immunol Res.* 2015;3(8):864-70.
68. Groom JR, Luster AD. CXCR3 in T cell function. *Exp Cell Res.* 2011;317(5):620-31.
69. Waldmann TA. The shared and contrasting roles of IL2 and IL15 in the life and death of normal and neoplastic lymphocytes: implications for cancer therapy. *Cancer Immunol Res.* 2015;3(3):219-27.
70. Berard M, Brandt K, Bulfone-Paus S, Tough DF. IL-15 promotes the survival of naive and memory phenotype CD8+ T cells. *J Immunol.* 2003;170(10):5018-26.
71. Willerslev-Olsen A, Litvinov IV, Fredholm SM, Petersen DL, Sibbesen NA, Gniadecki R, et al. IL-15 and IL-17F are differentially regulated and expressed in mycosis fungoides (MF). *Cell Cycle.* 2014;13(8):1306-12.
72. Bolitho P, Voskoboinik I, Trapani JA, Smyth MJ. Apoptosis induced by the lymphocyte effector molecule perforin. *Curr Opin Immunol.* 2007;19(3):339-47.
73. Roufas C, Chasiotis D, Makris A, Efstathiades C, Dimopoulos C, Zaravinos A. The Expression and Prognostic Impact of Immune Cytolytic Activity-Related Markers in Human Malignancies: A Comprehensive Meta-analysis. *Front Oncol.* 2018;8:27.
74. Burgess SJ, Maasho K, Masilamani M, Narayanan S, Borrego F, Coligan JE. The NKG2D receptor: immunobiology and clinical implications. *Immunol Res.* 2008;40(1):18-34.
75. Dhar P, Wu JD. NKG2D and its ligands in cancer. *Curr Opin Immunol.* 2018;51:55-61.
76. Kapur S, Menke MA, Tiemann M, Schubert C, Parwaresch R. Early mycosis fungoides: molecular analysis for its diagnosis and the absence of p53 gene mutations in cases with progression. *J Dermatol Sci.* 2001;26(1):36-45.

77. Li G, Chooback L, Wolfe JT, Rook AH, Felix CA, Lessin SR, et al. Overexpression of p53 protein in cutaneous T cell lymphoma: relationship to large cell transformation and disease progression. *J Invest Dermatol.* 1998;110(5):767-70.
78. Sugaya M. Chemokines and cutaneous lymphoma. *J Dermatol Sci.* 2010;59(2):81-5.
79. Jullié ML, Carlotti M, Vivot A, Jr., Beylot-Barry M, Ortonne N, Frouin E, et al. CD20 antigen may be expressed by reactive or lymphomatous cells of transformed mycosis fungoides: diagnostic and prognostic impact. *Am J Surg Pathol.* 2013;37(12):1845-54.
80. Nikolaou V, Iliakis T, Marinos L, Voudouri D, Sidiropoulou P, Rigopoulos D, et al. Another window into tumor microenvironment: a case of B-cell rich folliculotropic mycosis fungoides responding to rituximab. *Australas J Dermatol.* 2020;61(2):e226-e8.
81. Theurich S, Schlaak M, Steguweit H, Heukamp LC, Wennhold K, Kurschat P, et al. Targeting Tumor-Infiltrating B Cells in Cutaneous T-Cell Lymphoma. *J Clin Oncol.* 2016;34(12):e110-6.
82. Berg S, Villasenor-Park J, Haun P, Kim EJ. Multidisciplinary Management of Mycosis Fungoides/Sézary Syndrome. *Curr Hematol Malig Rep.* 2017;12(3):234-43.
83. McCusker ME, Garifallou M, Bogen SA. Sezary lineage cells can be induced to proliferate via CD28-mediated costimulation. *J Immunol.* 1997;158(10):4984-91.
84. Shankland KR, Armitage JO, Hancock BW. Non-Hodgkin lymphoma. *Lancet.* 2012;380(9844):848-57.
85. Jaffe ES, Campo E, Harris NL, Pileri SA, Stein H, Swerdlow SH. Introduction and overview of the classification of lymphoid neoplasms. In: Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, Jaffe ES, Pileri SA, Stein H, et al., editors. *WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues.* 1. 4 ed. Lyon International Agency for Research on Cancer (IARC); 2017. p. 189-98.
86. Morris SL. Skin lymphoma. *Clin Oncol (R Coll Radiol).* 2012;24(5):371-85.
87. Cerroni L, Sander C, Smolier B, Wilemze R. Mycosis fungoides. In: Elder D, Massi D, Scolyer R, Wilemze R, editors. *WHO classification of skin tumours.* 1. 4 ed. Lyon: International Agency for Research on Cancer (IARC); 2018. p. 226-31.
88. Criscione VD, Weinstock MA. Incidence of cutaneous T-cell lymphoma in the United States, 1973-2002. *Arch Dermatol.* 2007;143(7):854-9.
89. Wilemze R, Berti E, Facchetti F, Kempf W, Jaffe E. Tumours of haematopoietic and lymphoid origin: Introduction. In: Elder D, Massi D, Scolyer R, Wilemze R, editors. *WHO classification of skin tumours.* 1. 4 ed. Lyon: International Agency for Research on Cancer (IARC); 2018. p. 223-4.
90. Trautinger F, Eder J, Assaf C, Bagot M, Cozzio A, Dummer R, et al. European Organisation for Research and Treatment of Cancer consensus recommendations for the treatment of mycosis fungoides/Sézary syndrome - Update 2017. *Eur J Cancer.* 2017;77:57-74.
91. Scarisbrick JJ, Hodak E, Bagot M, Stranzenbach R, Stadler R, Ortiz-Romero PL, et al. Blood classification and blood response criteria in mycosis fungoides and Sézary syndrome using flow cytometry: recommendations from the EORTC cutaneous lymphoma task force. *Eur J Cancer.* 2018;93:47-56.

92. Shalabi D, Bistline A, Alpdogan O, Kartan S, Mishra A, Porcu P, et al. Immune evasion and current immunotherapy strategies in mycosis fungoides (MF) and Sézary syndrome (SS). *Chin Clin Oncol*. 2019;8(1):11.
93. Hodak E, Amitay-Laish I. Mycosis fungoides: A great imitator. *Clin Dermatol*. 2019;37(3):255-67.
94. Hristov AC, Tejasvi T, Wilcox RA. Mycosis fungoides and Sézary syndrome: 2019 update on diagnosis, risk-stratification, and management. *Am J Hematol*. 2019;94(9):1027-41.
95. Amorim GM, Quintella DC, Niemeyer-Corbellini JP, Ferreira LC, Ramos ESM, Cuzzi T. Validation of an algorithm based on clinical, histopathological and immunohistochemical data for the diagnosis of early-stage mycosis fungoides. *An Bras Dermatol*. 2020;95(3):326-31.
96. Girardi M, Heald PW, Wilson LD. The pathogenesis of mycosis fungoides. *N Engl J Med*. 2004;350(19):1978-88.
97. Ahn CS, A AL, Sangüeza OP. Mycosis fungoides: an updated review of clinicopathologic variants. *Am J Dermatopathol*. 2014;36(12):933-48; quiz 49-51.
98. Howard MS, Smoller BR. Mycosis fungoides: classic disease and variant presentations. *Semin Cutan Med Surg*. 2000;19(2):91-9.
99. Vaidya T, Badri T. Mycosis Fungoides. StatPearls. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing Copyright © 2020, StatPearls Publishing LLC.; 2020.
100. Burg G. Systemic involvement in mycosis fungoides. *Clin Dermatol*. 2015;33(5):563-71.
101. JLM A. Tableau du pian fongoide. Description des maladies de la peau, observées à l'Hôpital Saint-Louis et exposition des meilleurs méthodes suivies pour leur traitement. . Paris: Barrois L'Ainé & Fils; 1806.
102. Mahalingam M, Reddy VB. Mycosis Fungoides, Then and Now... Have We Travelled? *Adv Anat Pathol*. 2015;22(6):376-83.
103. Cruz Camejo Y, Cáceres Lavernia HH, Flores Vega YI, Rodríguez Abascal AA, Alsina Sarmiento SdlC, Morales López JL. Micosis fungoide en estadio tumoral. Presentacion de un caso. *Revista Habanera de Ciencias Médicas*. 2011;10:476-85.
104. Moreno-Ramírez D, Herrera Saval A, Camacho Martínez F. Diagnóstico y tratamiento de los linfomas cutáneos primarios de células T. *Med Cutan Iber Lat Am*. 2003;31(2):75-100.
105. D'Agostino P, Kent A, Sharp E, Schmidt F, Turini M. Mycosis fungoides-type cutaneous T-cell lymphoma (MF-CTCL) epidemiology and treatment pathway in Spain: new insights for an accurate description. *Drugs Context*. 2020;9.
106. Whittaker SJ, Marsden JR, Spittle M, Russell Jones R. Joint British Association of Dermatologists and U.K. Cutaneous Lymphoma Group guidelines for the management of primary cutaneous T-cell lymphomas. *Br J Dermatol*. 2003;149(6):1095-107.
107. Wright A, Wijeratne A, Hung T, Gao W, Whittaker S, Morris S, et al. Prevalence and severity of pruritus and quality of life in patients with cutaneous T-cell lymphoma. *J Pain Symptom Manage*. 2013;45(1):114-9.
108. Hughes CF, Newland K, McCormack C, Lade S, Prince HM. Mycosis fungoides and Sézary syndrome: Current challenges in assessment, management and prognostic markers. *Australas J Dermatol*. 2016;57(3):182-91.

109. Giovannini S. Über einen Fall universeller Alopecia areata in Verbindung mit Mycosis fungoides. *Archiv für Dermatologie und Syphilis*. 1906;78(1):3-20.
110. Mitteldorf C, Stadler R, Sander CA, Kempf W. Folliculotropic mycosis fungoides. *J Dtsch Dermatol Ges*. 2018;16(5):543-57.
111. Feng H, Beasley J, Meehan S, Liebman TN. Folliculotropic mycosis fungoides. *Dermatol Online J*. 2018;24(12).
112. Hodak E, Amitay-Laish I, Atzmony L, Prag-Naveh H, Yanichkin N, Barzilay A, et al. New insights into folliculotropic mycosis fungoides (FMF): A single-center experience. *J Am Acad Dermatol*. 2016;75(2):347-55.
113. de Masson A, Battistella M, Vignon-Pennamen MD, Cavelier-Balloy B, Mouly F, Rybojad M, et al. Syringotropic mycosis fungoides: clinical and histologic features, response to treatment, and outcome in 19 patients. *J Am Acad Dermatol*. 2014;71(5):926-34.
114. Clarijs M, Poot F, Laka A, Pirard C, Bourlond A. Granulomatous slack skin: treatment with extensive surgery and review of the literature. *Dermatology*. 2003;206(4):393-7.
115. Manoli SM, Lallas A, Ioannides D, Nikolaidou C, Lazaridou E, Sotiriou E, et al. Dermoscopy of pagetoid reticulis, with dermoscopic-pathologic correlation. *Photodermatol Photoimmunol Photomed*. 2019;35(5):372-4.
116. Willemze R. Mycosis fungoides variants-clinicopathologic features, differential diagnosis, and treatment. *Semin Cutan Med Surg*. 2018;37(1):11-7.
117. Privat Y, Faye A, Bellossi A, Allain G, Rousselot M, Ancelle G. [Mycosis fungoides. Erythrodermic form]. *Bull Soc Med Afr Noire Lang Fr*. 1968;13(2):403-4.
118. Rodney IJ, Kindred C, Angra K, Qutub ON, Villanueva AR, Halder RM. Hypopigmented mycosis fungoides: a retrospective clinicopathologic study. *J Eur Acad Dermatol Venereol*. 2017;31(5):808-14.
119. Barberio E, Thomas L, Skowron F, Balme B, Dalle S. Transformed mycosis fungoides: clinicopathological features and outcome. *Br J Dermatol*. 2007;157(2):284-9.
120. Abeldaño A, Arias M, Benedetti A, Ochoa K, Maskin M, Pellerano G, et al. Unusual variants of mycosis fungoides. *Skinmed*. 2011;9(4):218-22.
121. Diehl J, Sarantopoulos GP, Chiu MW. Dyshidrotic mycosis fungoides. *J Cutan Pathol*. 2011;38(7):590-2.
122. Brajon D, Bonnet N, Dales JP, Berbis P. [Papular mycosis fungoides]. *Ann Dermatol Venereol*. 2013;140(6-7):455-8.
123. Riyaz N, Sasidharanpillai S, Abdul Latheef EN, Davul H, Ashraf F. Pigmented purpuric dermatosis or mycosis fungoides: A diagnostic dilemma. *Indian Dermatol Online J*. 2016;7(3):183-5.
124. Jerković Gulin S, Čević R, Ilić I, Bradamante M, Bukvić Mokos Z, Kostović K. Poikilodermatous Mycosis Fungoides - Rare Entity, Different Treatment Modalities. *Acta Dermatovenerol Croat*. 2018;26(1):48-52.
125. Magro CM, Telang GH, Momtahn S. Unilesional Follicular Mycosis Fungoides: Report of 6 Cases and Review of the Literature. *Am J Dermatopathol*. 2018;40(5):329-36.
126. Jang MS, Kang DY, Park JB, Han SH, Lee KH, Kim JH, et al. Clinicopathological Manifestations of Ichthyosiform Mycosis Fungoides. *Acta Derm Venereol*. 2016;96(1):100-1.

127. Erraji H, Hali F, Baline K, Marnissi F, Chiheb S. Recalcitrant acquired palmoplantar keratoderma: Think about Mycosis fungoides. *Presse Med.* 2018;47(7-8 Pt 1):704-8.
128. Bunata K, Jahan-Tigh RR, Curry J, Duvic M. A verrucous presentation of mycosis fungoides. *Dermatol Online J.* 2014;20(8).
129. Pabsch H, Kunze J, Schaller J. Mycosis fungoides presenting as a pustular eruption. *J Am Acad Dermatol.* 2009;61(5):908-9.
130. Kazakov DV, Burg G, Kempf W. Clinicopathological spectrum of mycosis fungoides. *J Eur Acad Dermatol Venereol.* 2004;18(4):397-415.
131. Balić A, Jerković Gulin S, Čeović R, Ilić I, Radoš J. Hyperpigmented Mycosis Fungoides - A Rare Entity. *Acta Dermatovenerol Croat.* 2019;27(2):131-2.
132. Stasko T, Vander Ploeg DE, De Villez RL. Hyperkeratotic mycosis fungoides restricted to the palms. *J Am Acad Dermatol.* 1982;7(6):792-6.
133. Virmani P, Myskowski PL, Pulitzer M. Unusual variants of mycosis fungoides. *Diagn Histopathol (Oxf).* 2016;22(4):142-51.
134. Kamijo H, Sugaya M. Two distinct variants of mycosis fungoides (MF): Folliculotropic MF and erythrodermic MF. *J Dermatol.* 2019;46(12):1136-40.
135. Cetinözman F, Jansen PM, Vermeer MH, Willemze R. Differential expression of programmed death-1 (PD-1) in Sézary syndrome and mycosis fungoides. *Arch Dermatol.* 2012;148(12):1379-85.
136. Lansigan F, Horwitz SM, Pinter-Brown LC, Carson KR, Shustov AR, Rosen ST, et al. Outcomes of Patients with Transformed Mycosis Fungoides: Analysis from a Prospective Multicenter US Cohort Study. *Clin Lymphoma Myeloma Leuk.* 2020;20(11):744-8.
137. Tan RS, Butterworth CM, McLaughlin H, Malka S, Samman PD. Mycosis fungoides--a disease of antigen persistence. *Br J Dermatol.* 1974;91(6):607-16.
138. Yawalkar N, Ferenczi K, Jones DA, Yamanaka K, Suh KY, Sadat S, et al. Profound loss of T-cell receptor repertoire complexity in cutaneous T-cell lymphoma. *Blood.* 2003;102(12):4059-66.
139. Morales Suárez-Varela MM, Llopis González A, Marquina Vila A, Bell J. Mycosis fungoides: review of epidemiological observations. *Dermatology.* 2000;201(1):21-8.
140. Furue M, Kadono T. New aspects of the clinicopathological features and treatment of mycosis fungoides and Sézary syndrome. *J Dermatol.* 2015;42(10):941-4.
141. Hwang ST, Janik JE, Jaffe ES, Wilson WH. Mycosis fungoides and Sézary syndrome. *Lancet.* 2008;371(9616):945-57.
142. Ermertcan AT, Öztürk F, Gündüz K. Toll-like receptors and skin. *J Eur Acad Dermatol Venereol.* 2011;25(9):997-1006.
143. Ferenczi K, Fuhlbrigge RC, Pinkus J, Pinkus GS, Kupper TS. Increased CCR4 expression in cutaneous T cell lymphoma. *J Invest Dermatol.* 2002;119(6):1405-10.
144. Nickoloff BJ, Nestle FO, Zheng XG, Turka LA. T lymphocytes in skin lesions of psoriasis and mycosis fungoides express B7-1: a ligand for CD28. *Blood.* 1994;83(9):2580-6.
145. Saed G, Fivenson DP, Naidu Y, Nickoloff BJ. Mycosis fungoides exhibits a Th1-type cell-mediated cytokine profile whereas Sezary syndrome expresses a Th2-type profile. *J Invest Dermatol.* 1994;103(1):29-33.

146. Chong BF, Wilson AJ, Gibson HM, Hafner MS, Luo Y, Hedgcock CJ, et al. Immune function abnormalities in peripheral blood mononuclear cell cytokine expression differentiates stages of cutaneous T-cell lymphoma/mycosis fungoides. *Clin Cancer Res*. 2008;14(3):646-53.
147. Guenova E, Watanabe R, Teague JE, Desimone JA, Jiang Y, Dowlatshahi M, et al. TH2 cytokines from malignant cells suppress TH1 responses and enforce a global TH2 bias in leukemic cutaneous T-cell lymphoma. *Clin Cancer Res*. 2013;19(14):3755-63.
148. Hoppe RT, Medeiros LJ, Warnke RA, Wood GS. CD8-positive tumor-infiltrating lymphocytes influence the long-term survival of patients with mycosis fungoides. *J Am Acad Dermatol*. 1995;32(3):448-53.
149. Gjerdrum LM, Woetmann A, Odum N, Burton CM, Rossen K, Skovgaard GL, et al. FOXP3+ regulatory T cells in cutaneous T-cell lymphomas: association with disease stage and survival. *Leukemia*. 2007;21(12):2512-8.
150. Gibson HM, Mishra A, Chan DV, Hake TS, Porcu P, Wong HK. Impaired proteasome function activates GATA3 in T cells and upregulates CTLA-4: relevance for Sézary syndrome. *J Invest Dermatol*. 2013;133(1):249-57.
151. Lee J, Ahn E, Kissick HT, Ahmed R. Reinvigorating Exhausted T Cells by Blockade of the PD-1 Pathway. *For Immunopathol Dis Therap*. 2015;6(1-2):7-17.
152. Netchiporouk E, Litvinov IV, Moreau L, Gilbert M, Sasseville D, Duvic M. Deregulation in STAT signaling is important for cutaneous T-cell lymphoma (CTCL) pathogenesis and cancer progression. *Cell Cycle*. 2014;13(21):3331-5.
153. Kopp KL, Ralfkiaer U, Gjerdrum LM, Helvad R, Pedersen IH, Litman T, et al. STAT5-mediated expression of oncogenic miR-155 in cutaneous T-cell lymphoma. *Cell Cycle*. 2013;12(12):1939-47.
154. Tili E, Michaille JJ, Wernicke D, Alder H, Costinean S, Volinia S, et al. Mutator activity induced by microRNA-155 (miR-155) links inflammation and cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011;108(12):4908-13.
155. Calò V, Migliavacca M, Bazan V, Macaluso M, Buscemi M, Gebbia N, et al. STAT proteins: from normal control of cellular events to tumorigenesis. *J Cell Physiol*. 2003;197(2):157-68.
156. Brender C, Nielsen M, Kaltoft K, Mikkelsen G, Zhang Q, Wasik M, et al. STAT3-mediated constitutive expression of SOCS-3 in cutaneous T-cell lymphoma. *Blood*. 2001;97(4):1056-62.
157. Choi J, Goh G, Walradt T, Hong BS, Bunick CG, Chen K, et al. Genomic landscape of cutaneous T cell lymphoma. *Nat Genet*. 2015;47(9):1011-9.
158. Stratton MR, Campbell PJ, Futreal PA. The cancer genome. *Nature*. 2009;458(7239):719-24.
159. Talbot SJ, Crawford DH. Viruses and tumours--an update. *Eur J Cancer*. 2004;40(13):1998-2005.
160. Herne KL, Talpur R, Breuer-McHam J, Champlin R, Duvic M. Cytomegalovirus seropositivity is significantly associated with mycosis fungoides and Sézary syndrome. *Blood*. 2003;101(6):2132-6.
161. Elenitoba-Johnson KS, Wilcox R. A new molecular paradigm in mycosis fungoides and Sézary syndrome. *Semin Diagn Pathol*. 2017;34(1):15-21.
162. Lin WM, Lewis JM, Filler RB, Modi BG, Carlson KR, Reddy S, et al. Characterization of the DNA copy-number genome in the blood of cutaneous T-cell lymphoma patients. *J Invest Dermatol*. 2012;132(1):188-97.

163. Laharanne E, Oumouhou N, Bonnet F, Carlotti M, Gentil C, Chevret E, et al. Genome-wide analysis of cutaneous T-cell lymphomas identifies three clinically relevant classes. *J Invest Dermatol.* 2010;130(6):1707-18.
164. Vaqué JP, Gómez-López G, Monsálvez V, Varela I, Martínez N, Pérez C, et al. PLCG1 mutations in cutaneous T-cell lymphomas. *Blood.* 2014;123(13):2034-43.
165. Neri A, Fracchiolla NS, Migliazza A, Trecca D, Lombardi L. The involvement of the candidate proto-oncogene NFKB2/lyt-10 in lymphoid malignancies. *Leuk Lymphoma.* 1996;23(1-2):43-8.
166. Heidorn SJ, Milagre C, Whittaker S, Nourry A, Niculescu-Duvas I, Dhomen N, et al. Kinase-dead BRAF and oncogenic RAS cooperate to drive tumor progression through CRAF. *Cell.* 2010;140(2):209-21.
167. Palomero T, Couronné L, Khiabani H, Kim MY, Ambesi-Impiombato A, Perez-Garcia A, et al. Recurrent mutations in epigenetic regulators, RHOA and FYN kinase in peripheral T cell lymphomas. *Nat Genet.* 2014;46(2):166-70.
168. da Silva Almeida AC, Abate F, Khiabani H, Martinez-Escala E, Guitart J, Tensen CP, et al. The mutational landscape of cutaneous T cell lymphoma and Sézary syndrome. *Nat Genet.* 2015;47(12):1465-70.
169. Damsky WE, Choi J. Genetics of Cutaneous T Cell Lymphoma: From Bench to Bedside. *Curr Treat Options Oncol.* 2016;17(7):33.
170. Alexandrov LB, Nik-Zainal S, Wedge DC, Aparicio SA, Behjati S, Biankin AV, et al. Signatures of mutational processes in human cancer. *Nature.* 2013;500(7463):415-21.
171. Wang L, Ni X, Covington KR, Yang BY, Shiu J, Zhang X, et al. Genomic profiling of Sézary syndrome identifies alterations of key T cell signaling and differentiation genes. *Nat Genet.* 2015;47(12):1426-34.
172. Zhang Y, Cheng TC, Huang G, Lu Q, Surleac MD, Mandell JD, et al. Transposon molecular domestication and the evolution of the RAG recombinase. *Nature.* 2019;569(7754):79-84.
173. Laharanne E, Chevret E, Idrissi Y, Gentil C, Longy M, Ferrer J, et al. CDKN2A-CDKN2B deletion defines an aggressive subset of cutaneous T-cell lymphoma. *Mod Pathol.* 2010;23(4):547-58.
174. Sharpless NE, DePinho RA. The INK4A/ARF locus and its two gene products. *Curr Opin Genet Dev.* 1999;9(1):22-30.
175. Ortega S, Malumbres M, Barbacid M. Cyclin D-dependent kinases, INK4 inhibitors and cancer. *Biochim Biophys Acta.* 2002;1602(1):73-87.
176. Mao X, Orchard G, Vonderheid EC, Nowell PC, Bagot M, Bensussan A, et al. Heterogeneous abnormalities of CCND1 and RB1 in primary cutaneous T-Cell lymphomas suggesting impaired cell cycle control in disease pathogenesis. *J Invest Dermatol.* 2006;126(6):1388-95.
177. Knudsen ES, Pruitt SC, Hershberger PA, Witkiewicz AK, Goodrich DW. Cell Cycle and Beyond: Exploiting New RB1 Controlled Mechanisms for Cancer Therapy. *Trends Cancer.* 2019;5(5):308-24.
178. Scarisbrick JJ, Woolford AJ, Calonje E, Photiou A, Ferreira S, Orchard G, et al. Frequent abnormalities of the p15 and p16 genes in mycosis fungoides and sezary syndrome. *J Invest Dermatol.* 2002;118(3):493-9.
179. Zhang C, Toulev A, Kamarashev J, Qin JZ, Dummer R, Döbbeling U. Consequences of p16 tumor suppressor gene inactivation in mycosis fungoides and Sézary syndrome and role of the bmi-1 and ras oncogenes in disease progression. *Hum Pathol.* 2007;38(7):995-1002.

180. Ohtani K. Implication of transcription factor E2F in regulation of DNA replication. *Front Biosci.* 1999;4:D793-804.
181. Ni X, Zhang C, Talpur R, Duvic M. Resistance to activation-induced cell death and bystander cytotoxicity via the Fas/Fas ligand pathway are implicated in the pathogenesis of cutaneous T cell lymphomas. *J Invest Dermatol.* 2005;124(4):741-50.
182. Li YL, Shi ZH, Wang X, Gu KS, Zhai ZM. Prognostic significance of monocyte chemoattractant protein-1 and CC chemokine receptor 2 in diffuse large B cell lymphoma. *Ann Hematol.* 2019;98(2):413-22.
183. Park J, Yang J, Wenzel AT, Ramachandran A, Lee WJ, Daniels JC, et al. Genomic analysis of 220 CTCLs identifies a novel recurrent gain-of-function alteration in RLTPR (p.Q575E). *Blood.* 2017;130(12):1430-40.
184. Vermeer MH, van Doorn R, Dijkman R, Mao X, Whittaker S, van Voorst Vader PC, et al. Novel and highly recurrent chromosomal alterations in Sézary syndrome. *Cancer Res.* 2008;68(8):2689-98.
185. Ospina Pérez M, Muñetón Peña CM. Alteraciones del gen c-Myc en la oncogénesis. *Iatreia.* 2011;24:389-401.
186. Egle A, Harris AW, Bouillet P, Cory S. Bim is a suppressor of Myc-induced mouse B cell leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004;101(16):6164-9.
187. Palomero T, Lim WK, Odom DT, Sulis ML, Real PJ, Margolin A, et al. NOTCH1 directly regulates *c-MYC* and activates a feed-forward-loop transcriptional network promoting leukemic cell growth. *Proceedings of the National Academy of Sciences.* 2006;103(48):18261-6.
188. Jundt F, Anagnostopoulos I, Förster R, Mathas S, Stein H, Dörken B. Activated Notch1 signaling promotes tumor cell proliferation and survival in Hodgkin and anaplastic large cell lymphoma. *Blood.* 2002;99(9):3398-403.
189. Lundin Brockdorff J, Woetmann A, Mustelin T, Kaltoft K, Zhang Q, Wasik MA, et al. SHP2 regulates IL-2 induced MAPK activation, but not Stat3 or Stat5 tyrosine phosphorylation, in cutaneous T cell lymphoma cells. *Cytokine.* 2002;20(4):141-7.
190. Nam HJ, Kim S, Lee MW, Lee BS, Hara T, Saya H, et al. The ERK-RSK1 activation by growth factors at G2 phase delays cell cycle progression and reduces mitotic aberrations. *Cell Signal.* 2008;20(7):1349-58.
191. Mao X, Orchard G, Mitchell TJ, Oyama N, Russell-Jones R, Vermeer MH, et al. A genomic and expression study of AP-1 in primary cutaneous T-cell lymphoma: evidence for dysregulated expression of JUNB and JUND in MF and SS. *J Cutan Pathol.* 2008;35(10):899-910.
192. Tybulewicz VL, Henderson RB. Rho family GTPases and their regulators in lymphocytes. *Nat Rev Immunol.* 2009;9(9):630-44.
193. Song Y, Wong C, Chang DD. Overexpression of wild-type RhoA produces growth arrest by disrupting actin cytoskeleton and microtubules. *J Cell Biochem.* 2000;80(2):229-40.
194. Tong L, Tergaonkar V. Rho protein GTPases and their interactions with NFκB: crossroads of inflammation and matrix biology. *Biosci Rep.* 2014;34(3).
195. Iqbal J, Amador C, McKeithan TW, Chan WC. Molecular and Genomic Landscape of Peripheral T-Cell Lymphoma. *Cancer Treat Res.* 2019;176:31-68.
196. Pérez C, Mondéjar R, García-Díaz N, Cereceda L, León A, Montes S, et al. Advanced-stage mycosis fungoides: role of the signal transducer and activator of transcription 3, nuclear factor-κB and nuclear factor of activated T cells pathways. *Br J Dermatol.* 2020;182(1):147-55.

197. Macian F. NFAT proteins: key regulators of T-cell development and function. *Nat Rev Immunol.* 2005;5(6):472-84.
198. Man K, Miasari M, Shi W, Xin A, Henstridge DC, Preston S, et al. The transcription factor IRF4 is essential for TCR affinity-mediated metabolic programming and clonal expansion of T cells. *Nat Immunol.* 2013;14(11):1155-65.
199. Sharpe AH, Pauken KE. The diverse functions of the PD1 inhibitory pathway. *Nat Rev Immunol.* 2018;18(3):153-67.
200. Zhang Y, Wang Y, Yu R, Huang Y, Su M, Xiao C, et al. Molecular markers of early-stage mycosis fungoides. *J Invest Dermatol.* 2012;132(6):1698-706.
201. Bonizzi G, Karin M. The two NF-kappaB activation pathways and their role in innate and adaptive immunity. *Trends Immunol.* 2004;25(6):280-8.
202. Lenz G, Davis RE, Ngo VN, Lam L, George TC, Wright GW, et al. Oncogenic CARD11 mutations in human diffuse large B cell lymphoma. *Science.* 2008;319(5870):1676-9.
203. Kiel MJ, Sahasrabudhe AA, Rolland DCM, Velusamy T, Chung F, Schaller M, et al. Genomic analyses reveal recurrent mutations in epigenetic modifiers and the JAK-STAT pathway in Sézary syndrome. *Nat Commun.* 2015;6:8470.
204. Isakov N, Altman A. Protein kinase C(theta) in T cell activation. *Annu Rev Immunol.* 2002;20:761-94.
205. Ungewickell A, Bhaduri A, Rios E, Reuter J, Lee CS, Mah A, et al. Genomic analysis of mycosis fungoides and Sézary syndrome identifies recurrent alterations in TNFR2. *Nat Genet.* 2015;47(9):1056-60.
206. Gallardo F, Bertran J, López-Arribillaga E, González J, Menéndez S, Sánchez I, et al. Novel phosphorylated TAK1 species with functional impact on NF-κB and β-catenin signaling in human Cutaneous T-cell lymphoma. *Leukemia.* 2018;32(10):2211-23.
207. O'Shea JJ, Lahesmaa R, Vahedi G, Laurence A, Kanno Y. Genomic views of STAT function in CD4+ T helper cell differentiation. *Nat Rev Immunol.* 2011;11(4):239-50.
208. McGirt LY, Jia P, Baerenwald DA, Duszynski RJ, Dahlman KB, Zic JA, et al. Whole-genome sequencing reveals oncogenic mutations in mycosis fungoides. *Blood.* 2015;126(4):508-19.
209. Bastidas Torres AN, Cats D, Mei H, Szuhai K, Willemze R, Vermeer MH, et al. Genomic analysis reveals recurrent deletion of JAK-STAT signaling inhibitors HNRNPK and SOCS1 in mycosis fungoides. *Genes Chromosomes Cancer.* 2018;57(12):653-64.
210. Tybulewicz VL, Ardouin L, Prisco A, Reynolds LF. Vav1: a key signal transducer downstream of the TCR. *Immunol Rev.* 2003;192:42-52.
211. Hurabielle C, Michel L, Ram-Wolff C, Battistella M, Jean-Louis F, Beylot-Barry M, et al. Expression of Sézary Biomarkers in the Blood of Patients with Erythrodermic Mycosis Fungoides. *J Invest Dermatol.* 2016;136(1):317-20.
212. Mo R, Rao SM, Zhu YJ. Identification of the MLL2 complex as a coactivator for estrogen receptor alpha. *J Biol Chem.* 2006;281(23):15714-20.
213. Chen J, Xu X, Li Y, Li F, Zhang J, Xu Q, et al. Kdm6a suppresses the alternative activation of macrophages and impairs energy expenditure in obesity. *Cell Death & Differentiation.* 2021;28(5):1688-704.
214. Trager MH, Geskin LJ. Current status of histone deacetylase inhibitors in cutaneous T-cell lymphoma. *G Ital Dermatol Venereol.* 2019;154(6):681-95.

215. Nagl NG, Jr., Wang X, Patsialou A, Van Scoy M, Moran E. Distinct mammalian SWI/SNF chromatin remodeling complexes with opposing roles in cell-cycle control. *Embo j.* 2007;26(3):752-63.
216. Blais A, Dynlacht BD. E2F-associated chromatin modifiers and cell cycle control. *Curr Opin Cell Biol.* 2007;19(6):658-62.
217. Batlle-López A, Cortiguera MG, Delgado MD. The epigenetic regulator CTCF modulates BCL6 in lymphoma. *Oncoscience.* 2015;2(10):783-4.
218. Bermudez O, Marchetti S, Pagès G, Gimond C. Post-translational regulation of the ERK phosphatase DUSP6/MKP3 by the mTOR pathway. *Oncogene.* 2008;27(26):3685-91.
219. Kim EJ, Hess S, Richardson SK, Newton S, Showe LC, Benoit BM, et al. Immunopathogenesis and therapy of cutaneous T cell lymphoma. *J Clin Invest.* 2005;115(4):798-812.
220. Wechsler J. [Mycosis fungoides]. *Ann Dermatol Venereol.* 2004;131(8-9):849-52.
221. Burg G, Kempf W, Cozzio A, Feit J, Willemze R, E SJ, et al. WHO/EORTC classification of cutaneous lymphomas 2005: histological and molecular aspects. *J Cutan Pathol.* 2005;32(10):647-74.
222. Quatresooz P, Piérard GE. [Mycosis fungoides and its new paradigm]. *Rev Med Liege.* 2010;65(3):147-51.
223. Kempf W, Kazakov DV, Broekaert SM, Metze D. Pediatric CD8⁺CD56⁺ non-poikilodermatous mycosis fungoides: case report and review of the literature. *Am J Dermatopathol.* 2014;36(7):598-602.
224. Hodak E, David M, Maron L, Aviram A, Kaganovsky E, Feinmesser M. CD4/CD8 double-negative epidermotropic cutaneous T-cell lymphoma: an immunohistochemical variant of mycosis fungoides. *J Am Acad Dermatol.* 2006;55(2):276-84.
225. Knapp CF, Mathew R, Messina JL, Lien MH. CD4/CD8 dual-positive mycosis fungoides: a previously unrecognized variant. *Am J Dermatopathol.* 2012;34(3):e37-9.
226. Hagen JW, Schaefer JT, Magro CM. CD20+ mycosis fungoides: a report of three cases and review of the literature. *Am J Dermatopathol.* 2013;35(8):833-41.
227. Romero M, Haney M, Desantis E, Zlotoff B. Mycosis fungoides with focal CD 30 transformation in an adolescent. *Pediatr Dermatol.* 2008;25(5):565-8.
228. Guitart J, Kennedy J, Ronan S, Chmiel JS, Hsiegh YC, Variakojis D. Histologic criteria for the diagnosis of mycosis fungoides: proposal for a grading system to standardize pathology reporting. *J Cutan Pathol.* 2001;28(4):174-83.
229. Sentis HJ, Willemze R, Scheffer E. Histopathologic studies in Sézary syndrome and erythrodermic mycosis fungoides: a comparison with benign forms of erythroderma. *J Am Acad Dermatol.* 1986;15(6):1217-26.
230. Chiba T, Nagai T, Osada SI, Manabe M. Diagnosis of Mycosis Fungoides Following Administration of Dupilumab for Misdiagnosed Atopic Dermatitis. *Acta Derm Venereol.* 2019;99(9):818-9.
231. Kim JC, Kim YC. Hypopigmented Mycosis Fungoides Mimicking Vitiligo. *Am J Dermatopathol.* 2021;43(3):213-6.
232. Hadi R, Miller TI, May C, Lehman JS, Bennett DD, Piliang M, et al. Impact of clinical photographs on the accuracy and confidence in the histopathological diagnosis of mycosis fungoides. *J Cutan Pathol.* 2021;48(7):842-6.

233. Olsen EA. Evaluation, Diagnosis, and Staging of Cutaneous Lymphoma. *Dermatol Clin*. 2015;33(4):643-54.
234. Olsen E, Vonderheid E, Pimpinelli N, Willemze R, Kim Y, Knobler R, et al. Revisions to the staging and classification of mycosis fungoides and Sezary syndrome: a proposal of the International Society for Cutaneous Lymphomas (ISCL) and the cutaneous lymphoma task force of the European Organization of Research and Treatment of Cancer (EORTC). *Blood*. 2007;110(6):1713-22.
235. Horna P, Wang SA, Wolniak KL, Psarra K, Almeida J, Illingworth AJ, et al. Flow cytometric evaluation of peripheral blood for suspected Sézary syndrome or mycosis fungoides: International guidelines for assay characteristics. *Cytometry B Clin Cytom*. 2021;100(2):142-55.
236. Cotta AC, Cintra ML, de Souza EM, Chagas CA, Magna LA, Fleury RN, et al. Diagnosis of mycosis fungoides: a comparative immunohistochemical study of T-cell markers using a novel anti-CD7 antibody. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*. 2006;14(3):291-5.
237. Harmon CB, Witzig TE, Katzmann JA, Pittelkow MR. Detection of circulating T cells with CD4+CD7- immunophenotype in patients with benign and malignant lymphoproliferative dermatoses. *J Am Acad Dermatol*. 1996;35(3 Pt 1):404-10.
238. Bernengo MG, Novelli M, Quaglino P, Lisa F, De Matteis A, Savoia P, et al. The relevance of the CD4+ CD26- subset in the identification of circulating Sézary cells. *Br J Dermatol*. 2001;144(1):125-35.
239. Horna P, Moscinski LC, Sokol L, Shao H. Naïve/memory T-cell phenotypes in leukemic cutaneous T-cell lymphoma: Putative cell of origin overlaps disease classification. *Cytometry B Clin Cytom*. 2019;96(3):234-41.
240. Lyapichev KA, Bah I, Huen A, Duvic M, Routbort MJ, Wang W, et al. Determination of immunophenotypic aberrancies provides better assessment of peripheral blood involvement by mycosis fungoides/Sézary syndrome than quantification of CD26- or CD7- CD4+ T-cells. *Cytometry B Clin Cytom*. 2021;100(2):183-91.
241. Kalay Yildizhan I, Sanli H, Akay BN, Sürgün E, Heper A. CD8(+) cytotoxic mycosis fungoides: a retrospective analysis of clinical features and follow-up results of 29 patients. *Int J Dermatol*. 2020;59(1):127-33.
242. Boulos S, Vaid R, Aladily TN, Ivan DS, Talpur R, Duvic M. Clinical presentation, immunopathology, and treatment of juvenile-onset mycosis fungoides: a case series of 34 patients. *J Am Acad Dermatol*. 2014;71(6):1117-26.
243. Jonak C. CD8(+) mycosis fungoides: a wolf in sheep's clothing? *Br J Dermatol*. 2019;181(6):1126-7.
244. Greiner TC, Raffeld M, Lutz C, Dick F, Jaffe ES. Analysis of T cell receptor-gamma gene rearrangements by denaturing gradient gel electrophoresis of GC-clamped polymerase chain reaction products. Correlation with tumor-specific sequences. *Am J Pathol*. 1995;146(1):46-55.
245. Langerak AW, Groenen PJ, Brüggemann M, Beldjord K, Bellan C, Bonello L, et al. EuroClonality/BIOMED-2 guidelines for interpretation and reporting of Ig/TCR clonality testing in suspected lymphoproliferations. *Leukemia*. 2012;26(10):2159-71.
246. Boehncke WH, Brembilla NC. Autoreactive T-Lymphocytes in Inflammatory Skin Diseases. *Front Immunol*. 2019;10:1198.

247. Murphy M, Signoretti S, Kadin ME, Loda M. Detection of TCR-gamma gene rearrangements in early mycosis fungoides by non-radioactive PCR-SSCP. *J Cutan Pathol.* 2000;27(5):228-34.
248. Wood GS. T-cell receptor and immunoglobulin gene rearrangements in diagnosing skin disease. *Arch Dermatol.* 2001;137(11):1503-6.
249. Groenen PJ, Langerak AW, van Dongen JJ, van Krieken JH. Pitfalls in TCR gene clonality testing: teaching cases. *J Hematop.* 2008;1(2):97-109.
250. Schiller PI, Flaig MJ, Puchta U, Kind P, Sander CA. Detection of clonal T cells in lichen planus. *Arch Dermatol Res.* 2000;292(11):568-9.
251. Dereure O, Levi E, Kadin ME. T-Cell clonality in pityriasis lichenoides et varioliformis acuta: a heteroduplex analysis of 20 cases. *Arch Dermatol.* 2000;136(12):1483-6.
252. Lukowsky A, Muche JM, Sterry W, Audring H. Detection of expanded T cell clones in skin biopsy samples of patients with lichen sclerosus et atrophicus by T cell receptor-gamma polymerase chain reaction assays. *J Invest Dermatol.* 2000;115(2):254-9.
253. Thurber SE, Zhang B, Kim YH, Schrijver I, Zehnder J, Kohler S. T-cell clonality analysis in biopsy specimens from two different skin sites shows high specificity in the diagnosis of patients with suggested mycosis fungoides. *J Am Acad Dermatol.* 2007;57(5):782-90.
254. Ralfkiaer U, Hagedorn PH, Bangsgaard N, Løvendorf MB, Ahler CB, Svensson L, et al. Diagnostic microRNA profiling in cutaneous T-cell lymphoma (CTCL). *Blood.* 2011;118(22):5891-900.
255. Muzzey D, Evans EA, Lieber C. Understanding the Basics of NGS: From Mechanism to Variant Calling. *Curr Genet Med Rep.* 2015;3(4):158-65.
256. Kirsch IR, Watanabe R, O'Malley JT, Williamson DW, Scott LL, Elco CP, et al. TCR sequencing facilitates diagnosis and identifies mature T cells as the cell of origin in CTCL. *Sci Transl Med.* 2015;7(308):308ra158.
257. Sufficool KE, Lockwood CM, Abel HJ, Hagemann IS, Schumacher JA, Kelley TW, et al. T-cell clonality assessment by next-generation sequencing improves detection sensitivity in mycosis fungoides. *J Am Acad Dermatol.* 2015;73(2):228-36.e2.
258. Walia R, Yeung CCS. An Update on Molecular Biology of Cutaneous T Cell Lymphoma. *Front Oncol.* 2019;9:1558.
259. Yu X, Luo Y, Liu J, Liu Y, Sun Q. TOX acts an oncological role in mycosis fungoides. *PLoS One.* 2015;10(3):e0117479.
260. Morimura S, Sugaya M, Suga H, Miyagaki T, Ohmatsu H, Fujita H, et al. TOX expression in different subtypes of cutaneous lymphoma. *Arch Dermatol Res.* 2014;306(9):843-9.
261. Kim YH, Jensen RA, Watanabe GL, Varghese A, Hoppe RT. Clinical stage IA (limited patch and plaque) mycosis fungoides. A long-term outcome analysis. *Arch Dermatol.* 1996;132(11):1309-13.
262. Kim YH, Chow S, Varghese A, Hoppe RT. Clinical characteristics and long-term outcome of patients with generalized patch and/or plaque (T2) mycosis fungoides. *Arch Dermatol.* 1999;135(1):26-32.
263. Zackheim HS, Amin S, Kashani-Sabet M, McMillan A. Prognosis in cutaneous T-cell lymphoma by skin stage: long-term survival in 489 patients. *J Am Acad Dermatol.* 1999;40(3):418-25.

264. Kim YH, Liu HL, Mraz-Gernhard S, Varghese A, Hoppe RT. Long-term outcome of 525 patients with mycosis fungoides and Sezary syndrome: clinical prognostic factors and risk for disease progression. *Arch Dermatol.* 2003;139(7):857-66.
265. Bunn PA, Jr., Lamberg SI. Report of the Committee on Staging and Classification of Cutaneous T-Cell Lymphomas. *Cancer Treat Rep.* 1979;63(4):725-8.
266. Wernham A, Stranzenbach R, Stadler R, Ortiz P, Guenova E, Quaglino P, et al., editors. Changes in blood involvement in Sezary syndrome positively correlate with skin severity but not in mycosis fungoides. International Investigative Dermatology (IID) Meeting Location: Orlando, FL Date: MAY 16-19, 2018; 2018.
267. Mourad A, Gniadecki R. Overall Survival in Mycosis Fungoides: A Systematic Review and Meta-Analysis. *J Invest Dermatol.* 2020;140(2):495-7.e5.
268. Arulogun SO, Prince HM, Ng J, Lade S, Ryan GF, Blewitt O, et al. Long-term outcomes of patients with advanced-stage cutaneous T-cell lymphoma and large cell transformation. *Blood.* 2008;112(8):3082-7.
269. Kalay Yildizhan I, Sanli H, Akay BN, Uzundere C, Okcu Heper A. Folliculotropic mycosis fungoides: Clinical characteristics, treatments, and long-term outcomes of 53 patients in a tertiary hospital. *Dermatol Ther.* 2020;33(4):e13585.
270. van Santen S, Roach RE, van Doorn R, Horváth B, Bruijn MS, Sanders CJ, et al. Clinical Staging and Prognostic Factors in Folliculotropic Mycosis Fungoides. *JAMA Dermatol.* 2016;152(9):992-1000.
271. Tarabadkar ES, Shinohara MM. Skin Directed Therapy in Cutaneous T-Cell Lymphoma. *Front Oncol.* 2019;9:260.
272. Duvic M, Olsen EA, Omura GA, Maize JC, Vonderheid EC, Elmets CA, et al. A phase III, randomized, double-blind, placebo-controlled study of peldesine (BCX-34) cream as topical therapy for cutaneous T-cell lymphoma. *J Am Acad Dermatol.* 2001;44(6):940-7.
273. Zackheim HS, Kashani-Sabet M, Amin S. Topical corticosteroids for mycosis fungoides. Experience in 79 patients. *Arch Dermatol.* 1998;134(8):949-54.
274. Lessin SR, Duvic M, Guitart J, Pandya AG, Strober BE, Olsen EA, et al. Topical chemotherapy in cutaneous T-cell lymphoma: positive results of a randomized, controlled, multicenter trial testing the efficacy and safety of a novel mechlorethamine, 0.02%, gel in mycosis fungoides. *JAMA Dermatol.* 2013;149(1):25-32.
275. Zackheim HS. Topical carmustine (BCNU) in the treatment of mycosis fungoides. *Dermatol Ther.* 2003;16(4):299-302.
276. Foss FM, Girardi M. Mycosis Fungoides and Sezary Syndrome. *Hematol Oncol Clin North Am.* 2017;31(2):297-315.
277. Panchal MR, Scarisbrick JJ. The utility of bexarotene in mycosis fungoides and Sézary syndrome. *Onco Targets Ther.* 2015;8:367-73.
278. Richardson SK, Newton SB, Bach TL, Budgin JB, Benoit BM, Lin JH, et al. Bexarotene blunts malignant T-cell chemotaxis in Sezary syndrome: reduction of chemokine receptor 4-positive lymphocytes and decreased chemotaxis to thymus and activation-regulated chemokine. *Am J Hematol.* 2007;82(9):792-7.
279. Zhang C, Hazarika P, Ni X, Weidner DA, Duvic M. Induction of apoptosis by bexarotene in cutaneous T-cell lymphoma cells: relevance to mechanism of therapeutic action. *Clin Cancer Res.* 2002;8(5):1234-40.

280. Breneman D, Duvic M, Kuzel T, Yocum R, Truglia J, Stevens VJ. Phase 1 and 2 trial of bexarotene gel for skin-directed treatment of patients with cutaneous T-cell lymphoma. *Arch Dermatol.* 2002;138(3):325-32.
281. Shipman AR, Scarisbrick J. New Treatment Options for Mycosis Fungoides. *Indian J Dermatol.* 2016;61(1):119.
282. Chong A, Loo WJ, Banney L, Grant JW, Norris PG. Imiquimod 5% cream in the treatment of mycosis fungoides--a pilot study. *J Dermatolog Treat.* 2004;15(2):118-9.
283. Ramelyte E, Dummer R, Guenova E. Investigative drugs for the treatment of cutaneous T-cell lymphomas (CTCL): an update. *Expert Opin Investig Drugs.* 2019;28(9):799-809.
284. Dogra S, Mahajan R. Phototherapy for mycosis fungoides. *Indian J Dermatol Venereol Leprol.* 2015;81(2):124-35.
285. Hodak E, Pavlovsky L. Phototherapy of Mycosis Fungoides. *Dermatol Clin.* 2015;33(4):697-702.
286. Xue J, Liu C, Liu Y. Photodynamic therapy as an alternative treatment for relapsed or refractory mycosis fungoides: A systemic review. *Photodiagnosis Photodyn Ther.* 2017;17:87-91.
287. Fernández-Guarino M, Jaén-Olasolo P. Photodynamic therapy in mycosis fungoides. *Actas Dermosifiliogr.* 2013;104(5):393-9.
288. O'Malley JT, de Masson A, Lowry EL, Giobbie-Hurder A, LeBoeuf NR, Larocca C, et al. Radiotherapy Eradicates Malignant T Cells and Is Associated with Improved Survival in Early-Stage Mycosis Fungoides. *Clin Cancer Res.* 2020;26(2):408-18.
289. Hoppe RT. Mycosis fungoides: radiation therapy. *Dermatol Ther.* 2003;16(4):347-54.
290. Hogstrom KR, Almond PR. Review of electron beam therapy physics. *Phys Med Biol.* 2006;51(13):R455-89.
291. Rivers CI, Singh AK. Total Skin Electron Beam Therapy for Mycosis Fungoides Revisited With Adjuvant Systemic Therapy. *Clin Lymphoma Myeloma Leuk.* 2019;19(2):83-8.
292. Chowdhary M, Song A, Zaorsky NG, Shi W. Total skin electron beam therapy in mycosis fungoides--a shift towards lower dose? *Chin Clin Oncol.* 2019;8(1):9.
293. Abel EA, Sendagorta E, Hoppe RT. Cutaneous malignancies and metastatic squamous cell carcinoma following topical therapies for mycosis fungoides. *J Am Acad Dermatol.* 1986;14(6):1029-38.
294. Piotrowski T, Fundowicz M, Pawlaczyk M. Total Skin Electron Beam Therapy with Rotary Dual Technique as Palliative Treatment for Mycosis Fungoides. *In Vivo.* 2018;32(3):517-22.
295. Jones GW, Rosenthal D, Wilson LD. Total skin electron radiation for patients with erythrodermic cutaneous T-cell lymphoma (mycosis fungoides and the Sézary syndrome). *Cancer.* 1999;85(9):1985-95.
296. Galper SL, Smith BD, Wilson LD. Diagnosis and management of mycosis fungoides. *Oncology (Williston Park).* 2010;24(6):491-501.
297. Talpur R, Ward S, Apisarnthanarax N, Breuer-Mcham J, Duvic M. Optimizing bexarotene therapy for cutaneous T-cell lymphoma. *J Am Acad Dermatol.* 2002;47(5):672-84.

298. Sepmeyer JA, Greer JP, Koyama T, Zic JA. Open-label pilot study of combination therapy with rosiglitazone and bexarotene in the treatment of cutaneous T-cell lymphoma. *J Am Acad Dermatol.* 2007;56(4):584-7.
299. Whittaker S, Hoppe R, Prince HM. How I treat mycosis fungoides and Sézary syndrome. *Blood.* 2016;127(25):3142-53.
300. Pestka S, Krause CD, Walter MR. Interferons, interferon-like cytokines, and their receptors. *Immunol Rev.* 2004;202:8-32.
301. Kamijo H, Miyagaki T. Mycosis Fungoides and Sézary Syndrome: Updates and Review of Current Therapy. *Curr Treat Options Oncol.* 2021;22(2):10.
302. Zhang SY, Liu ZR, Yang L, Wang T, Liu J, Liu YH, et al. Real-world data on the effectiveness and safety of interferon-alpha-2a intralesional injection for the treatment of focally recalcitrant mycosis fungoides. *Ann Transl Med.* 2020;8(15):920.
303. Jumbou O, N'Guyen JM, Tessier MH, Legoux B, Dréno B. Long-term follow-up in 51 patients with mycosis fungoides and Sézary syndrome treated by interferon-alfa. *Br J Dermatol.* 1999;140(3):427-31.
304. Vandersee S, Terhorst D, Humme D, Beyer M. Treatment of indolent primary cutaneous B-cell lymphomas with subcutaneous interferon-alfa. *J Am Acad Dermatol.* 2014;70(4):709-15.
305. Shen S, O'Brien T, Yap LM, Prince HM, McCormack CJ. The use of methotrexate in dermatology: a review. *Australas J Dermatol.* 2012;53(1):1-18.
306. Valipour A, Jäger M, Wu P, Schmitt J, Bunch C, Weberschock T. Interventions for mycosis fungoides. *Cochrane Database Syst Rev.* 2020;7(7):Cd008946.
307. Zackheim HS, Kashani-Sabet M, McMillan A. Low-dose methotrexate to treat mycosis fungoides: a retrospective study in 69 patients. *J Am Acad Dermatol.* 2003;49(5):873-8.
308. Foss F, Horwitz SM, Coiffier B, Bartlett N, Popplewell L, Pro B, et al. Pralatrexate is an effective treatment for relapsed or refractory transformed mycosis fungoides: a subgroup efficacy analysis from the PROPEL study. *Clin Lymphoma Myeloma Leuk.* 2012;12(4):238-43.
309. Foss FM, Parker TL, Girardi M, Li A. Clinical Activity of Pralatrexate in Patients With Cutaneous T-Cell Lymphoma Treated With Varying Doses of Pralatrexate. *Clin Lymphoma Myeloma Leuk.* 2018;18(11):e445-e7.
310. Kaye FJ, Bunn PA, Jr., Steinberg SM, Stocker JL, Ihde DC, Fischmann AB, et al. A randomized trial comparing combination electron-beam radiation and chemotherapy with topical therapy in the initial treatment of mycosis fungoides. *N Engl J Med.* 1989;321(26):1784-90.
311. Kuzel TM. Systemic chemotherapy for the treatment of mycosis fungoides and Sézary syndrome. *Dermatol Ther.* 2003;16(4):355-61.
312. Fujii K. New Therapies and Immunological Findings in Cutaneous T-Cell Lymphoma. *Front Oncol.* 2018;8:198.
313. Marchi E, Alinari L, Tani M, Stefoni V, Pimpinelli N, Berti E, et al. Gemcitabine as frontline treatment for cutaneous T-cell lymphoma: phase II study of 32 patients. *Cancer.* 2005;104(11):2437-41.
314. Di Lorenzo G, Di Trolio R, Delfino M, De Placido S. Pegylated liposomal doxorubicin in stage IVB mycosis fungoides. *Br J Dermatol.* 2005;153(1):183-5.
315. Dummer R, Quaglino P, Becker JC, Hasan B, Karrasch M, Whittaker S, et al. Prospective international multicenter phase II trial of intravenous pegylated liposomal doxorubicin monochemotherapy in patients with stage IIB, IVA, or IVB

- advanced mycosis fungoides: final results from EORTC 21012. *J Clin Oncol*. 2012;30(33):4091-7.
316. Van-de-Velde V, Zhou Y. Existing and Emerging Therapies for Cutaneous T-Cell Lymphoma. *J Cutan Med Surg*. 2019;23(3):319-27.
317. Bagot M. New Targeted Treatments for Cutaneous T-cell Lymphomas. *Indian J Dermatol*. 2017;62(2):142-5.
318. Kennedy GA, Seymour JF, Wolf M, Januszewicz H, Davison J, McCormack C, et al. Treatment of patients with advanced mycosis fungoides and Sézary syndrome with alemtuzumab. *Eur J Haematol*. 2003;71(4):250-6.
319. Akilov OE, Geskin L. Therapeutic advances in cutaneous T-cell lymphoma. *Skin Therapy Lett*. 2011;16(2):1-5.
320. Alaibac M. Monoclonal antibodies against cutaneous T-cell lymphomas. *Expert Opin Biol Ther*. 2017;17(12):1503-10.
321. Prince HM, Kim YH, Horwitz SM, Dummer R, Scarisbrick J, Quaglino P, et al. Brentuximab vedotin or physician's choice in CD30-positive cutaneous T-cell lymphoma (ALCANZA): an international, open-label, randomised, phase 3, multicentre trial. *Lancet*. 2017;390(10094):555-66.
322. Van Der Weyden C, Dickinson M, Whisstock J, Prince HM. Brentuximab vedotin in T-cell lymphoma. *Expert Rev Hematol*. 2019;12(1):5-19.
323. Ogura M, Ishida T, Hatake K, Taniwaki M, Ando K, Tobinai K, et al. Multicenter phase II study of mogamulizumab (KW-0761), a defucosylated anti-CC chemokine receptor 4 antibody, in patients with relapsed peripheral T-cell lymphoma and cutaneous T-cell lymphoma. *J Clin Oncol*. 2014;32(11):1157-63.
324. Lewis DJ, Rook AH. Mogamulizumab in the treatment of advanced mycosis fungoides and Sézary syndrome: safety and efficacy. *Expert Rev Anticancer Ther*. 2020;20(6):447-52.
325. Khodadoust MS, Rook AH, Porcu P, Foss F, Moskowitz AJ, Shustov A, et al. Pembrolizumab in Relapsed and Refractory Mycosis Fungoides and Sézary Syndrome: A Multicenter Phase II Study. *J Clin Oncol*. 2020;38(1):20-8.
326. Lesokhin AM, Ansell SM, Armand P, Scott EC, Halwani A, Gutierrez M, et al. Nivolumab in Patients With Relapsed or Refractory Hematologic Malignancy: Preliminary Results of a Phase Ib Study. *J Clin Oncol*. 2016;34(23):2698-704.
327. Marks PA, Richon VM, Miller T, Kelly WK. Histone deacetylase inhibitors. *Adv Cancer Res*. 2004;91:137-68.
328. Duvic M. Histone Deacetylase Inhibitors for Cutaneous T-Cell Lymphoma. *Dermatol Clin*. 2015;33(4):757-64.
329. Duvic M, Vu J. Vorinostat: a new oral histone deacetylase inhibitor approved for cutaneous T-cell lymphoma. *Expert Opin Investig Drugs*. 2007;16(7):1111-20.
330. Duvic M, Talpur R, Ni X, Zhang C, Hazarika P, Kelly C, et al. Phase 2 trial of oral vorinostat (suberoylanilide hydroxamic acid, SAHA) for refractory cutaneous T-cell lymphoma (CTCL). *Blood*. 2007;109(1):31-9.
331. Coiffier B, Pro B, Prince HM, Foss F, Sokol L, Greenwood M, et al. Romidepsin for the treatment of relapsed/refractory peripheral T-cell lymphoma: pivotal study update demonstrates durable responses. *J Hematol Oncol*. 2014;7:11.
332. Oka T, Miyagaki T. Novel and Future Therapeutic Drugs for Advanced Mycosis Fungoides and Sézary Syndrome. *Front Med (Lausanne)*. 2019;6:116.
333. Cho A, Jantschitsch C, Knobler R. Extracorporeal Photopheresis-An Overview. *Front Med (Lausanne)*. 2018;5:236.

334. Wolnicka-Glubisz A, Fraczek J, Skrzeczynska-Moncznik J, Friedlein G, Mikolajczyk T, Sarna T, et al. Effect of UVA and 8-methoxypsoralen, 4, 6, 4'-trimethylangelicin or chlorpromazine on apoptosis of lymphocytes and their recognition by monocytes. *J Physiol Pharmacol*. 2010;61(1):107-14.
335. Scarisbrick JJ, Taylor P, Holtick U, Makar Y, Douglas K, Berlin G, et al. U.K. consensus statement on the use of extracorporeal photopheresis for treatment of cutaneous T-cell lymphoma and chronic graft-versus-host disease. *Br J Dermatol*. 2008;158(4):659-78.
336. Photiou L, van der Weyden C, McCormack C, Miles Prince H. Systemic Treatment Options for Advanced-Stage Mycosis Fungoides and Sézary Syndrome. *Curr Oncol Rep*. 2018;20(4):32.
337. Knobler R, Berlin G, Calzavara-Pinton P, Greinix H, Jaksch P, Laroche L, et al. Guidelines on the use of extracorporeal photopheresis. *J Eur Acad Dermatol Venereol*. 2014;28 Suppl 1(Suppl 1):1-37.
338. Baron MK, Osborn JD, Tao R, Lee CJ. Haploidentical hematopoietic cell transplantation for mycosis fungoides/Sezary syndrome. *Leuk Lymphoma*. 2020;61(1):231-3.
339. Cudillo L, Cerretti R, Picardi A, Mariotti B, De Angelis G, Cantonetti M, et al. Allogeneic hematopoietic stem cell transplantation in Primary Cutaneous T Cell Lymphoma. *Ann Hematol*. 2018;97(6):1041-8.
340. Johnson WT, Mukherji R, Kartan S, Nikbakht N, Porcu P, Alpdogan O. Allogeneic hematopoietic stem cell transplantation in advanced stage mycosis fungoides and Sézary syndrome: a concise review. *Chin Clin Oncol*. 2019;8(1):12.
341. Dudley JT, Listgarten J, Stegle O, Brenner SE, Parts L. Personalized medicine: from genotypes, molecular phenotypes and the quantified self, towards improved medicine. *Pac Symp Biocomput*. 2015:342-6.
342. Lipinski KA, Barber LJ, Davies MN, Ashenden M, Sottoriva A, Gerlinger M. Cancer Evolution and the Limits of Predictability in Precision Cancer Medicine. *Trends Cancer*. 2016;2(1):49-63.
343. Parsa SF, Vafajoo A, Rostami A, Salarian R, Rabiee M, Rabiee N, et al. Early diagnosis of disease using microbead array technology: A review. *Anal Chim Acta*. 2018;1032:1-17.
344. Agostinelli C, Rizvi H, Paterson J, Shende V, Akarca AU, Agostini E, et al. Intracellular TCR-signaling pathway: novel markers for lymphoma diagnosis and potential therapeutic targets. *Am J Surg Pathol*. 2014;38(10):1349-59.
345. Mao X, Lillington D, Scarisbrick JJ, Mitchell T, Czepulkowski B, Russell-Jones R, et al. Molecular cytogenetic analysis of cutaneous T-cell lymphomas: identification of common genetic alterations in Sézary syndrome and mycosis fungoides. *Br J Dermatol*. 2002;147(3):464-75.
346. Salgado R, Servitje O, Gallardo F, Vermeer MH, Ortiz-Romero PL, Karpova MB, et al. Oligonucleotide array-CGH identifies genomic subgroups and prognostic markers for tumor stage mycosis fungoides. *J Invest Dermatol*. 2010;130(4):1126-35.
347. Iżykowska K, Przybylski GK. Genetic alterations in Sezary syndrome. *Leuk Lymphoma*. 2011;52(5):745-53.
348. Rallis E, Economidi A, Verros C, Papadakis P. Successful treatment of patch type mycosis fungoides with tacrolimus ointment 0.1%. *J Drugs Dermatol*. 2006;5(9):906-7.

349. Hung JH, Weng Z. Analysis of Microarray and RNA-seq Expression Profiling Data. *Cold Spring Harb Protoc.* 2017;2017(3).
350. Fan J, Niu Y. Selection and validation of normalization methods for c-DNA microarrays using within-array replications. *Bioinformatics.* 2007;23(18):2391-8.
351. Staunton JE, Slonim DK, Collier HA, Tamayo P, Angelo MJ, Park J, et al. Chemosensitivity prediction by transcriptional profiling. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001;98(19):10787-92.
352. Alizadeh AA, Eisen MB, Davis RE, Ma C, Lossos IS, Rosenwald A, et al. Distinct types of diffuse large B-cell lymphoma identified by gene expression profiling. *Nature.* 2000;403(6769):503-11.
353. Shipp MA, Ross KN, Tamayo P, Weng AP, Kutok JL, Aguiar RC, et al. Diffuse large B-cell lymphoma outcome prediction by gene-expression profiling and supervised machine learning. *Nat Med.* 2002;8(1):68-74.
354. Li S, Ross DT, Kadin ME, Brown PO, Wasik MA. Comparative genome-scale analysis of gene expression profiles in T cell lymphoma cells during malignant progression using a complementary DNA microarray. *Am J Pathol.* 2001;158(4):1231-7.
355. Strom SP. Fundamentals of RNA Analysis on Biobanked Specimens. *Methods Mol Biol.* 2019;1897:345-57.
356. Jaksik R, Iwanaszko M, Rzeszowska-Wolny J, Kimmel M. Microarray experiments and factors which affect their reliability. *Biol Direct.* 2015;10:46.
357. Rando O. Amplification of RNA for Microarrays. *Cold Spring Harb Protoc.* 2019;2019(7).
358. Kelz MB, Dent GW, Therianos S, Marciano PG, McIntosh TK, Coleman PD, et al. Single-cell antisense RNA amplification and microarray analysis as a tool for studying neurological degeneration and restoration. *Sci Aging Knowledge Environ.* 2002;2002(1):re1.
359. Van Gelder RN, von Zastrow ME, Yool A, Dement WC, Barchas JD, Eberwine JH. Amplified RNA synthesized from limited quantities of heterogeneous cDNA. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1990;87(5):1663-7.
360. Wessagowit V, South AP. Dermatological applications of DNA array technology. *Clin Exp Dermatol.* 2002;27(6):485-92.
361. Marzancola MG, Sedighi A, Li PC. DNA Microarray-Based Diagnostics. *Methods Mol Biol.* 2016;1368:161-78.
362. Li W. Volcano plots in analyzing differential expressions with mRNA microarrays. *J Bioinform Comput Biol.* 2012;10(6):1231003.
363. Reis PP, Waldron L, Goswami RS, Xu W, Xuan Y, Perez-Ordóñez B, et al. mRNA transcript quantification in archival samples using multiplexed, color-coded probes. *BMC Biotechnol.* 2011;11:46.
364. von Ahlfen S, Missel A, Bendrat K, Schlumpberger M. Determinants of RNA quality from FFPE samples. *PLoS One.* 2007;2(12):e1261.
365. Macerola E, Poma AM, Basolo F. NanoString in the screening of genetic abnormalities associated with thyroid cancer. *Semin Cancer Biol.* 2020.
366. Chen L, Engel BE, Welsh EA, Yoder SJ, Brantley SG, Chen DT, et al. A Sensitive NanoString-Based Assay to Score STK11 (LKB1) Pathway Disruption in Lung Adenocarcinoma. *J Thorac Oncol.* 2016;11(6):838-49.
367. Smyth GK, Speed T. Normalization of cDNA microarray data. *Methods.* 2003;31(4):265-73.

368. Larriba Y, Rueda C, Fernández MA, Peddada SD. Microarray Data Normalization and Robust Detection of Rhythmic Features. *Methods Mol Biol.* 2019;1986:207-25.
369. Wolfinger RD, Gibson G, Wolfinger ED, Bennett L, Hamadeh H, Bushel P, et al. Assessing gene significance from cDNA microarray expression data via mixed models. *J Comput Biol.* 2001;8(6):625-37.
370. Bolstad BM, Irizarry RA, Astrand M, Speed TP. A comparison of normalization methods for high density oligonucleotide array data based on variance and bias. *Bioinformatics.* 2003;19(2):185-93.
371. Durbin BP, Hardin JS, Hawkins DM, Rocke DM. A variance-stabilizing transformation for gene-expression microarray data. *Bioinformatics.* 2002;18 Suppl 1:S105-10.
372. Durbin BP, Rocke DM. Variance-stabilizing transformations for two-color microarrays. *Bioinformatics.* 2004;20(5):660-7.
373. Wang K, Wang W, Li M. A brief procedure for big data analysis of gene expression. *Animal Model Exp Med.* 2018;1(3):189-93.
374. Gonzalo Sanz R, Sánchez-Pla A. Statistical Analysis of Microarray Data. *Methods Mol Biol.* 2019;1986:87-121.
375. Irizarry RA, Hobbs B, Collin F, Beazer-Barclay YD, Antonellis KJ, Scherf U, et al. Exploration, normalization, and summaries of high density oligonucleotide array probe level data. *Biostatistics.* 2003;4(2):249-64.
376. Cordero F, Botta M, Calogero RA. Microarray data analysis and mining approaches. *Brief Funct Genomic Proteomic.* 2007;6(4):265-81.
377. Mantione KJ, Kream RM, Kuzelova H, Ptacek R, Raboch J, Samuel JM, et al. Comparing bioinformatic gene expression profiling methods: microarray and RNA-Seq. *Med Sci Monit Basic Res.* 2014;20:138-42.
378. Dembélé D, Kastner P. Fold change rank ordering statistics: a new method for detecting differentially expressed genes. *BMC Bioinformatics.* 2014;15:14.
379. Cui X, Churchill GA. Statistical tests for differential expression in cDNA microarray experiments. *Genome Biol.* 2003;4(4):210.
380. Li W, Freudenberg J, Suh YJ, Yang Y. Using volcano plots and regularized-chi statistics in genetic association studies. *Comput Biol Chem.* 2014;48:77-83.
381. Pearson TA, Manolio TA. How to interpret a genome-wide association study. *Jama.* 2008;299(11):1335-44.
382. Glueck DH, Muller KE, Karimpour-Fard A, Hunter L. Expected Power for the False Discovery Rate with Independence. *Commun Stat Theory Methods.* 2008;37(12):1855-66.
383. Guo L, Lu Z. Global expression analysis of miRNA gene cluster and family based on isomiRs from deep sequencing data. *Comput Biol Chem.* 2010;34(3):165-71.
384. Garge NR, Page GP, Sprague AP, Gorman BS, Allison DB. Reproducible clusters from microarray research: whither? *BMC Bioinformatics.* 2005;6 Suppl 2(Suppl 2):S10.
385. Hung JH, Weng Z. Analyzing Microarray Data. *Cold Spring Harb Protoc.* 2017;2017(3).
386. Subramanian A, Tamayo P, Mootha VK, Mukherjee S, Ebert BL, Gillette MA, et al. Gene set enrichment analysis: a knowledge-based approach for interpreting genome-wide expression profiles. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005;102(43):15545-50.

387. Hitzemann R, Bottomly D, Darakjian P, Walter N, Iancu O, Searles R, et al. Genes, behavior and next-generation RNA sequencing. *Genes Brain Behav.* 2013;12(1):1-12.
388. Ashburner M, Ball CA, Blake JA, Botstein D, Butler H, Cherry JM, et al. Gene ontology: tool for the unification of biology. The Gene Ontology Consortium. *Nat Genet.* 2000;25(1):25-9.
389. Kanehisa M, Goto S, Furumichi M, Tanabe M, Hirakawa M. KEGG for representation and analysis of molecular networks involving diseases and drugs. *Nucleic Acids Res.* 2010;38(Database issue):D355-60.
390. Tracey L, Villuendas R, Ortiz P, Dopazo A, Spiteri I, Lombardia L, et al. Identification of genes involved in resistance to interferon-alpha in cutaneous T-cell lymphoma. *Am J Pathol.* 2002;161(5):1825-37.
391. Tracey L, Villuendas R, Dotor AM, Spiteri I, Ortiz P, Garcia JF, et al. Mycosis fungoides shows concurrent deregulation of multiple genes involved in the TNF signaling pathway: an expression profile study. *Blood.* 2003;102(3):1042-50.
392. Desai M, Liu S, Parker S. Clinical characteristics, prognostic factors, and survival of 393 patients with mycosis fungoides and Sézary syndrome in the southeastern United States: a single-institution cohort. *J Am Acad Dermatol.* 2015;72(2):276-85.
393. Xiao MZX, Hennessey D, Iyer A, O'Keefe S, Zhang F, Sivanand A, et al. Transcriptomic changes during stage progression of mycosis fungoides. *Br J Dermatol.* 2022;186(3):520-31.
394. Dulmage BO, Geskin LJ. Lessons learned from gene expression profiling of cutaneous T-cell lymphoma. *Br J Dermatol.* 2013;169(6):1188-97.
395. Berger EA, Murphy PM, Farber JM. Chemokine receptors as HIV-1 coreceptors: roles in viral entry, tropism, and disease. *Annu Rev Immunol.* 1999;17:657-700.
396. Phillips RJ, Mestas J, Gharaee-Kermani M, Burdick MD, Sica A, Belperio JA, et al. Epidermal growth factor and hypoxia-induced expression of CXC chemokine receptor 4 on non-small cell lung cancer cells is regulated by the phosphatidylinositol 3-kinase/PTEN/AKT/mammalian target of rapamycin signaling pathway and activation of hypoxia inducible factor-1alpha. *J Biol Chem.* 2005;280(23):22473-81.
397. Han Y, He T, Huang DR, Pardo CA, Ransohoff RM. TNF-alpha mediates SDF-1 alpha-induced NF-kappa B activation and cytotoxic effects in primary astrocytes. *J Clin Invest.* 2001;108(3):425-35.
398. Kukreja P, Abdel-Mageed AB, Mondal D, Liu K, Agrawal KC. Up-regulation of CXCR4 expression in PC-3 cells by stromal-derived factor-1alpha (CXCL12) increases endothelial adhesion and transendothelial migration: role of MEK/ERK signaling pathway-dependent NF-kappaB activation. *Cancer Res.* 2005;65(21):9891-8.
399. Vila-Coro AJ, Rodríguez-Frade JM, Martín De Ana A, Moreno-Ortíz MC, Martínez AC, Mellado M. The chemokine SDF-1alpha triggers CXCR4 receptor dimerization and activates the JAK/STAT pathway. *Faseb j.* 1999;13(13):1699-710.
400. Peng SB, Peek V, Zhai Y, Paul DC, Lou Q, Xia X, et al. Akt activation, but not extracellular signal-regulated kinase activation, is required for SDF-1alpha/CXCR4-mediated migration of epitheloid carcinoma cells. *Mol Cancer Res.* 2005;3(4):227-36.

401. Ramsey DM, McAlpine SR. Halting metastasis through CXCR4 inhibition. *Bioorg Med Chem Lett*. 2013;23(1):20-5.
402. Sun X, Wei L, Chen Q, Terek RM. CXCR4/SDF1 mediate hypoxia induced chondrosarcoma cell invasion through ERK signaling and increased MMP1 expression. *Mol Cancer*. 2010;9:17.
403. Eck SM, Blackburn JS, Schmucker AC, Burrage PS, Brinckerhoff CE. Matrix metalloproteinase and G protein coupled receptors: co-conspirators in the pathogenesis of autoimmune disease and cancer. *J Autoimmun*. 2009;33(3-4):214-21.
404. Orimo A, Weinberg RA. Stromal fibroblasts in cancer: a novel tumor-promoting cell type. *Cell Cycle*. 2006;5(15):1597-601.
405. Zhao H, Guo L, Zhao H, Zhao J, Weng H, Zhao B. CXCR4 over-expression and survival in cancer: a system review and meta-analysis. *Oncotarget*. 2015;6(7):5022-40.
406. Konoplev S, Rassidakis GZ, Estey E, Kantarjian H, Liakou CI, Huang X, et al. Overexpression of CXCR4 predicts adverse overall and event-free survival in patients with unmutated FLT3 acute myeloid leukemia with normal karyotype. *Cancer*. 2007;109(6):1152-6.
407. Parker CC, Kim RH, Li BD, Chu QD. The chemokine receptor CXCR4 as a novel independent prognostic marker for node-positive breast cancer patients. *J Surg Oncol*. 2012;106(4):393-8.
408. D'Alterio C, Consales C, Polimeno M, Franco R, Cindolo L, Portella L, et al. Concomitant CXCR4 and CXCR7 expression predicts poor prognosis in renal cancer. *Curr Cancer Drug Targets*. 2010;10(7):772-81.
409. Yopp AC, Shia J, Butte JM, Allen PJ, Fong Y, Jarnagin WR, et al. CXCR4 expression predicts patient outcome and recurrence patterns after hepatic resection for colorectal liver metastases. *Ann Surg Oncol*. 2012;19 Suppl 3:S339-46.
410. Soldevila G, Licona I, Salgado A, Ramírez M, Chávez R, García-Zepeda E. Impaired chemokine-induced migration during T-cell development in the absence of Jak 3. *Immunology*. 2004;112(2):191-200.
411. Tamura M, Sato MM, Nashimoto M. Regulation of CXCL12 expression by canonical Wnt signaling in bone marrow stromal cells. *Int J Biochem Cell Biol*. 2011;43(5):760-7.
412. Chinni SR, Yamamoto H, Dong Z, Sabbota A, Bonfil RD, Cher ML. CXCL12/CXCR4 transactivates HER2 in lipid rafts of prostate cancer cells and promotes growth of metastatic deposits in bone. *Mol Cancer Res*. 2008;6(3):446-57.
413. Ganju RK, Brubaker SA, Meyer J, Dutt P, Yang Y, Qin S, et al. The alpha-chemokine, stromal cell-derived factor-1alpha, binds to the transmembrane G-protein-coupled CXCR-4 receptor and activates multiple signal transduction pathways. *J Biol Chem*. 1998;273(36):23169-75.
414. Mortier A, Gouwy M, Van Damme J, Proost P, Struyf S. CD26/dipeptidylpeptidase IV-chemokine interactions: double-edged regulation of inflammation and tumor biology. *J Leukoc Biol*. 2016;99(6):955-69.
415. Yang F, Takagaki Y, Yoshitomi Y, Ikeda T, Li J, Kitada M, et al. Inhibition of Dipeptidyl Peptidase-4 Accelerates Epithelial-Mesenchymal Transition and Breast Cancer Metastasis via the CXCL12/CXCR4/mTOR Axis. *Cancer Res*. 2019;79(4):735-46.

416. Chitadze G, Wehkamp U, Janssen O, Brüggemann M, Lettau M. The Serine Protease CD26/DPP4 in Non-Transformed and Malignant T Cells. *Cancers (Basel)*. 2021;13(23).
417. Vandersee S, Humme D, Terhorst D, Almohamad A, Möbs M, Beyer M. Evaluation of blood parameters for the monitoring of erythrodermic cutaneous T-cell lymphoma. *J Dtsch Dermatol Ges*. 2015;13(1):30-6.
418. Fasolo A, Sessa C. Current and future directions in mammalian target of rapamycin inhibitors development. *Expert Opin Investig Drugs*. 2011;20(3):381-94.
419. Sridharan S, Basu A. Distinct Roles of mTOR Targets S6K1 and S6K2 in Breast Cancer. *Int J Mol Sci*. 2020;21(4).
420. Wang P, Zhang Q, Tan L, Xu Y, Xie X, Zhao Y. The Regulatory Effects of mTOR Complexes in the Differentiation and Function of CD4(+) T Cell Subsets. *J Immunol Res*. 2020;2020:3406032.
421. Brunet A, Bonni A, Zigmond MJ, Lin MZ, Juo P, Hu LS, et al. Akt promotes cell survival by phosphorylating and inhibiting a Forkhead transcription factor. *Cell*. 1999;96(6):857-68.
422. Zhang M, Zhang X. The role of PI3K/AKT/FOXO signaling in psoriasis. *Arch Dermatol Res*. 2019;311(2):83-91.
423. Liang J, Slingerland JM. Multiple roles of the PI3K/PKB (Akt) pathway in cell cycle progression. *Cell Cycle*. 2003;2(4):339-45.
424. Peng L, Chen Z, Chen Y, Wang X, Tang N. MIR155HG is a prognostic biomarker and associated with immune infiltration and immune checkpoint molecules expression in multiple cancers. *Cancer Med*. 2019;8(17):7161-73.
425. Tam W. Identification and characterization of human BIC, a gene on chromosome 21 that encodes a noncoding RNA. *Gene*. 2001;274(1-2):157-67.
426. Kopp KL, Ralfkiaer U, Nielsen BS, Gniadecki R, Woetmann A, Ødum N, et al. Expression of miR-155 and miR-126 in situ in cutaneous T-cell lymphoma. *Apmis*. 2013;121(11):1020-4.
427. Moyal L, Barzilai A, Gorovitz B, Hirshberg A, Amariglio N, Jacob-Hirsch J, et al. miR-155 is involved in tumor progression of mycosis fungoides. *Exp Dermatol*. 2013;22(6):431-3.
428. Seto AG, Beatty X, Lynch JM, Hermreck M, Tetzlaff M, Duvic M, et al. Cobomarsen, an oligonucleotide inhibitor of miR-155, co-ordinately regulates multiple survival pathways to reduce cellular proliferation and survival in cutaneous T-cell lymphoma. *Br J Haematol*. 2018;183(3):428-44.
429. Rasmussen TK, Andersen T, Bak RO, Yiu G, Sørensen CM, Stengaard-Pedersen K, et al. Overexpression of microRNA-155 increases IL-21 mediated STAT3 signaling and IL-21 production in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Res Ther*. 2015;17(1):154.
430. Huang X, Shen Y, Liu M, Bi C, Jiang C, Iqbal J, et al. Quantitative proteomics reveals that miR-155 regulates the PI3K-AKT pathway in diffuse large B-cell lymphoma. *Am J Pathol*. 2012;181(1):26-33.
431. Ma X, Becker Buscaglia LE, Barker JR, Li Y. MicroRNAs in NF-kappaB signaling. *J Mol Cell Biol*. 2011;3(3):159-66.
432. Hales EC, Taub JW, Matherly LH. New insights into Notch1 regulation of the PI3K-AKT-mTOR1 signaling axis: targeted therapy of γ -secretase inhibitor resistant T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Cell Signal*. 2014;26(1):149-61.

433. Kohlhaas V, Blakemore SJ, Al-Maarri M, Nickel N, Pal M, Roth A, et al. Active Akt signaling triggers CLL toward Richter transformation via overactivation of Notch1. *Blood*. 2021;137(5):646-60.
434. Gu Y, Zhang J, Ma X, Kim BW, Wang H, Li J, et al. Stabilization of the c-Myc Protein by CAMKII γ Promotes T Cell Lymphoma. *Cancer Cell*. 2017;32(1):115-28.e7.
435. Kari L, Loboda A, Nebozhyn M, Rook AH, Vonderheid EC, Nichols C, et al. Classification and prediction of survival in patients with the leukemic phase of cutaneous T cell lymphoma. *J Exp Med*. 2003;197(11):1477-88.
436. Meyer N, Peyret-Lacombe A, Canguilhem B, Médale-Giamarchi C, Mamouni K, Cristini A, et al. RhoB promotes cancer initiation by protecting keratinocytes from UVB-induced apoptosis but limits tumor aggressiveness. *J Invest Dermatol*. 2014;134(1):203-12.
437. Palacios EH, Weiss A. Function of the Src-family kinases, Lck and Fyn, in T-cell development and activation. *Oncogene*. 2004;23(48):7990-8000.
438. Moon CS, Reglero C, Cortes JR, Quinn SA, Alvarez S, Zhao J, et al. FYN-TRAF3IP2 induces NF- κ B signaling-driven peripheral T cell lymphoma. *Nat Cancer*. 2021;2(1):98-113.
439. Shou J, Yu C, Zhang D, Zhang Q. Overexpression of Citron Rho-Interacting Serine/Threonine Kinase Associated with Poor Outcome in Bladder Cancer. *J Cancer*. 2020;11(14):4173-80.
440. Cong L, Bai Z, Du Y, Cheng Y. Citron Rho-Interacting Serine/Threonine Kinase Promotes HIF1 α -CypA Signaling and Growth of Human Pancreatic Adenocarcinoma. *Biomed Res Int*. 2020;2020:9210891.
441. Sahin I, Kawano Y, Sklavenitis-Pistofidis R, Moschetta M, Mishima Y, Manier S, et al. Citron Rho-interacting kinase silencing causes cytokinesis failure and reduces tumor growth in multiple myeloma. *Blood Adv*. 2019;3(7):995-1002.
442. Xu B, Liu F, Gao Y, Sun J, Li Y, Lin Y, et al. High Expression of IKZF2 in Malignant T Cells Promotes Disease Progression in Cutaneous T Cell Lymphoma. *Acta Derm Venereol*. 2021;101(12):adv00613.
443. Vonderheid EC, Thompson R, Smiles KA, Lattanand A. Recombinant interferon alfa-2b in plaque-phase mycosis fungoides. Intralesional and low-dose intramuscular therapy. *Arch Dermatol*. 1987;123(6):757-63.
444. Wolff JM, Zitelli JA, Rabin BS, Smiles KA, Abell E. Intralesional interferon in the treatment of early mycosis fungoides. *J Am Acad Dermatol*. 1985;13(4):604-12.
445. Mitchell TJ, John S. Signal transducer and activator of transcription (STAT) signalling and T-cell lymphomas. *Immunology*. 2005;114(3):301-12.
446. Kim BS, Nishikii H, Baker J, Pierini A, Schneidawind D, Pan Y, et al. Treatment with agonistic DR3 antibody results in expansion of donor Tregs and reduced graft-versus-host disease. *Blood*. 2015;126(4):546-57.
447. O'Leary NA, Wright MW, Brister JR, Ciufu S, Haddad D, McVeigh R, et al. Reference sequence (RefSeq) database at NCBI: current status, taxonomic expansion, and functional annotation. *Nucleic Acids Res*. 2016;44(D1):D733-45.
448. Geskin LJ, Akilov OE, Kwon S, Schowalter M, Watkins S, Whiteside TL, et al. Therapeutic reduction of cell-mediated immunosuppression in mycosis fungoides and Sézary syndrome. *Cancer Immunol Immunother*. 2018;67(3):423-34.
449. Andrzejewska A, Dabrowska S, Nowak B, Walczak P, Lukomska B, Janowski M. Mesenchymal stem cells injected into carotid artery to target focal brain injury home to perivascular space. *Theranostics*. 2020;10(15):6615-28.

450. Leussink VI, Zettl UK, Jander S, Pepinsky RB, Lobb RR, Stoll G, et al. Blockade of signaling via the very late antigen (VLA-4) and its counterligand vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) causes increased T cell apoptosis in experimental autoimmune neuritis. *Acta Neuropathol.* 2002;103(2):131-6.
451. Miyazawa M, Takahashi S, Kawaguchi H, Nagatani T, Higuchi M, Matsuzaki T, et al. Low expression of adhesion molecules in a case of cutaneous T-cell lymphoma. *J Dermatol.* 1995;22(9):659-64.
452. Sanz-Rodríguez F, Teixidó J. VLA-4-dependent myeloma cell adhesion. *Leuk Lymphoma.* 2001;41(3-4):239-45.
453. Li B, Tournier C, Davis RJ, Flavell RA. Regulation of IL-4 expression by the transcription factor JunB during T helper cell differentiation. *Embo j.* 1999;18(2):420-32.
454. Piechaczyk M, Farràs R. Regulation and function of JunB in cell proliferation. *Biochem Soc Trans.* 2008;36(Pt 5):864-7.
455. Ohuchi K, Fujimura T, Kambayashi Y, Amagai R, Lyu C, Tanita K, et al. Successful treatment of mogamulizumab-resistant mycosis fungoides with mogamulizumab plus etoposide combined therapy: Investigation of the immunomodulatory effects of etoposide on the tumor microenvironment. *Dermatol Ther.* 2020;33(4):e13487.
456. Lu D, Duvic M, Medeiros LJ, Luthra R, Dorfman DM, Jones D. The T-cell chemokine receptor CXCR3 is expressed highly in low-grade mycosis fungoides. *Am J Clin Pathol.* 2001;115(3):413-21.
457. Kaewpreedee P, Boonrat P, Tansiri Y, Rowland-Jones SL, Hansasuta P. Dimorphism in the T-cell receptor constant region affects T-cell function, phenotype and HIV outcome. *Aids.* 2019;33(9):1421-9.
458. Marks E, Wang Y, Shi Y, Susa J, Jacobson M, Goldstein DY. Specific TCR gene rearrangements in mycosis fungoides: does advanced clinical stage show a preference? *J Clin Pathol.* 2018;71(12):1072-7.
459. Rubio AJ, Porter T, Zhong X. Duality of B Cell-CXCL13 Axis in Tumor Immunology. *Front Immunol.* 2020;11:521110.
460. Akatsuka T, Miyagaki T, Nakajima R, Kamijo H, Oka T, Takahashi N, et al. Decreased IL-10-producing regulatory B cells in patients with advanced mycosis fungoides. *Eur J Dermatol.* 2018;28(3):314-9.
461. Zheng J, van de Veerdonk FL, Crossland KL, Smeekens SP, Chan CM, Al Shehri T, et al. Gain-of-function STAT1 mutations impair STAT3 activity in patients with chronic mucocutaneous candidiasis (CMC). *Eur J Immunol.* 2015;45(10):2834-46.
462. Ivanov II, McKenzie BS, Zhou L, Tadokoro CE, Lepelley A, Lafaille JJ, et al. The orphan nuclear receptor ROR γ directs the differentiation program of proinflammatory IL-17⁺ T helper cells. *Cell.* 2006;126(6):1121-33.
463. Krejsgaard T, Litvinov IV, Wang Y, Xia L, Willerslev-Olsen A, Koralov SB, et al. Elucidating the role of interleukin-17F in cutaneous T-cell lymphoma. *Blood.* 2013;122(6):943-50.

ANEXOS

ANEXOS

Anexo I

Lista completa de los 4982 genes estudiados en el microarray del CNIO.

1700108N1	ADK	ANXA10	ARPC1A	BAAT	BNIP3	C1QDC1	CASP5
8Rik	ADSL	ANXA2	ARPC1B	BACH	BNIP3L	C1QG	CASP7
1810060K0	AFAP	ANXA3	ARPC2	BAD	BOK	C2	CASP8
7Rik	AFG3L2	ANXA4	ARPC3	BAF53A	BPAG1	C20orf111	CASP8AP2
2410015J1	AFM	ANXA5	ARPC5	BAG1	BPGM	C20orf17	CASP9
5Rik	AFTIPHIL1	ANXA6	ARPC5L	BAG2	BRCA1	C20orf186	CAST
54TM	N	ANXA7	ARR3	BAG3	BRD3	C20orf35	CAV1
76P	AGC1	ANXA8	ARRB1	BAG4	BRD8	C20orf4	CAV2
A2M	AGMAT	ANX9	ARTS-1	BAG5	BRDG1	C21orf25	CBFA2T2
A4GALT	AGPAT2	AP1M1	ASB6	BAGE	BRE	C21orf4	CBFA2T3
AADAT	AGPAT3	AP3M1	ASC	BAI1	BRIX	C21orf70	CBFB
AASDHPPT	AGPAT4	AP3M2	ASCC1	BAI2	BSCL2	C2orf17	CBL
AATF	AGRN	AP3S1	ASH1L	BAIAP1	BST1	C2orf7	CBLB
ABCA1	AGT	AP4M1	ASH2L	BAIAP2	BST2	C3F	CBLC
ABCB1	AGTR1	APAF1	ASPN	BAK1	BTAF1	C3orf10	CCBL1
ABCB6	AGTRAP	APC	ASS	BAP1	BTF3	C5	CCBP2
ABCC1	AGTRL1	APEX1	ASTN	BARX2	BTG1	C6orf103	CCDC5
ABCC2	AHCY	APG-1	ASTN2	BBC3	BTG3	C6orf108	CCDC6
ABCC5	AHR	APG5L	ASXL1	BC008967	BTK	C6orf115	CCL1
ABCC6	AI429215	APG7L	ATAD1	BCAA	BTRC	C6orf128	CCL11
ABCC8	AI447372	API5	ATF1	BCAR1	BUB1	C6orf133	CCL13
ABCC9	AIB3	APLN	ATF2	BCAR3	BUB3	C6orf134	CCL15
ABCD1	AIM1	APLP2	ATF3	BCAS2	BUP	C6orf33	CCL16
ABCF2	AIM2	APM2	ATF4	BCCIP	C10orf104	C6orf5	CCL19
ABCG1	AIP1	APOC1	ATF5	BCKDHA	C10orf11	C6orf63	CCL2
ABCG8	AK1	APOD	ATF6	BCL10	C10orf116	C6orf67	CCL20
ABHD2	AK2	APOE	ATF7	BCL11A	C10orf117	C6orf69	CCL23
ABI2	AK3	APOL3	ATM	BCL2	C10orf119	C7	CCL26
ABL1	AK3L2	APP	ATP10A	BCL2A1	C10orf3	C7orf20	CCL3
ABLIM1	AKAP13	APR3-	ATP10B	BCL2L1	C10orf35	C9orf102	CCL3L1
ABS	AKAP3	APRT	ATP11A	BCL2L11	C10orf4	C9orf114	CCL7
ACADM	AKAP9	ARAF1	ATP1A2	BCL2L2	C10orf42	C9orf12	CCL8
ACADVL	AKL3L	AREG	ATP1A3	BCL3	C10orf69	C9orf125	CCNA1
ACAS2	AKR7A2	ARF1	ATP1B1	BCL6	C10orf70	C9orf140	CCNA2
ACE	AKT3	ARF4L	ATP1B2	BCL7A	C11orf10	C9orf150	CCNB1
ACO1	ALAD	ARF6	ATP2A1	BCL7B	C11orf15	C9orf154	CCNB2
ACOX1	ALAS1	ARFD1	ATP2A2	BCR	C11orf30	C9orf16	CCNC
ACSL3	ALCAM	ARFGAP1	ATP2B3	BDKRB1	C11ORF4	C9orf28	CCND1
ACSL4	ALDH1A2	ARFGEF2	ATP2C1	BDKRB2	C11orf5	C9orf3	CCND2
ACTA1	ALDH1A3	ARG1	ATP5A1	BFAR	C11orf9	C9orf5	CCND3
ACTA2	ALDH1B1	ARGBP2	ATP5C1	BHLHB2	C12orf10	C9orf52	CCNE1
ACTC	ALDH3A1	ARHB	ATP5G2	BICD2	C13orf10	C9orf55	CCNE2
ACTL7A	ALDH3A2	ARHE	ATP5J2	BID	C14orf10	C9orf58	CCNF
ACTL7B	ALDH3B2	ARHGAP1	ATP5L	BIK	C14orf103	C9orf72	CCNG2
ACTN1	ALDH5A1	ARHGAP25	ATP5L2	BIRC1	C14orf104	C9orf74	CCNH
ACTN2	ALDH8A1	ARHGAP5	ATP6V0A1	BIRC2	C14orf123	C9orf78	CCNI
ACTN3	ALDOA	ARHGAP6	ATP6V0C	BIRC3	C14orf130	C9orf80	CCNL1
ACTN4	ALDOB	ARHGAP8	ATP6V0D1	BIRC4	C14orf137	C9orf9	CCNL2
ACTR1A	ALDOC	ARHGDI	ATP6V1A	BIRC5	C14orf142	C9orf93	CCNT1
ACTR1B	ALEX2	ARHGDIG	ATP6V1B1	BIRC6	C14orf166	C9orf94	CCNT2
ACTR3	ALG8	ARHGEF1	ATP6V1B2	BK1191B2.	C14orf2	C9orf96	CCR1
ACTR8	ALP	ARHGEF16	ATP6V1F	3.1	C14orf24	CA6	CCR2
ACVR1	ALPL	ARHGEF2	ATP6V1G1	BLCAP	C14orf27	CA9	CCR5
ACVRL1	AMACR	ARHGEF4	ATP7A	BLM	C14orf29	Cab45	CCR7
AD023	AMFR	ARHGEF5	ATP7B	BLVRB	C14orf45	CACNA2D2	CCR9
AD036	AMHR2	ARHGEF6	ATP8A1	BLZF1	C14orf87	CAMSAP1	CCRK
AD158	AMOTL1	ARHI	ATP8A2	BMI1	C16orf3	CAMTA1	CCRL1
ADA	AMPD3	ARHN	ATP9A	BMP1	C16orf44	CANP	CCRL2
ADAM17	AMY	ARID1A	ATP9B	BMP2	C17	CAPN1	CCS
ADAM9	ANGPT1	ARID4A	AURKC	BMP4	C18orf1	CAPN12	CCT2
ADAMTS7	ANGPTL2	ARID4B	AUTL1	BMP5	C19orf12	CAPNS2	CCT4
ADCY7	ANGPTL3	ARID5B	AVIL	BMP6	C19orf2	CAPON	CCT5
ADD1	ANK3	ARIH1	AXIN1	BMP7	C19orf28	CAPZA1	CCT6A
ADD3	ANKRD1	ARL2BP	AXIN2	BMPR1A	C19orf3	CARD12	CCT7
ADE2H1	ANKRD12	ARL2	AXL	BMPR2	C1orf2	CARD4	CD14
ADF	ANKRD9	ARL3	B2M	BMSC-UbP	C1orf21	CARHSP1	CD2
ADFP	ANLN	ARL7	B3GAT3	BMX	C1orf29	CASP1	CD226
ADH1B	ANTXR1	ARNT	B4GALT5	BNIP1	C1orf38	CASP10	CD33
ADIPOR1	ANXA1	ARP3BETA	BAALC	BNIP2	C1QA	CASP3	CD36

CD3G	CGB5	COL5A1	CTNNBIP1	DCL-1	DKFZP586	DustyPK	EN01
CD4	CGI-01	COL5A2	CTNND1	DCTD	G1722	DUT	EN02
CD5	CGI-119	COL6A3	CTNND2	DC-TM4F2	DKFZp586I	DVL2	EN03
CD53	CGI-141	COL8A2	CTPS	DCTN4	021	DVL3	ENPP2
CD6	CGI-44	COL9A2	CTSB	DCTN6	DKFZP586J	DVS27	ENTPD1
CD63	CGI-63	COMMD3	CTSD	DDB1	1624	DZIP3	ENTPD3
CD69	CGI-69	COMMD6	CTSH	DDIT3	DKFZP586	DYT1	ENTPD5
CD74	CGI-85	COPB2	CTSK	DDX20	K0717	E2F1	ENTPD6
CD84	CGI-94	COPEB	CTSL	DDX23	DKFZP586	E2F2	ENTPD7
CDA	CGRRF1	COPG2	CTSL2	DDX31	P0123	E2F3	EP400
CDA02	CH25H	COQ4	CTSO	DDX3X	DKFZp686	E2F4	EPAS1
CDA08	CHAF1B	COR01A	CTSS	DDX41	P0288	E2F5	EPB41
CDC10	CHC1	COR01C	CUGBP1	DDX51	DKFZp727	E2F6	EPB41L1
CDC14A	CHC1L	COR02A	CUL2	DDX6	A071	E2IG4	EPB41L3
CDC14B	CHCHD2	COR02B	CUL3	DDXL	DKFZp761	E46L	EPB41L4B
CDC16	CHCHD6	CORT	CUL4A	DED	A132	EBAF	EPHA1
CDC2	CHD1	COVA1	CUL4B	DEDD	DKFZp761	EBI2	EPHB2
CDC20	CHD2	COX10	CWF19L2	DEK	B128	EBI3	EPHB3
CDC23	CHD3	COX11	CX3CR1	DELGEF	DKFZP761	ECE1	EPHB4
CDC25A	CHD4	COX15	CX40.1	DFFB	D0211	ECM1	EPO
CDC25C	CHEK1	COX17	CXCL1	DGAT2	DKFZp761	ECM2	EPOR
CDC27	CHFR	COX6B	CXCL11	DGCR6L	D112	ECT2	EPS15
CDC2L5	CHGA	COX7A1	CXCL12	DHFR	DKFZp761F	EDG1	EPS15L1
CDC34	CHGB	COX7A2	CXCL3	DHX9	2014	EDG2	EPS8
CDC37	ChGn	COX8A	CXCL6	DICER1	DKFZP761	EDG3	EPS8L2
CDC42	CHI3L1	CPA6	CXCL9	DIO1	H1710	EDG5	ERBB3
CDC42BPA	CHKA	CPEB1	CXorf12	DIO3	DKFZP761	EDG6	ERCC1
CDC42BPB	CHL1	CPEB3	CXorf15	DIRAS2	H2024	EDN2	ERCC2
CDC45L	CHMP1.5	CPNE1	CXorf6	DIRC2	DKK3	EDN3	ERCC3
CDC5L	CHN1	CPSF2	CXX1	dj453C12.4	DLD	EDNRB	ERCC4
CDC6	CHS1	CPSF5	CXXC5	.1	DLEU1	EEF1D	ERCC5
CDC7	CHST2	CPT1A	CYB561	DJ462O23.	DLEU2	EEF2	EREG
CDCA7	CHST5	CR2	CYBB	2	DLG5	EFA6R	ERF
CDH1	CIDEA	CRADD	CYC1	DJ583P15.7	DLK1	EFEMP2	ERG
CDH10	cig5	CRAMP1L	CYCL	DKC1	DLX4	EGF	ERMAP
CDH11	CIP29	CRAT	CYCS	DKFZP434	DMAP1	EGFL3	ERO1-LB
CDH12	CIT	CREB1	CYFIP2	A1114	DMBT1	EGFL5	ESPL1
CDH15	CITED1	CREB3	CYP11A1	DKFZP434	DMTF1	EGFR	ESRRG
CDH16	CIZ1	CREB3L2	CYP11B1	A196	DNA2L	EGR1	ERP70
CDH18	CKB	CREB3L4	CYP11B2	DKFZP434	DNAI1	EGR2	ESRRA
CDH19	CKLF	CREBBP	CYP17A1	B044	DNAJA2	EHD1	EST1B
CDH2	CKLFSF7	CREBL2	CYP19	DKFZP434	DNAJA3	EHD2	ETV1
CDH3	CKS1B	CREG	CYP1A2	C0935	DNAJB1	eIF2A	ETV3
CDH4	KKS2	CRHBP	CYP1B1	DKFZP434	DNAJB2	EIF2B5	ETV4
CDH5	CL25022	CRI1	CYP24A1	C212	DNAJB5	EIF2C1	ETV6
CDH6	CLC	CRIP2	CYP26A1	DKFZP434	DNAJB6	EIF2C3	Eu-
CDH8	CLCN6	CRK	CYP27A1	D1335	DNAJC12	EIF2C4	HMTase1
CDIPT	CLCN7	CRKL	CYP27B1	DKFZp434	DNAJC13	EIF2S2	EV11
CDK10	CLDN1	CRLF1	CYP2A7	D177	DNAJC3	EIF2S3	EV12A
CDK2	CLIC2	CRLF3	CYP2B6	DKFZP434	DNAJC4	eIF3k	EVL
CDK4	CLIC3	CRNKL1	CYP2B7	H132	DNAJC6	EIF3S1	EVPL
CDK5	CLIC4	CRSP2	CYP2C9	DKFZp434L	DNAJC8	EIF3S10	EXT2
CDK6	CLIPR-59	CRSP6	CYP2E1	142	DNAL11	EIF3S2	EZFIT
CDK7	CLK1	CRSP7	CYP2J2	DKFZp451J	DNASE2	EIF3S3	F10
CDK8	CLK4	CRSP8	CYP3A3	0118	DNB5	EIF3S5	F8
CDKL2	CLMN	CRSP9	CYP3A4	DKFZp547	DNCH1	EIF3S6	FAAH
CDKL3	CLN5	CRTAM	CYP3A7	A023	DNCI2	EIF3S8	FABP3
CDKL5	CLPX	CRX	CYP46A1	DKFZP547	DNM1	EIF4A1	FADD
CDKN1A	CMAS	CRY1	CYP4A11	N043	DNM1L	EIF4A2	FADS1
CDKN1B	CMIP	CS1	CYP4B1	DKFZp564	DOC1	EIF4B	FAF1
CDKN1C	CMKLR1	CSDA	CYP4F2	B0769	DOC-1R	Eif4ebp1	FAH
CDKN2A	CML66	CSE1L	CYP4F8	DKFZP564	DOCK2	EIF4EBP2	FAIM
CDKN2B	CNK	CSF1	CYP51A1	B1023	DOCK4	EIF4G3	FAM11A
CDKN2C	CNK1	CSF1R	CYP7B1	DKFZP564	DOCK7	EIF5	FAM14B
CDR1	CNTN1	CSF2	CYP8B1	D116	DOLPP1	EIF5B	FAM36A
CDT6	CNTN3	CSF2RB	CYR61	DKFZP564	DPAGT1	ELA2A	FAM3A
CDW52	CNTN4	CSF3	D2S448	D1378	DPF2	ELAVL2	FAM8A1
CDW92	CNTN6	CSF3R	DAB2IP	DKFZP564	DPH2L2	ELAVL4	FANCA
CDYL	CNTNAP1	CSH1	DAD1	G092	DPM2	ELF1	FANCF
CEACAM1	CNTNAP2	CSNK2A1	DAP10	DKFZP564I	DPP7	ELF4	FANCG
CEACAM4	COBL1	CSPG2	DAP3	1171	DPYD	ELK1	FANCL
CEACAM6	COL11A1	CSPG6	DAPK1	DKFZP564I	DRAP1	ELK3	FANK1
CEACAM8	COL11A2	CSRP2	DAPK2	122	DRIM	ELL	FARP1
CEBPA	COL12A1	CST	DAPK3	DKFZP564	DSC1	ELMO1	FASTK
CEBPG	COL13A1	CST6	DATF1	M182	DSC2	ELN	FAT
CEBPZ	COL14A1	CSTN3	DAXX	DKFZP564	DSCAM	ELOVL1	FAT2
CENPB	COL15A1	CTBP2	DAZAP1	00463	DSCR1L2	EML1	FATJ
CENTB2	COL16A1	CTD6	DAZAP2	DKFZP564	DSG1	EML2	FAU
CENTB5	COL18A1	CTGF	DBC1	O0823	DSG2	EML4	FBI1
CEP1	COL1A2	CTH	DBCCR1	DKFZP564	DSP	EMP1	FBLN5
CEP2	COL27A1	CTHRC1	DC13	O243	DSTN	EMR1	FBP1
CEPT1	COL2A1	CTNNA1	DC2	DKFZp566	DUSP12	EMR2	FBP2
CFL1	COL3A1	CTNNA2	DCC	C0424	DUSP21	EMS1	FBX30
CFLAR	COL4A1	CTNNAL1	DCI	DKFZP586	DUSP22	ENC1	FBXL10
CGA	COL4A6	CTNNB1	DCK	B1621	DUSP4	ENG	FBXL11

FBXL2	FLJ11730	FLJ36090	GALE	GPR3	hAC6222	HLA-DRB3	Hs.114133
FBXL3A	FLJ11838	FLJ36748	GALNT12	GPR44	hAC6778	HLA-E	Hs.114718
FBXL3B	FLJ12178	FLJ36874	GALNTL2	GPR51	hAC7369	HMBS	Hs.114740
FBXL5	FLJ12442	FLJ37131	GANAB	GPX7	hAC9026	HMG2	Hs.115261
FBXL7	FLJ12517	FLJ37306	GANC	GRAF	hAC9062	HMGCL	Hs.115931
FBXL8	FLJ12529	FLJ37964	GARP	GRB14	hAC9231/T	HMGN2	Hs.116065
FBXL9	FLJ12649	FLJ38482	GARS	GRB7	EF	HMGN4	Hs.117009
FBX010	FLJ12875	FLJ38628	GAS1	GRCC9	hAC9567	HMMR	Hs.117020
FBX02	FLJ12879	FLJ38968	GAS2	GRIA3	hAC9893	HMOX1	Hs.117030
FBX022	FLJ12894	FLJ38984	GAS41	GRIM19	HACE1	HNLF	Hs.117035
FBX025	FLJ12903	FLJ39155	GAS7	GRIN3A	hAD0107	HNMT	Hs.117051
FBX029	FLJ12969	FLJ39616	GBF1	GRK5	hAD0171	HNRPF	Hs.117063
FBX032	FLJ13052	FLJ39885	GBP2	GRK6	hAD0417	HNRPH2	Hs.117064
FBX034	FLJ13096	FLJ40089	GC20	GRP58	hAD0578	HNRPL	Hs.117075
FBX04	FLJ13105	FLJ40452	GCH1	GSDML	hAD0601	HNRPR	Hs.117117
FBX05	FLJ13154	FLJ43654	GCNT1	GSN	hAD0687	HOP	Hs.117120
FBX06	FLJ13171	FLJ43855	GCS1	GSPT1	hAD0696	HOXA1	Hs.117122
FBX07	FLJ13188	FLJ44670	GDA	GSTA4	hAD0712	HOXA10	Hs.117170
FBX08	FLJ13213	FLJ90013	GDF1	GSTM2	hAD1089/	HOXA11	Hs.117249
FBX09	FLJ13220	FLJ90022	GDF11	GSTM3	RGS13	HOXA2	Hs.117259
FCHSD2	FLJ13409	FLJ90709	GDF5	GSTO1	hAD1557	HOXB13	Hs.117278
FCN1	FLJ13491	FLJ90798	GDF8	GSTP1	hAD4423	HOXB2	Hs.117864
FCN2	FLJ13855	FLNC	GDI1	GTF2A1	hAD4438	HOXB5	Hs.117869
FCN2	FLJ14007	FLT1	GDI2	GTF2A2	hAD4777	HOXB6	Hs.117880
FCN3	FLJ14009	FLT3LG	GEMIN5	GTF2B	hAD5395	HOXB7	Hs.118344
FDX1	FLJ14490	FLT4	GFAP	GTF2E2	hAD6284/C	HOXC10	Hs.118351/
FDXR	FLJ14511	FMNL3	GF11	GTF2F1	CL23	HOXC11	UBE3C
FEM1B	FLJ14529	FMOD	GF11B	GTF2H1	hAD7826	HOXC13	Hs.118356
FER	FLJ14753	FNBP1	GFPT1	GTF2H2	hAE0151	HOXC6	Hs.118358
FER1L3	FLJ14825	FNDC5	GGH	GTF2H3	hAE0305	HOXD10	Hs.118370
FEZ2	FLJ14888	FNTA	GGPS1	GTF3C2	HAGH	HOXD13	Hs.118380
FGD1	FLJ14936	FNTB	GGTL4	GTF3C4	HBA2	HOXD4	Hs.118437
FGF1	FLJ20244	FOLH1	GHITM	CTL3	HBXIP	HOXD8	Hs.118609/
FGF12	FLJ20291	FOLR1	GHR	GTPBP1	HCA127	HPCA	FLJ40252
FGF12B	FLJ20360	FOLR2	GHRH	GTPBP2	HCFC1	HPCAL4	Hs.119766
FGF13	FLJ20445	FOLR3	GIT2	GUK1	HCK	H-plk	Hs.119803
FGF14	FLJ20477	FOS	GJA1	GUSB	HCLS1	HPR	Hs.119810
FGF18	FLJ20487	FOSL1	GJA4	GYG2	HCRTR1	HPRP8BP	Hs.119813
FGF2	FLJ20530	FOSL2	GJB3	H105E3	HD	HRAS	Hs.119823
FGF20	FLJ20580	FOXA1	GJB5	H1F0	HDAC1	HRASLS3	Hs.119842
FGF3	FLJ20699	FOXG1B	GJB7	H2AFO	HDAC2	HRB2	Hs.119848/
FGF4	FLJ20716	FOXH1	GK	H2AFV	HDAC3	HRD1	TRANSCRIB
FGF5	FLJ20972	FOXJ3	GLO12	H2AFY	HDAC4	HRMT1L1	ED LOCUS
FGF7	FLJ21032	FOXK2	GLE1L	hAA1925	HDAC6	Hs.100043/	Hs.119882
FGF9	FLJ21174	FPGT	GLG1	hAA2436	HDAC8	CCDC124	Hs.119887/
FGFR1	FLJ21657	FRAP1	GLI2	hAA2558	HDCMA18P	Hs.100874/	CDK6
FGFR10P	FLJ22353	FREQ	GLI3	hAA2704/R	HDFG	ATPAF	Hs.119993/
FGFR2	FLJ22490	FRK	GLO1	PL44	HECTD1	Hs.101007	TRANSCRIB
FGFR3	FLJ22609	FRMD4	GLRX	hAA3450	HELLS	DCUN1D3	ED LOCUS
FGG	FLJ22649	FRZB	GLUD1	hAA3592	HELNSNF1	Hs.101064	Hs.119998
FGIF	FLJ22794	FSCN2	GLYAT	hAA3848	HEMGN	Hs.101539	Hs.120170/
FGR	FLJ22875	FSCN3	GMEB1	hAA4225	HERC2	Hs.101624/	TL
FHIT	FLJ22938	FTSJ1	GMPPB	hAA4333	HES2	AD036	Hs.121575
FHL1	FLJ22955	FUBP1	GMRP-1	hAA4347	HEY1	Hs.102004	Hs.121724/
FHL3	FLJ23018	FURIN	GNA13	hAA4456	HEYL	Hs.102325	IFITM10
FIGF	FLJ23027	FUSIP1	GNAI1	hAA4576/P	HFL1	Hs.102941/	Hs.121847/
FKBP1A	FLJ23129	FUT4	GNAS	TD015	HGD	AF3P21	TL
FLI1	FLJ23153	FXYD1	GNAZ	hAA5552	HGFAC	Hs.103002	Hs.121855
FLJ00002	FLJ23231	FXYD2	GNB1	hAA5735	HH114	Hs.103070	Hs.121910
FLJ10094	FLJ23360	FYB	GNB2L1	hAA5748/C	HHEX	Hs.103093	Hs.121914
FLJ10099	FLJ23451	FYN	GNB3	AMTA1	hIAN2	Hs.103277	Hs.121943
FLJ10211	FLJ23471	FZD1	GNG10	hAA6054	HIBADH	Hs.103305	Hs.122077/
FLJ10252	FLJ23476	FZD10	GNG11	hAA6426/F	HIC1	Hs.104176	TL
FLJ10276	FLJ23614	FZD2	GNG12	JX1	HIG2	Hs.104177	Hs.122133/
FLJ10315	FLJ25952	FZD3	GNG13	hAA6427	HIMAP2	Hs.104348	TL
FLJ10458	FLJ30046	FZD4	GNG2	hAA6450	HIPK3	Hs.10477	Hs.122136
FLJ10496	FLJ30058	FZD5	GNRH1	hAA6490	HIRA	Hs.105102	Hs.122138
FLJ10521	FLJ30092	FZD6	GNS	hAA6780/C	HIRIP3	Hs.105488	Hs.122408
FLJ10525	FLJ30934	FZD7	GOLGA1	CT6A	HIST1H1C	Hs.105728	Hs.12249/
FLJ10597	FLJ31031	FZD9	GOLGA4	hAA6864	HIST1H3D	Hs.107242	TL
FLJ10637	FLJ31052	G1P2	GOLPH2	hAA6919	HIST1H4B	Hs.109390	Hs.122596
FLJ10648	FLJ31295	G1P3	GOPC	hAA6990	HIST1H4F	Hs.110092	Hs.122671
FLJ10769	FLJ31300	GAB1	GOT1	hAA7519/C	HIST1H4H	Hs.113092	Hs.123119/
FLJ10856	FLJ31434	GAB3	GOT2	DC2L1	HIST1H4J	Hs.113139	MADH6
FLJ10871	FLJ31810	GABARAP	GP1BA	hAA7722	HIST2H2BE	Hs.113154	Hs.12407
FLJ10956	FLJ32096	GABPB2	GPC3	hAA7982	HIVEP1	Hs.113155	Hs.124147/
FLJ10996	FLJ32389	GABRD	GPC4	hAB2451	HIVEP2	Hs.113157/	KDM2A
FLJ11021	FLJ32440	GAD1	GPC6	hAB2791	HK1	ITGA9	Hs.124863
FLJ11164	FLJ32452	GAD2	GNPMB	hAB3939	HKE2	Hs.113160	Hs.124981
FLJ11196	FLJ33084	GADD45B	GPR107	hAB4505	HKR2	Hs.114047	Hs.125024
FLJ11218	FLJ33641	GADD45GI	GPR108	hAB9515	HKR3	Hs.114057	Hs.125527
FLJ11280	FLJ33761	P1	GPR109B	hAC0166	HLA-A	Hs.114058	Hs.125825
FLJ11305	FLJ34658	GAL	GPR153	hAC0242	HLA-DMA	Hs.114086	Hs.126881
FLJ11608	FLJ35827	GAL3ST1	GPR21	hAC2377	HLA-DMB	Hs.114122	Hs.126962/
FLJ11712	FLJ35961	GALC	GPR27	hAC4349	HLA-DOB	Hs.114132	TL

Hs.12860	Hs.139649/	Hs.16586	Hs.194423	Hs.268597	Hs.33962/S	Hs.373914/	Hs.424184/
Hs.128660	TL	Hs.166465	Hs.19479	Hs.268860	NRNP40	CCDC162P	loc285074
Hs.128770/	Hs.140198	Hs.166539/	Hs.19515	Hs.268907	Hs.34079	Hs.373927	Hs.42454
TL	Hs.14062	ITGB3BP	Hs.195361	Hs.268974	Hs.34081	Hs.373930	Hs.424932/
Hs.128848/	Hs.141269	Hs.16689	Hs.19777	Hs.269005	Hs.343220	Hs.373935	aifm1
GRIK3	Hs.141707	Hs.167405/	Hs.19795	Hs.269034	Hs.343588	Hs.373938/	Hs.42599
Hs.128927	Hs.142498	TL	Hs.20281	Hs.269113	Hs.344274	BTN2A2	Hs.42624
Hs.12947	Hs.143495	Hs.167638	Hs.203007	Hs.269180/	Hs.344275	Hs.373939	Hs.42681
Hs.12962	Hs.143548	Hs.167663	Hs.203961/	TL	Hs.348140	Hs.373941/	Hs.427107/
Hs.129873	Hs.144119	Hs.169006	NUDT19	Hs.269202	Hs.348792/	LOC441242	DKFZp564
Hs.131127	Hs.144232	Hs.169444	Hs.205024	Hs.269234	TL	Hs.373945	E202
Hs.131188/	Hs.145268	Hs.16954	Hs.207777	Hs.269235	Hs.348844	Hs.373950	Hs.42771/c
SYT7	Hs.145919	Hs.169921	Hs.20799	Hs.269315	Hs.349082	Hs.374025	dh19
Hs.131385	Hs.146606	Hs.17267/C	Hs.208238	Hs.269553	Hs.349095	Hs.374055	Hs.42829
Hs.131391	Hs.146947	CDC171	Hs.20943	Hs.269563	Hs.349208/	Hs.374061/	Hs.429365/
Hs.131438/	Hs.146958	Hs.172965	Hs.209587/	Hs.269587	ZNF618	TL	TL
TL	Hs.147799	Hs.172998	FLJ44280	Hs.269644	Hs.350209/	Hs.374066	Hs.42987
Hs.131452	Hs.148116	Hs.173134/	Hs.209757	Hs.269645	THAP8	Hs.374067/	Hs.43020
Hs.131463/	Hs.148126	TL	Hs.210013	Hs.269819	Hs.351320	UBE3B	Hs.431048/
DHRX	Hs.148168	Hs.173163	Hs.210727	Hs.269826	Hs.355909	Hs.374068	ABL1
Hs.131484	Hs.148401	Hs.173522	Hs.21177	Hs.269827	Hs.356340	Hs.374495	Hs.431083
Hs.131485	Hs.148504/	Hs.173704/	Hs.213065/	Hs.269830	Hs.356352	Hs.374869	Hs.431101/
Hs.131494	TL	TL	TL	Hs.269884	Hs.356545/	Hs.375008	GNG12
Hs.131498	Hs.148864/	Hs.173705/	Hs.21375/	Hs.269890	NDUFAP8	Hs.375762/	Hs.431501
Hs.131868	TL	C4ORF3	TL	Hs.269894	Hs.356564	FLJ37631	Hs.432355/
Hs.131871	Hs.148865	Hs.173924	Hs.21627	Hs.269895/	Hs.35828/	Hs.376047	TL RAB28
Hs.132072	Hs.148874	Hs.175681	Hs.21757	TL	MARK3	Hs.378753	Hs.43263
Hs.132160	Hs.148880	Hs.177162	Hs.21856/	Hs.269930	Hs.35962	Hs.378836/	Hs.432890
Hs.132232	Hs.148881	Hs.177669	TL	Hs.27004	Hs.360628	HOOK1	Hs.433254
Hs.132599	Hs.148912	Hs.178306	Hs.220844	Hs.270047	Hs.360943	Hs.37916/	Hs.43330
Hs.132626/	Hs.148915	Hs.179825	Hs.22137/S	Hs.270099	Hs.362343/	DPP7	Hs.433461
DOCK8	Hs.148916	Hs.183070/	LC22A11	Hs.270104	FLJ41751	Hs.380144	Hs.433616
Hs.132642/	Hs.148917	TL	Hs.221497/	Hs.270106	Hs.36473/	Hs.38034/C	Hs.434924/
ZMPSTE24	Hs.148981	Hs.183140	C16ORF72	Hs.270279/	PEPD	DON	TL
Hs.132669/	Hs.148983	Hs.184341	Hs.221639	TYRP1	Hs.36676	Hs.380712	Hs.434973/
TL	Hs.148989/	Hs.186126/	Hs.222106	Hs.271670	Hs.368131/	Hs.380921	GYPA
Hs.132677	CGN11	TL	Hs.22247	Hs.271776	ST7	Hs.381002/	Hs.435034
Hs.132700	Hs.148991	Hs.186509	Hs.22293	Hs.272106	Hs.368137	TL	Hs.435045
Hs.132706	Hs.149246	Hs.186799	Hs.225614	Hs.272165	Hs.368166	Hs.381235	Hs.435052/
Hs.132932	Hs.149249	Hs.186802	Hs.226103	Hs.273721	Hs.368167	Hs.38218/	ATP8A1
Hs.133130	Hs.149252/	Hs.187398	Hs.226776	Hs.27379	Hs.368169	MIR223	Hs.435064/
Hs.133175	CPS1	Hs.187573	Hs.228613	Hs.275551	Hs.368172/	Hs.386104	TL
Hs.133206	Hs.149258	Hs.187822	Hs.22867/	Hs.27621/S	TL	Hs.386527/	Hs.435673
Hs.133228	Hs.149260	Hs.187906	EIF2C1	EMA5A	Hs.368173	TL	Hs.43586
Hs.133261/	Hs.149261/	Hs.188737	Hs.229305	Hs.278222	Hs.368175	Hs.387382	Hs.436437
TL	RUNX	Hs.188973	Hs.229790	Hs.278585	Hs.368189	Hs.388742/	Hs.436655
Hs.13336	Hs.149263	Hs.189745	Hs.230219	Hs.27860	Hs.368198	TL	Hs.437039/
Hs.133379	Hs.149266	Hs.190651	Hs.230221	Hs.28137	Hs.368200	Hs.38959	PRKAA2
Hs.133389/	Hs.149283	Hs.190738	Hs.231082	Hs.284464/	Hs.368218	Hs.390693	Hs.437111
TGFB2	Hs.149288	Hs.191148	Hs.231136	TL	Hs.368228	Hs.395	Hs.43744/
Hs.133418	Hs.149302	Hs.191558	Hs.231140	Hs.289044/	Hs.368229	Hs.395306/	PPM1K
Hs.133419/	Hs.149303	Hs.191608	Hs.231971	GPX8	Hs.368242	TL	Hs.437646
TL	Hs.149307	Hs.191650	Hs.232058	Hs.295421/	Hs.368248	Hs.396796/	Hs.437655/
Hs.133421/	Hs.149324	Hs.191767	Hs.234970	TL	Hs.368273	TL	FYB2
LIFR	Hs.149328	Hs.191890	Hs.23590	Hs.298396	Hs.368287	Hs.398136	Hs.43802
Hs.133505	Hs.149334	Hs.191891	Hs.23681	Hs.301527	Hs.368300	Hs.398348	Hs.438233/
Hs.133531	Hs.149637	Hs.191902	Hs.23772	Hs.302161	Hs.368567	Hs.399958/	TL
Hs.133534/	Hs.149950/	Hs.191903	Hs.238639	Hs.302965	Hs.368585	RCAN3AS	Hs.438237
KSR	TL	Hs.191911/	Hs.238661	Hs.302973	Hs.368587/	Hs.40095	Hs.438305
Hs.133922	Hs.150524	TL	Hs.238672	Hs.303162	PRLR	Hs.403972/	Hs.439013
Hs.133930	Hs.150556/	Hs.191939	Hs.238675	Hs.30567/	Hs.368588/	HIVEP3	Hs.439064
Hs.133945	LOC646329	Hs.191994	Hs.238677	TL	KEL	Hs.40528	Hs.439145/
Hs.133951	Hs.150708	Hs.192338	Hs.239066	Hs.31444	Hs.36859/	Hs.405427/	SCN9A
Hs.133996/	Hs.150784	Hs.192837	Hs.23966	Hs.314444	WDR20	TL	Hs.439439
TL	Hs.151629	Hs.192984	Hs.23970	Hs.31564	Hs.368611/	Hs.405537	Hs.439682/
Hs.134018	Hs.151631	Hs.193043/	Hs.245322	Hs.319825	ST3GAL2	Hs.40582/C	YX74D05
Hs.134037	Hs.151633	CLCN6	Hs.24661	Hs.320836	Hs.368612	DC14B	Hs.44009
Hs.134318	Hs.152849	Hs.19312	Hs.249053/	Hs.323966	Hs.368613	Hs.405930	Hs.442317/
Hs.134486	Hs.153310/	Hs.193176	TL	Hs.32501	Hs.368618	Hs.406224	TL
Hs.134496	PREX1	Hs.193191	Hs.24906	Hs.325422/	Hs.368620	Hs.40629	Hs.442946
Hs.134498	Hs.154513/	Hs.193223	Hs.251216	NBPF3	Hs.368623	Hs.406520	Hs.443502
Hs.134613	TL	Hs.193226/	Hs.251664	Hs.325531/	Hs.368626/	Hs.408374	Hs.443520
Hs.13471	Hs.155827/	UGGT2	Hs.251850	FNTB	RTN1	Hs.41011	Hs.443575
Hs.135204	GOLGA2	Hs.193251	Hs.252180/	Hs.326729	Hs.368627	Hs.411222	Hs.443800
Hs.135339	Hs.15652	Hs.193273/	DYSF	Hs.327078	Hs.368631/	Hs.41379/a	Hs.443801
Hs.136345/	Hs.156591	TL	Hs.254712	Hs.327169	ARHGAP10	cer2	Hs.443805
TL	Hs.156668	Hs.193605/	Hs.25766/	Hs.33024	Hs.368632/	Hs.416901	Hs.443823
Hs.137258	Hs.15806	TL	WNT4	Hs.332199	ADRA1B	Hs.418492	Hs.443837/
Hs.137324	Hs.158480/	Hs.193613/	Hs.259667	Hs.332429	Hs.368639/	Hs.420383	PSA
Hs.137839	TL	TNPO3	Hs.25968	Hs.332754	RNF217	Hs.421255	(NPEPPS)
Hs.138294	Hs.16228	Hs.193632	Hs.259939	Hs.332766	Hs.368641	Hs.421379	Hs.444181/
Hs.138777	Hs.16360/	Hs.193957	Hs.260928/	Hs.332919	Hs.372637	Hs.421708	TL
Hs.138906	TL	Hs.194094	SLC2A1	Hs.332927	Hs.373906	Hs.421767	Hs.444328
Hs.139515	Hs.163813/	Hs.194147	Hs.26507	Hs.336268	Hs.373908/	Hs.42388	Hs.444329/
TL	TL	Hs.194290	Hs.268231	Hs.339577	CDYL2		GPC6

Hs.44433	Hs.49329/	Hs.524338	Hs.8042	ICSBP1	INHA	KIAA0125	LAMC1
Hs.444401	TL	Hs.524547	Hs.83623	ID2	INHBA	KIAA0157	LAMC3
Hs.444495	Hs.493655/	Hs.524625/	Hs.85445/	ID4	INHBB	KIAA0195	LAMP2
Hs.444504	SLC4A1AP	GPRK5	TL	IDE	INPP5B	KIAA0261	LAP1B
Hs.444546	Hs.494673	Hs.524892	Hs.86614	IDH3G	INSIG1	KIAA0266	LAPTM4A
Hs.444665/	Hs.495460	Hs.525358/	Hs.86643	IDS	INSM1	KIAA0280	LAPTM4B
DKFZP68E	Hs.496110	TL	Hs.8764	IF16	INSR	KIAA0310	LASS6
1944	Hs.496897/	Hs.525378	Hs.87886	IF130	INVS	KIAA0317	LATS2
Hs.444809/	TL	Hs.526808	Hs.88349	IFIT1	IPO4	KIAA0335	LBR
TL	Hs.497967/	Hs.527140	Hs.88528	IFITM1	IPO7	KIAA0355	LCE
Hs.445537	CTDSP2	Hs.527510	Hs.88689	IFITM2	IPO8	KIAA0391	LCK
Hs.445588/	Hs.498738	Hs.527860/	Hs.88754	IFITM3	IPP	KIAA0408	LCMT2
SOAT1	Hs.499901/	TL	Hs.89014	IFNAR1	IQGAP1	KIAA0459	LCN2
Hs.445715/	TL	Hs.528111/	Hs.89121	IFNAR2	IQGAP2	KIAA0460	LCP1
FLJ44137	Hs.500184	IL27	Hs.89271	IFNG	IRA1	KIAA0469	LCP2
Hs.445859	Hs.500310	Hs.528799	Hs.90459	IFNGR2	IRAK1	KIAA0478	LDB2
Hs.445912	Hs.500486	Hs.528829	Hs.92683	IFNW1	IRAK3	KIAA0494	LDB3
Hs.445917	Hs.500875	Hs.528878	Hs.9326	IFRG28	IRF1	KIAA0495	LDHC
Hs.446077/	Hs.501262	Hs.528999	Hs.93674	IGF1	IRF2	KIAA0601	LEAP-2
SLC38A4	Hs.501443	Hs.529993	Hs.93714	IGF1R	IRF2BP2	KIAA0608	LEPR
Hs.446101	Hs.501497/	Hs.530628	Hs.94942	IGF2	IRF3	KIAA0614	LEPRE1
Hs.446107	CD70	Hs.530659	Hs.97383	IGFBP1	IRF4	KIAA0625	LEREPO4
Hs.446108	Hs.50193	Hs.530763	Hs.9772	IGFBP2	IRF5	KIAA0649	LFNG
Hs.446112	Hs.50214	Hs.530903	Hs.98546	IGFBP3	IRF6	KIAA0664	LGALS4
Hs.446629	Hs.502267	Hs.531130	Hs.99126	IGFBP4	IRF7	KIAA0690	LGALS8
Hs.44677/	Hs.502275	Hs.531131	Hs.99638	IGFBP5	IRLB	KIAA0779	LG1
TL	Hs.502717	Hs.531442	Hs.99641	IGFBP6	IRX4	KIAA0789	LGMM
Hs.448627	Hs.50272/	Hs.53176	Hs.99645	IGH@	ISYNA1	KIAA0792	LGP1
Hs.448658	TL	Hs.532069	Hs.99706	IGHG3	ITGA1	KIAA0804	LHB
Hs.448957	Hs.50277	Hs.532549	Hs.99749	IGHMBP2	ITGA10	KIAA0826	LHCGR
Hs.449217	Hs.502870	Hs.53687/	Hs.99785/F	IGLJ3	ITGA11	KIAA0913	LHFP
Hs.449579	Hs.503171	TL	LJ21245	IGSF1	ITGA2	KIAA0924	LHFPL1
Hs.451351	Hs.504510/	Hs.54751/	Hs.99836/L	IGSF8	ITGA2B	KIAA0970	LHFPL2
Hs.453126	TL	OC1009965	OC1009965	IKBKAP	ITGA3	KIAA1008	LHX1
Hs.453809	Hs.504550	Hs.56006	11	IKBKB	ITGA4	KIAA1181	LHX3
Hs.454253	Hs.504789	Hs.56025	HS3ST1	IKBKE	ITGA5	KIAA1194	LHX6
Hs.454833	Hs.506072	Hs.57787	HS3ST3B1	IKBKG	ITGA6	KIAA1212	LIFR
Hs.455285	Hs.506175	Hs.58446	HSA243666	IL10RA	ITGA7	KIAA1218	LIG1
Hs.456026	Hs.506357/	Hs.58456/L	HSA9947	IL10RB	ITGAE	KIAA1268	LIG3
Hs.456572	FAM107A	OC729995	HSP1	IL11	ITGAM	KIAA1279	LIPA
Hs.458282	Hs.507325	Hs.58470	HSD17B3	IL11RA	ITGAX	KIAA1280	LIPE
Hs.458340	Hs.50740	Hs.58532	HSD17B4	IL12A	ITGB1	KIAA1354	LIPG
Hs.458365/	Hs.508021/	Hs.58873	HSF2	IL12RB2	ITGB3BP	KIAA1387	LITAF
RNF113A	RCBTB1	Hs.58896/	HSF2BP	IL13	ITGB4	KIAA1441	LMO2
Hs.458474	Hs.50850/F	TL	HSGT1	IL13RA1	ITGB4BP	KIAA1545	LMO7
Hs.458730	REM1	Hs.58963/L	HSPA1L	IL13RA2	ITGB5	KIAA1579	LNX
Hs.459132/	Hs.509207	OC399715	HSPA4	IL15	ITGB6	KIAA1598	LOC113174
TL	Hs.510743	Hs.59034	HSPA5	IL15RA	ITGB8	KIAA1608	LOC113444
Hs.460208	Hs.512126	Hs.59089	HSPA5BP1	IL17C	ITIH3	KIAA1789	LOC114225
Hs.460809/	Hs.512435	Hs.59125	HSPA6	IL18	ITM2A	KIAA1799	LOC114926
UBE2DNL	Hs.512451/	Hs.59138/	HSPA8	IL18BP	ITM2B	KIAA1836	LOC114971
Hs.461417	TL ybx1	GYPC	HSPB2	IL18R1	ITPR1	KIAA1866	LOC117584
Hs.464297	Hs.512653	Hs.59196	HSPB3	IL18RAP	ITSN2	KIAA1915	LOC118487
Hs.467531	Hs.512827	Hs.59214/	HSPB7	IL19	JAG1	KIAA1922	LOC119180
Hs.468226/	Hs.512904	DNAJC3	HSPC051	IL1A	JAG2	KIAA1950	LOC125893
DHX57	Hs.513318	Hs.59319	HSPC150	IL1B	JAK1	KIAA1958	LOC127262
Hs.468538	Hs.513660/	Hs.59324	HSPC152	IL1F7	JAK2	KIAA1970	LOC129285
Hs.470447	CDH16	Hs.59335	HSPC154	IL1F9	JAK3	KIAA1972	LOC142678
Hs.470489	Hs.513868	Hs.59358	HSPC182	IL1R1	JARID1A	KIAA1991	LOC144501
Hs.474128	Hs.514263	Hs.59651	HSPC196	IL1R2	JM1	KIAA1993	LOC148145
Hs.474188	Hs.514383	Hs.59897	HSPC213	IL1RAP	JM5	KIF11	LOC149478
Hs.47530	Hs.514765	Hs.59905	HSPCB	IL1RAPL1	JMJD1C	KIF12	LOC150223
Hs.477728	Hs.514833	Hs.60171	HSPE1	IL1RL1	JMJD2A	KIF2C	LOC157567
Hs.478866	Hs.515069	Hs.60215	HSPH1	IL20RA	JMJD2B	KIT	LOC159090
Hs.479448	Hs.515785/	Hs.60418	HSU79266	IL24	JMJD2C	KLF12	LOC159091
Hs.479672	BLVRB	Hs.6093/A	HSXIAPAF1	IL27RA	JUN	KLF4	LOC200008
Hs.479790	Hs.516169	RRDC4	HT001	IL2RB	JUNB	KLF8	LOC255104
Hs.481589	Hs.516526	Hs.61094	HT014	IL2RG	JUND	KLIP1	LOC283241
Hs.482384	Hs.517536	Hs.61389/C	HTATSF1	IL5RA	K6HF	KLRC3	LOC283663
Hs.483735	Hs.518669	6ORF52	HTR2B	IL6	KA11	KNTC2	LOC283849
Hs.484192	Hs.51891/	Hs.61709	HTR6	IL6R	KBTBD7	KPNB1	LOC285033
Hs.485402	HERC4	Hs.61714	HUCEP11	IL6ST	KCNAB2	KPNB3	LOC286257
Hs.48569	Hs.519337/	Hs.62003/C	HUMAUAN	IL7	KCNE3	KRAS2	LOC317671
Hs.48614	BRD8	ACFD1	TIG	IL7R	KCNH3	KRT1	LOC339229
Hs.487270	Hs.521448	Hs.65857	HUMGT198	IL8RA	KCNK4	KRT13	LOC339745
Hs.487857	Hs.521456/	Hs.66087	A	IL8RB	KCNK6	KRT14	LOC347813
Hs.488569	TNFRSF10	Hs.66594/	HUS1	ILF2	KCNK7	KRT19	LOC374920
Hs.4890	B	TL	HYAL1	ILF3	KCNMA1	KRT20	LOC387601
Hs.489302	Hs.521731	Hs.67197/	HYAL3	IMAGE345	KCNQ2	KRT4	LOC401022
Hs.490109	Hs.521733	TL	IARS	1454	KCTD1	KRT5	LOC401494
Hs.490253/	Hs.522347	Hs.71657/	IBRDC3	IMP-2	KCTD12	KRT8	LOC51068
SPRR2G	Hs.522921	TL	ICAM1	IMPA1	KCTD15	KSR	LOC511107
Hs.492158	Hs.523471/	Hs.72069	ICAM2	IMPDH1	KDEL1	L1CAM	LOC51186
Hs.492779	ZNF143	Hs.77637	ICAM3	ING1	KDR	LAMA3	LOC51333
Hs.492802	Hs.523712	Hs.7882	ICAM5	ING1L	KIAA0101	LAMA4	LOC51596

LOC51668	MAP2K4	MGC13010	MPDZ	NBL1	NT5C2	PAX8	PI4KII
LOC54499	MAP3K1	MGC13045	MPEG1	NBS1	NTF3	PAX9	PICALM
LOC55580	MAP3K10	MGC13090	MPP1	NCAM1	NTN4	PAXIP1L	PIG11
LOC56181	MAP3K11	MGC14816	MPP6	NCB5OR	NTRK3	PB1	PIGCP1
LOC56926	MAP3K12	MGC15482	MPPR-1	NCOA1	NUBP2	PBF	PIK3C2A
LOC84661	MAP3K13	MGC15937	MRAS	NCOA4	NUCB1	PBX1	PIK3C2B
LOC88523	MAP3K14	MGC16121	MRLC2	NCOA6	NUCB2	PBX3	PIK3C2G
LOC90139	MAP3K2	MGC16385	MRPL1	NCOR1	NUDT9	PC	PIK3C3
LOC90355	MAP3K3	MGC16824	MRPL12	NDEL1	NUFIP1	PC4	PIK3CA
LOC90529	MAP3K4	MGC19764	MRPL13	NDFIP2	NUMA1	PCAF	PIK3CB
LOC90701	MAP3K5	MGC20446	MRPL15	NDRG4	NUP155	PCANAP1	PIK3CD
LOC90799	MAP3K6	MGC21874	MRPL16	NDST2	NUP188	PCBD	PIK3CG
LOC90925	MAP3K7	MGC22773	MRPL22	NDUFAB1	NUP214	PCBP2	PIK3R1
LOC91526	MAP3K7IP	MGC23908	MRPL30	NDUFB3	NUP43	PCDH1	PIK3R2
LOC91689	1	MGC23909	MRPL32	NDUFB4	NXP1	PCDH12	PIK3R3
LOC91966	MAP4K1	MGC2477	MRPL35	NDUFB7	NXT2	PCDH17	PIK3R4
LOC92129	MAP4K4	MGC27434	MRPL37	NDUFB8	NYD-SP21	PCDH7	PIK4CA
LOC92689	MAP6	MGC2747	MRPL50	NDUFS8	NY-REN-58	PCDH9	PIK4CB
LOC92799	MAP7	MGC2865	MRPL55	NDUFV1	OAS1	PCDHA5	PILRA
LOC93380	MAPK10	MGC29729	MRPS15	NEDD4	OAS2	PCDHB10	PIM1
LONP	MAPK12	MGC29784	MRPS2	NEDD4L	OAS3	PCDHB2	PIM2
LR8	MAPK13	MGC3248	MRPS22	NEDD8	OASL	PCDHB2	PINK1
LRAP	MAPK14	MGC33867	MRPS27	NEK6	OAT	PCDHGC3	PITPNM1
LRBA	MAPK3	MGC35097	MRPS30	NEK7	OAZIN	PCF11	PJA2
LRDD	MAPK4	MGC35366	MRPS33	NET1	OBP2B	PCK1	PKD2L1
LRP2	MAPK8IP1	MGC35521	MRPS35	NEXN	ODC1	PCK2	PKLR
LRP5	MAPK8IP3	MGC40042	MRRF	NF1	ODF2	PCMT1	PKM2
LRPAP1	MAPK9	MGC40214	MS4A1	NF2	OGG1	PCNA	PKNOX1
LRRC2	MAPKAP1	MGC4172	MS4A6A	NFATC3	OGN	PCNT2	PLA2G10
LRRFIP1	MAPKAPK2	MGC4189	MS4A7	NFIB	OGT	PCNX	PLA2G12A
LRRFIP2	MAPKAPK3	MGC4251	MS4A8B	NFIL3	OIP106	PCOLN3	PLA2G1B
LSM10	MAPKAPK5	MGC4399	MSE55	NFKB1	OK/SW-cl.56	PCSK9	PLA2G2D
LSM4	MARCKS	MGC45714	MSH2	NFKB2	OLFM1	PCTAIRE2B	PLA2G4A
LTA	MASA	MGC4645	MSH3	NFKBIA	OLIG2	P	PLA2G4B
LTA4H	MASP1	MGC46719	MSH5	NFKBIE	OLIG2	PCTK1	PLA2G5
LTB	MASP2	MGC5178	MSH6	NFRKB	OMD	PCTK2	PLA2G6
LTB4R2	MASS1	MGC5370	MSN	NFYC	ONECUT1	PCTK3	PLA2G7
LTBP2	MAST2	MGC5508	MST1R	NGFB	OPCML	PCYOX1	PLA2R1
LTBR	MAT1A	MGC5528	MST4	NGFR	OPTN	PD2	PLAA
LTB	MAT2A	MGC8974	MSTP031	NICE-4	OR2A9P	PDCD1	PLAC1
LTK	MATN1	MGC955	MT	NID2	OR2I6	PDCD1LG1	PLAG1
LUM	MAX	MGC9850	MT1E	NID67	ORC1L	PDCD2	PLAGL1
LY6E	MAZ	MGEA5	MT1X	NINJ1	ORF1-FL49	PDCD5	PLAGL2
LYN	MBD2	MGEA6	MT2A	NISCH	ORM2	PDCD6IP	PLAU
LYPLA1	MBD5	MGMT	MT3	NKAP	OSAP	PDE2A	PLCE1
LYPLA2	MBNL1	MIA	MTA1	NKG7	OSBP	PDE4B	PLEKHB1
LYPLA3	MBNL2	MICAL2	MTF1	NKTR	OSBPL10	PDE6D	PLK1
LYZ	MBNL3	MICB	MTIF2	NME1	OSBPL2	PDGFA	PLK3
M11S1	MC1R	MI-ER1	MTIF3	NME2	OSBPL9	PDGFB	PLOD
MAD	MCAM	MIG12	MTL5	NME3	OSMR	PDGFRA	PLOD2
MAD2L1	MCCC1	MINK	MTM1	NME4	OSTF1	PDGFRB	PLTP
MADCAM1	MCF2	MIPPEP	MTMR4	NME6	OTC	PDGFRL	PLVAP
MADD	MCM3	MIR	MTVR1	NMI	OTUB1	PDHA1	PLXNC1
MADH2	MCM5	MIS12	MUF1	NMT2	OVOL1	PDIP	PLXND1
MADH3	MCP	MITF	MUSK	NNMT	P17.3	PDIR	PMCH
MADH4	MCSC	MIZ1	MUTYH	NOC4	P29	PDLIM3	PME-1
MADH5	MCTS1	MJD	MX1	NODAL	P2RY2	PDPR	PML
MADH6	MDH1	MKI67	MX2	NOL8	P2RY5	PECAM1	PMM1
MADH7	MDM2	MKNK1	MXD3	NOLA2	P2RY6	PER3	PMS1
MADHIP	MDM4	MLANA	MXD4	NOS2A	P5326	PEX1	PMSCL1
MAF	MDS024	MLF1	MXI1	NOS3	PA2G4	PEX10	PMSCL2
MAFB	MECP2	MLH1	MYB	NOTCH3	PACS1	PEX12	PNMA1
MAFF	MED6	MLH3	MYBBP1A	NOTCH4	PADI2	PEX14	PODN
MAFG	MEF2C	MLL	MYBL1	NOV	PAEP	PFAAP5	POFUT1
MAG	MEIS1	MLL3	MYBL2	NOVA1	PAFAH2	PFDN5	POLA
MAGEA1	MEIS2	MLL4	MYC	NOVA2	PAH	PFKFB1	POLD3
MAGEA10	MEIS4	MLLT3	MYCBP	NP	PAICS	PFKL	POLD4
MAGEA12	MEN1	MLP	MYCBP2	NPC2	PAIP2	PFKM	POLDIP2
MAGEA2	MEOX2	MMP1	MYCL1	NPDO07	PAI-RBP1	PFN1	POLE3
MAGEA6	MET	MMP10	MYCN	NPDO14	PAK1	PFTK1	POLE4
MAGEA8	MFAP1	MMP11	MYEOV	NPDC1	PAK2	PGBD2	POLL
MAGEB1	MFAP2	MMP15	MYH11	NPM3	PAK6	PGF	POLR1C
MAGEB3	MFAP4	MMP17	MYL5	NPPB	PAM	PGGT1B	POLR2F
MAGEC1	MFN2	MMP19	MYLIP	NR0B2	PANK1	PGK1	POLR2G
MAGEF1	MFNG	MMP2	MYO18A	NR2C2	PANX1	PGM2L1	POLR2H
MAGEL2	MFTC	MMP20	MYO1B	NR2F6	PAP	PGM5	POLR3D
MAL	MGA	MMP23B	MYO6	NR4A1	PAPD5	PGR1	POLR3K
MALT1	MGC_13379	MMP24	MYOZ1	NR6A1	PAPPA	PHC3	POLRMT
MAN1	MGC10204	MMP25	N33	NRAP	PAPSS1	PHEMX	POLS
MAN1A1	MGC10731	MMP3	NACA	NRCAM	PAPSS2	PHF13	POMC
MAN1C1	MGC10871	MMP7	NACSIN	NRD1	PARVG	PHF19	POP4
MAP17	MGC10966	MMP9	NADSYN1	NRG1	PAWR	PHF2	POPDC2
MAP1B	MGC10993	MNAB	NAP1	NSE1	PAX2	PHLDA3	POR
MAP2K2	MGC12760	MNT	NAP1L1	NSF	PAX5	PHT2	POU1F1
MAP2K3	MGC12904	MOSPD1	NAPG	NT5C	PAX6	PHYHD1	POU2AF1

POU2F2	PRKCQ	PUS1	RASSF5	RPP21	SERPINA3	SLC2A2	SPOCK2
POU2F3	PRKCSH	PXK	RBAF600	RPP30	SERPINA4	SLC2A3	SPOK
POU5F1	PRKCZ	PXN	RBBP4	RPS10	SERPINA6	SLC2A4	SPP1
PP	PRKDC	QKI	RBBP6	RPS14	SERPINB3	SLC2A4RG	SPRR2C
PP591	PRKG1	QP-C	RBBP7	RPS15A	SERPINE1	SLC2A5	SPRR3
PPA2	PRKG2	QSCN6	RBL2	RPS16	SERPING1	SLC2A8	SPRY1
PPAP2B	PRKRIP1	RAB10	RBM14	RPS21	SERPINH1	SLC30A3	SPRY2
PPAP2C	PRKRIR	RAB11A	RBM17	RPS24	SERTAD1	SLC30A6	SPTAN1
PPARA	PRNPIP	RAB11B	RBM18	RPS25	SESN2	SLC31A1	SPY1
PPARD	PRO1073	RAB13	RBM27	RPS27	SET	SLC31A2	SRA1
PPARGC1A	PRO2730	RAB14	RBM4	RPS6	SF1	SLC35A3	SRC
PPBP	PROCR	RAB1A	RBM5	RPS6KA1	SF3A1	SLC35B1	SREBF2
PPFIA1	PRODH	RAB2	RBM6	RPS6KB2	SFN	SLC35E2	SRF
PPFIA2	PROX1	RAB26	RBP1	RPS7P1	SFRP1	SLC37A1	SRI
PPFIA3	PRP19	RAB27A	RBX1	RPS8	SFRP2	SLC38A6	SRPK2
PPFIA4	PRRG1	RAB27B	RCD-8	RQCD1	SFRP4	SLC39A1	SRR
PPHLN1	PRSS15	RAB28	RCE1	RRAD	SFRS1	SLC43A1	SRRM2
PPIC	PRSS16	RAB2L	RCOR1	RRAGA	SFRS11	SLC43A3	SS18
PPID	PSAP	RAB30	RECK	RREB1	SFRS2	SLC5A4	SSA1
PPIE	PSAT1	RAB31	RECQL	RRM1	SFRS3	SLC6A16	SSB1
PPIF	PSD	RAB33A	RECQL4	RRM2B	SFRS4	SLC6A8	SSBP3
PPIH	PSIP1	RAB35	REL	RRN3	SFRS7	SLC7A10	SSFA2
PPIL1	PSMA1	RAB36	RELB	RRP22	SFRS9	SLC7A9	SSPN
PPIL2	PSMA4	RAB37	RENT1	RSC1A1	SFTPA1	SLC9A1	ST13
POOX	PSMA5	RAB38	REPS1	RSU1	SFTPA2	SLC9A3R1	ST14
PPP1CA	PSMB1	RAB39B	RER1	RTN1	SFTPD	SLIT1	ST5
PPP1CB	PSMB10	RAB3A	REST	RTN3	SGCB	SLITRK2	ST6GALNA
PPP1CC	PSMB3	RAB3B	RFC3	RTN4R	SGNE1	SMARCA1	C6
PPP1R10	PSMB4	RAB3IL1	RFC4	RTTN	SGPL1	SMARCA2	ST7
PPP1R11	PSMB9	RAB5A	RFC5	RUNX1	SH2D1A	SMARCA3	STAC
PPP1R13B	PSMC2	RAB5B	RFWD1	RUNX3	SH3BGRL2	SMARCA5	STAM
PPP1R15A	PSMC3	RAB5C	RG9MTD1	RUVBL1	SH3D5	SMARCB1	STAM2
PPP1R15B	PSMC5	RAB6A	RGC32	RXRA	SH3GL2	SMARCC1	STAP2
PPP1R1B	PSMC6	RAB7	RGL1	RXR8	SH3KBP1	SMARCC2	STAR10
PPP1R3A	PSMD1	RAB7L1	RGR	RYK	SHANK2	SMARCD1	STAT2
PPP1R3C	PSMD10	RAB8A	RGS19IP1	S100A10	SHARP	SMARCD3	STAT3
PPP1R7	PSMD12	RAB8B	RGS2	S100A9	SHC1	SMARCE1	STAT4
PPP1R8	PSMD13	RAB9A	RGS3	SACS	SHC3	SMC2L1	STAT5A
PPP2CB	PSMD14	RAB9P40	RGS9	SAMD4	SHFM3	SMN1	STAT6
PPP2R1A	PSMD2	RABAC1	RHEB	SAMD6	SHOX2	SMO	STAU
PPP2R1B	PSMD3	RABGEF1	RHOA	SAMSN1	SIAH1	SMP1	STIM1
PPP2R2B	PSMD4	RABGGTA	RHOB	SARDH	SIAHBP1	SMURF1	STIP1
PPP2R3A	PSMD5	RABGGTB	RHOC	SASH1	SIAT1	SNAI1	STK10
PPP2R5A	PSMD9	RABL2B	RHOD	SAT	SIAT4C	SNCAIP	STK11IP
PPP2R5B	PSME2	RAC2	RHOH	SBDSP	SIAT6	SNCG	STK16
PPP2R5C	PSME3	RAD17	RIMS2	SBP2	SIAT7E	SNIP1	STK17A
PPP2R5D	PSMF1	RAD23A	RIMS3	SCAM-1	SIAT9	SNRPA	STK17B
PPP2R5E	PSTPIP2	RAD23B	RING1	SCAP2	SIGLEC7	SNRPC	STK24
PPP3CA	PTCH	RAD50	RINZF	SCARA3	SIL	SNRPF	STK32B
PPP3CB	PTEN	RAD51C	RIPK2	SCARB2	SIRT1	SNRPG	STK38
PPP5C	PTGER3	RAD54B	RIPK3	SCD	SIVA	SNTB2	STK4
PPP6C	PTGIR	RAD54L	RLF	SCEL	SIX1	SNX1	STK6
PPT1	PTGS1	RAF1	RMP	SCG2	SIX6	SNX12	STMN1
PQBP1	PTH	RAGE	RNASE4	SCGB2A1	SKD3	SNX13	STOM
PRDM2	PTHR1	RAI17	RND1	SCN3A	SKI	SNX15	STOML1
PRDM4	PTK2	RAI2	RNF11	SCNN1D	SKIL	SNX9	STX12
PRDX1	PTK6	RALA	RNF110	SCYD1	SKP1A	SOC	STX17
PRDX2	PTK7	RALB	RNF121	SCYE1	SKP2	SOC51	STX5A
PRELP	PTOV1	RALBP1	RNF138	SDCBP	SLA/LP	SOC52	STX6
PRF1	PTP4A3	RALGDS	RNF14	SDCCAG16	SLBP	SOC53	STXBP2
PRG1	PTPDC1	RALGPS1A	RNF149	SDCCAG3	SLC12A4	SOC56	SUCLG1
PRG-3	PTPN1	RAMP	RNF159	SDHD	SLC15A3	SOD1	SULF1
PRIM2A	PTPN11	RANBP2	RNF25	SEC13L	SLC16A9	SOD2	SULT1B1
PRKAA1	PTPN18	RANBP3	RNF31	SEC31L2	SLC19A1	SOD3	SUPT3H
PRKAA2	PTPN22	RANBP6	RNPEP	SEC5L1	SLC19A2	SON	SUPT5H
PRKAB1	PTPN3	RANBP7	RNPEPL1	SEC61A1	SLC1A2	SOS1	SUPT6H
PRKAB2	PTPN4	RANGAP1	ROCK1	SEC61B	SLC1A3	SOX12	SUPV3L1
PRKACB	PTPN6	RAP1A	ROCK2	SECP43	SLC22A18	SOX3	SURF1
PRKAG1	PTPN7	RAP1B	ROR2	SECTM1	SLC22A6	SP100	SURF5
PRKAG2	PTPNS1	RAP2A	RORC	SELE	SLC22A9	SP110	SYBL1
PRKAG3	PTPRB	RAP80	ROS1	SELK	SLC24A4	SP140	SYK
PRKAR1A	PTPRE	RAPGEF1	RP26	SELL	SLC25A1	SP192	SYNCOILIN
PRKAR1B	PTPRG	RAPGEF4	RP4-622L5	SELP	SLC25A14	SP2	SYNCRIP
PRKAR2A	PTPRH	RAPH1	RPA1	SELPLG	SLC25A16	SPA17	SYNE1
PRKAR2B	PTPRJ	RARA	RPAP1	SELT	SLC25A17	SPAM1	SYNPO
PRKCA	PTPRK	RARG	RPC155	SEMA3B	SLC25A26	SPARC	SYT7
PRKCB1	PTPRM	RARRES2	RPL10	SEMA3C	SLC25A29	SPARCL1	T1
PRKCBP1	PTPRN	RARRES3	RPL10A	SEMA4C	SLC26A10	SPATA11	T1A-2
PRKCD	PTPRO	RASA1	RPL11	SEMA4D	SLC26A3	SPATA6	TACSTD1
PRKCE	PTPRS	RASA2	RPL17	SEP6-	SLC27A4	SPC12	TACTILE
PRKCH	PTTG1	RASAL1	RPL18	SEPN1	SLC28A1	SPEC1	TAF12
PRKCL1	PTX1	RASGRP1	RPL27A	SEPP1	SLC28A2	SPEC2	TA-KRP
PRKCL2	PUNC	RASGRP2	RPL31	SEPX1	SLC29A1	SPG3A	TANK
PRKCM	PURA	RASSF1	RPL35A	SERF1A	SLC29A3	SPIN	TARBP1
PRKCN	PURB	RASSF2	RPP14	SERPINA1	SLC2A1	SPINK1	TARBP2

TARDBP	TIP39	TRAF2	UBL4	VTI1B	ZNF398	KIAA0674	POLR2C
TARSH	TIPARP	TRAF3	UBL5	VWF	ZNF404	KIAA0842	PP15
TAX1BP2	TK2	TRAF5	UBQLN1	WARP	ZNF408	KIAA0869	PPGB
TAZ	TKTL1	TRAF6	UBR1	WARS	ZNF43	KIAA0937	PPIA
TBC1D13	TLE1	TRAP1	UBTF	WASP1P	ZNF46	KIAA1085	PPIB
TBC1D15	TLE2	TRH	UBXD1	WBP1	ZNF507	KIAA1209	PPP1R2
TBCD	TLL2	TRHDE	UCHL1	WBSCR14	ZNF521	KIAA1276	PRG5
TBCE	TLOC1	TRIM14	UCHL5	WBSCR5	ZNF542	KIAA1373	PRIM1
TBK1	TLP19	TRIM22	UCK1	WDR13	ZNF562	KIAA1394	PRKRA
TBN	TLX1	TRIM32	UCP2	WDR20	ZNF566	KIAA1449	PRO0823
TBP	TM4SF13	TRIP11	UCP3	WDR34	ZNF577	KIAA1474	PRO2900
TBPL1	TM4SF2	TRIP3	Ufc1	WEE1	ZNF593	KIAA1856	PRP18
TBRG1	TM4SF6	TRIP4	UGCG	WFDC5	ZNF6	KNS2	PRX2
TBX2	TM4SF7	TRIT1	UHRF2	WISP2	ZNF75	LHFPL3	PSG9
TCEA1	TM4SF8	TRPC5	ULK2	WNT11	ZNF79	LOC114135	px19
TCEA2	TM7SF1	TRPV2	UMP-CMPK	WNT2	ZNFN1A1	LOC114136	RAB6KIFL
TCEB1	Tm9sf1	TRRAP	UMPK	WNT2B	FLJ13449	LOC114222	RABL2A
TCEB3	TMEFF1	TSC1	UNC84A	WNT4	FLJ20277	LOC114225	RANBP2L1
TCERG1	TMEM16D	TSG101	UNQ1849	WNT5A	FLJ20618	/ANKRD11	RBAK
TCF20	TMEM16F	TSHR	UNQ8193	WNT5B	FLJ20628	LOC51031	RHEB2
TCF21	TMEM24	TSPAN-1	UPF2	WT1	FLJ20783	LOC51119	RISC
TCF4	TMLHE	TSSC1	UPK1A	WWP2	FLJ20847	LOC51154	RNU17D
TCFL4	TMP21	TSSC4	UPP1	XBP1	FLJ21031	LOC51189/	ROK1
TCL1A	TMPO	TSTA3	UQCR	XLCL1	FLJ21156	ATP5IF1	RPL26
TCL6	TNC	TTC11	UQCRC1	XLKD1	FLJ21918	LOC51249	RPL36
TCN1	TNF	TTF1	UREB1	XPA	FLJ22059	LOC51259	RPL7
TCOF1	TNFAIP1	TTF2	UROD	XPO7	FLJ22237	LOC58481	RPS11
TDE2	TNFAIP3	TTR	USMG5	XRCC1	FLJ22457	LOC64182	RPS19
TDG	TNFAIP6	TUBA1	USP12	XRCC3	FLJ22558	LW-1	RPS29
TDGF1	TNFRSF10C	TUBA2	USP14	XRCC4	FLJ22573	MAGEA11	RPS3
TDRKH	TNFRSF11	TUBA3	USP15	XRCC5	FLJ22609	MAGEA3	RPS7
TEBP	A	TUBA8	USP16	XTP2	FLJ22995	MAP-1	SAS
TEC	TNFRSF11	TUBB	USP18	YES1	FLJ23468	MAP2K5	SCGF
TEK	B	TUBB2	USP19	YIF1	FTL	MAP4K2	SCYA4
TENC1	TNFRSF14	TUBB4	USP2	YWHAH	G6PD	MAPK7	SCYB14
TERF1	TNFRSF17	TUBD1	USP20	YWHAQ	GALGT	MAPK8IP2	SDC4
TERF2	TNFRSF19L	TUBE1	USP21	ZAP70	GGT1	MATK	SDCCAG43
TERT	TNFRSF25	TUBG1	USP22	ZBTB11	GLDC	MCPR	SDR1
TESK2	TNFRSF5	TUBG2	USP24	ZBTB2	GNAQ	MGC12928	SEP2
TEX10	TNFRSF6	TUBGCP2	USP25	ZBTB9	GNB5	MGC14797	SERPINA5
TFAM	TNFRSF7	TULP2	USP3	ZCCHC10	GNG3	MGC15548	SH3GLB2
TFAP2A	TNFRSF8	TUSC3	USP32	ZCCHC11	GPR37	MGC3036	SIX2
TFAP2C	TNFSF10	TWIST1	USP33	ZCCHC6	GSTM1	MGC3178	SLC16A4
TFB1M	TNFSF11	TXK	USP39	ZDHC12	GTF21	MGC5469	SLC2A9
TFDP1	TNFSF13	TXN2	USP48	ZDHC16	GTF3A	MGP	SMAC
TFDP2	TNFSF13B	TXNDC4	USP7	ZDHC18	HABP2	MIC1	SPI1
TFE1	TNFSF4	TXNRD1	USP8	ZDHC5	HMG1	MID2	SPIB
TFG	TNFSF5IP1	TYRO3	USP9X	ZDHC9	HNRPU	MKP-7	SPRR2A
TFR2	TNFSF8	TYRBP	USP9Y	ZFP37	HOXA4	MLLT2	ST1B2
TFRC	TNFSF9	UBA1	UVRAG	ZFP64	HOXC5	MNAT1	STATI2
TG	TNKS2	UBA2	VAMP5	ZFP91	HOXD3	MPL	SULT1A3
TGFA	TNNT1	UBA52	VANGL1	ZFPL1	HSF4	MRPL11	TAF2D
TGFB114	TNXB	UBADC1	VAV1	ZFYVE16	HSOBRGRP	MT1L	TAF2S
TGFB2	TOB1	UBAP1	VAV2	ZHX1	HSPA1B	MTHFD2	TBCA
TGFB3	TOB2	UBASH3A	VAV3	ZMPSTE24	HSPB1	MYLE	TC21
TGFB1	TOMM40	UBC	VAX2	ZMYM1	HSPC141	NAALADAS	TCF8
TGFBR1	TOP1	UBD	VBP1	ZMYND19	HTGN29	EL	TGFBR3
TGFBR2	TOP2A	UBE1	VCAM1	ZNF11B	I-1	NESP55	TM7SF2
TGIF	TOP2B	UBE2A	VCL	ZNF146	ICAM4	NOL3	TNFSF12
THAP4	TOP3A	UBE2B	VDAC1	ZNF151	ICMT	NR1D1	TOM1L1
THBD	TOP3B	UBE2C	VDR	ZNF183	IGKV3D-15	NR13	TP11
THBS2	TOPBP1	UBE2D1	VDRIP	ZNF185	IL14	NUDE1	TRIM5
THBS3	TOPORS	UBE2D2	VEGFC	ZNF189	IL9R	ODZ1	UBE2E3
THBS4	TOR1B	UBE2D3	VENTX2	ZNF212	IPT	OGFR	UBE4A
THG-1	TOSO	UBE2E2	VGLL1	ZNF216	ITGAL	P2Y5	UBN1
THOC2	TP53	UBE2E2	VHL	ZNF232	ITIH4	PAX1	UMPH1
THPO	TP53BP1	UBE2G1	VIL2	ZNF235	KIAA0123	PCDHA10	UPK1A
THRA	TP53I3	UBE2G2	VKORC1	ZNF25	KIAA0226	PCDHA12	USP4
THRAP3	TP53INP1	UBE2H	VMD2	ZNF259	KIAA0336	PCDHA7	USP5
THRAP5	TP73L	UBE2L3	VNN1	ZNF265	KIAA0337	PCDHA9	USP6
TIAM2	TPD52	UBE2L6	VPS13C	ZNF266	KIAA0440	PCDHAC1	UTX
TIEG	TPD52L1	UBE2S	VPS13D	ZNF274	KIAA0485	PCDHG8	VAMP8
TIEG2	TPD52L2	UBE2S	VPS26	ZNF275	KIAA0493	PDP	VI
TIF1	TPT1	UBE3A	VPS28	ZNF281	KIAA0506	PEGAM2	VRK2
TIGD3	TRA1	UBE4B	VPS35	ZNF30	KIAA0508	plknbeta	VRP
TIMP1	TRAD	UBL3	VPS52	ZNF313	KIAA0546	PLEC1	ZNF33A
TIMP3	TRADD	VSX1	VRK1	ZNF331	KIAA0655	PLSCR3	ZNF36
TIMP4	TRAF1			ZNF345	KIAA0673	PMX2B	

Anexo II

Listado de los 2293 genes obtenidos con al menos el 80% de la información.

A4GALT	ALDH1A2	ASCC1	BCL7B	C1QDC1	CCNF	CDH8	CLIC4
AASDHPPPT	ALDH1A3	ASH1L	BDKRB1	C2	CCNH	CDK2	CLK1
ABCA1	ALDH5A1	ASH2L	BDKRB2	C20orf111	CCNI	CDK4	CLK4
ABCB1	AMHR2	ASTN2	BFAR	C20orf4	CCNL1	CDK5	CLMN
ABCB6	ANGPTL2	ATAD1	BHLHB2	C21orf25	CCNT1	CDK6	CLPX
ABCC1	ANGPTL3	ATF1	BICD2	C2orf17	CCR1	CDK8	CMIP
ABCC2	ANKRD1	ATF2	BIK	C3F	CCR5	CDKL2	CNK1
ABCC6	ANLN	ATF3	BIRC1	C5	CCR7	CDKL3	CNTN1
ABCC8	ANXA1	ATF5	BIRC2	C6orf103	CCRK	CDKL5	CNTN3
ABCC9	ANXA4	ATF6	BIRC3	C6orf115	CCRL1	CDKN1C	CNTN4
ABCD1	ANXA5	ATP10B	BIRC4	C6orf133	CCRL2	CDKN2C	CNTN6
ABCF2	ANXA7	ATP11A	BIRC5	C6orf134	CCT2	CDT6	CNTNAP1
ABL1	ANXA8	ATP1B1	BIRC6	C6orf5	CCT4	CDYL	CNTNAP2
ABLM1	AP1M1	ATP2A2	BLCAP	C6orf63	CCT5	CEACAM1	COL11A1
ACADM	AP3M2	ATP5C1	BLZF1	C7	CCT6A	CEACAM4	COL11A2
ACE	AP4M1	ATP5G2	BMP1	C7orf20	CCT7	CEACAM6	COL16A1
ACO1	APAF1	ATP5J2	BMP2	C9orf12	CD226	CEBPA	COL18A1
ACOX1	APC	ATP6V0A1	BMP4	C9orf125	CD33	CEBPG	COL4A6
ACSL3	APEX1	ATP6V0C	BMP5	C9orf28	CD3G	CENPB	COL5A2
ACTL7A	APG1	ATP6V0D1	BMP6	C9orf3	CD4	CENTB2	COL6A3
ACTN1	APG5L	ATP6V1A	BMP7	C9orf5	CD5	CENTB5	COL8A2
ACTN2	APG7L	ATP6V1F	BMPR2	C9orf55	CD53	CEP2	COL9A2
ACTN4	API5	ATP6V1G1	BMSCUBP	C9orf58	CD6	CFLAR	COPB2
ACTR1A	APLP2	ATP8A1	BNIP1	C9orf72	CD69	CGA	COPG2
ACTR1B	APOC1	AURKC	BNIP2	C9orf74	CD84	CGB5	COQ4
ACTR8	APOL3	AVIL	BNIP3L	C9orf78	CDA	CGI01	CORO1C
ACVR1	APR3	AXIN1	BPAG1	CA9	CDA08	CGI63	CORO2A
ACVRL1	APRT	AXIN2	BRCA1	Cab45	CDC10	CGI69	CORO2B
AD158	ARAF1	AXL	BRD3	CACNA2D2	CDC14A	CGI85	COX15
ADA	ARF4L	B3GAT3	BRIX	CAMSAP1	CDC14B	CGI94	COX6B
ADAM17	ARFGAP1	B4GALT5	BSCL2	CAPON	CDC16	CH25H	COX7A1
ADD1	ARFGEF2	BAALC	BT3	CAPZA1	CDC20	CHC1L	CPEB3
ADD3	ARG1	BAAT	BTG3	CARD4	CDC23	CHD1	CPT1A
ADH1B	ARHE	BACH	BTK	CARHSP1	CDC25A	CHD2	CRADD
ADK	ARHGAP1	BAG1	BTRC	CASP10	CDC25C	CHD3	CRAT
ADSL	ARHGAP25	BAG2	BUB1	CASP8	CDC27	CHEK1	CREB3
AFG3L2	ARHGAP5	BAG3	BUB3	CASP9	CDC2L5	CHFR	CREBBP
AFTIPHILIN	ARHGAP6	BAG4	C10orf3	CAV1	CDC34	CHGB	CREBL2
	ARHGAP8	BAG5	C10orf69	CAV2	CDC37	ChGn	CREG
AGMAT	ARHGDI1	BAI1	C10orf70	CBFA2T2	CDC42	CHI3L1	CRKL
AGPAT2	ARHGEF1	BAI2	C11orf30	CBFA2T3	CDC42BPA	CHKA	CRNKL1
AGRN	ARHGEF5	BAIAP2	C11orf5	CCBL1	CDC45L	CHL1	CRSP7
AGT	ARHGEF6	BAK1	C12orf10	CCBP2	CDC5L	CHMP15	CRSP9
AGTR1	ARHI	BAP1	C14orf104	CCDC6	CDC6	CHN1	CRY1
AGTRL1	ARHN	BARX2	C14orf130	CCL13	CDC7	CHS1	CSDA
AHCY	ARID1A	BBC3	C14orf142	CCL15	CDCA7	CHST2	CSE1L
AIM1	ARL3	BC008967	C14orf166	CCL2	CDH1	CHST5	CSF1
AIM2	ARL7	BCAR1	C14orf2	CCL20	CDH11	CIP29	CSF1R
AK1	ARNT	BCAR3	C16orf3	CCL23	CDH15	CIT	CSF2
AK2	ARP3BETA	BCAS2	C17	CCL26	CDH16	CITED1	CSF3
AK3	ARPC1A	BCCIP	C18orf1	CCL3	CDH18	CIZ1	CSF3R
AKAP13	ARPC3	BCL11A	C19orf12	CCL8	CDH19	CKB	CSH1
AKAP3	ARPC5	BCL2	C19orf28	CCNB2	CDH2	CKS1B	CSNK2A1
AKAP9	ARR3	BCL2L1	C1orf2	CCNC	CDH3	CKS2	CSPG2
AKL3L	ARRB1	BCL2L2	C1orf21	CCND1	CDH4	CLC	CSR2
ALAD	ARTS1	BCL6	C1orf29	CCND2	CDH5	CLCN6	CST6
ALCAM	ASC	BCL7A	C1orf38	CCNE1	CDH6	CLIC2	CTBP2

CTGF	DEK	DVL2	EPB41L3	FGF12	FLNC	GGPS1	DC~1
CTH	DGAT2	DVL3	EPB41L4B	FGF2	FLT1	GHITM	hAB2451
CTNNA1	DGCR6L	DVS27	EPHA1	FGF20	FLT3LG	GHR	hAB2791
CTNNA2	DHFR	DZIP3	EPHB2	FGF4	FLT4	GHRH	hAB4505
CTNND1	DHX9	E2F1	EPHB3	FGF5	FMOD	GJA4	hAC0166
CTNND2	DI01	E2F4	EPHB4	FGF9	FNBP1	GJB3	hAC0242
CTPS	DJ462O232	E2F5	EPO	FGFR1	FNTA	GK	hAC2377
CTSB	DKC1	E2F6	EPOR	FGFR2	FNTB	GLG1	hAC6778
CTSK	DKFZP43~	E2IG4	EPS15	FGFR3	FOLH1	GLI2	hAC9062
CTSL	1335	EBAF	EPS15L1	FGG	FOLR1	GLI3	hAC9231TE
CTSL2	DKFZP434	EBI2	EPS8	FGIF	FOLR2	GLUD1	F
CTSS	C212	EBI3	ERBB3	FHIT	FOLR3	GMEB1	hAC9893
CUL3	DKFZP434	ECE1	ERCC1	FHL3	FOSL2	GNAS	HACE1
CUL4A	H132	ECM2	ERCC2	FIGF	FOXG1B	GNB1	hAD0107
CXCL1	DKFZP56~	ECT2	ERCC3	FLJ10094	FOXK2	GNB2L1	hAD0578
CXCL11	0463	EDG1	ERCC5	FLJ10099	FPGT	GNG10	hAD0601
CXCL12	DKFZp56~	EDG2	EREG	FLJ10211	FRAP1	GNG11	hAD0687
CXCL3	0769	EDG6	ERF	FLJ10276	FREQ	GNG12	hAD0696
CXCL6	DKFZP56~	EDN2	ESPL1	FLJ10458	FRMD4	GNRH1	hAD0712
CXorf12	1023	EDN3	EST1B	FLJ10496	FRZB	GOLGA4	hAD1557
CXorf6	DKFZP56~	EEF1D	ETV1	FLJ10521	FSCN2	GOLPH2	hAD4423
CXX1	1378	EFA6R	ETV3	FLJ10525	FSCN3	GOPC	hAD4438
CXXC5	DKFZP564	EGF	ETV4	FLJ10597	FTSJ1	GOT1	hAD4777
CYC1	D116	EGFL3	ETV6	FLJ10871	FUBP1	GPNMB	hAD5395
CYCL	DKFZP564I	EGFL5	EVI2A	FLJ11021	FURIN	GPR107	hAD6284C
CYCS	122	EGFR	EVL	FLJ11196	FUSIP1	GPR21	CL23
CYFIP2	DKFZP564	EGR2	EVPL	FLJ11218	FUT4	GPR3	hAD7826
CYP11A1	0243	eIF2A	EXT2	FLJ11305	FYB	GPX7	HAGH
CYP11B1	DKFZp727	EIF2C1	F10	FLJ11730	FYN	GRB14	HBXIP
CYP17A1	A071	EIF2C3	F8	FLJ12442	FZD1	GRIM19	HCA127
CYP19	DKFZP76~	EIF2S2	FABP3	FLJ12529	FZD10	GRK6	HCF1
CYP1B1	0211	eIF3k	FADD	FLJ12875	FZD3	GRP58	HCK
CYP26A1	DKFZp761	EIF3S2	FADS1	FLJ12903	FZD4	GSDML	HCLS1
CYP27B1	D112	EIF3S3	FAF1	FLJ12969	FZD5	GSTM3	HCRTR1
CYP2A7	DKK3	EIF3S5	FAH	FLJ13154	FZD6	GSTP1	HD
CYP2B6	DLEU1	EIF3S6	FAM11A	FLJ13171	FZD7	GTF2B	HDAC1
CYP2B7	DLG5	EIF4A2	FAM8A1	FLJ13188	G1P2	GTF2H1	HDAC2
CYP2C9	DLX4	EIF4B	FANCA	FLJ13220	G1P3	GTF2H2	HDAC3
CYP2J2	DNA2L	EIF4G3	FANCF	FLJ13409	GAB1	GTF2H3	HDAC4
CYP4A11	DNAI1	EIF5	FANCG	FLJ13491	GABARAP	GTF3C2	HDAC6
CYP4F2	DNAJB1	EIF5B	FARP1	FLJ14007	GABPB2	GTL3	HDAC8
CYP4F8	DNAJB2	ELA2A	FAT2	FLJ14511	GABRD	GTPBP1	HDCMA18P
CYP7B1	DNAJB5	ELAVL2	FATJ	FLJ14825	GAD1	GUSB	HDGF
CYP8B1	DNAJB6	ELAVL4	FAU	FLJ14936	GAD2	hAA1925	HELLS
D2S448	DNAJC13	ELF1	FBLN5	FLJ20244	GADD45B	hAA2704R	HELSNF1
DAB2IP	DNAJC4	ELF4	FBP1	FLJ20291	GAL	PL44	HEMGN
DAD1	DNAJC6	ELL	FBP2	FLJ20445	GALE	hAA3450	HERC2
DAPK3	DNASE2	ELN	FBX30	FLJ20477	GANAB	hAA3592	HES2
DATF1	DNCI2	ELOVL1	FBXL10	FLJ20487	GARP	hAA3848	HEY1
DAXX	DOC1R	EML4	FBXL3A	FLJ20580	GARS	hAA4225	HEYL
DAZAP1	DOCK2	EMR1	FBXL7	FLJ20699	GAS1	hAA4333	HFL1
DBCCR1	DOCK7	EMR2	FBX02	FLJ20716	GAS2	hAA4347	HGFAC
DC13	DOLPP1	EMS1	FBX025	FLJ21032	GAS41	hAA4456	HH114
DCI	DPAGT1	ENC1	FBX04	FLJ21174	GAS7	hAA6054	HHEX
DCK	DPF2	ENG	FBX05	FLJ21657	GBP2	hAA6426FJ	hIAN2
DCL1	DPH2L2	ENO1	FBX06	FLJ22794	GC20	X1	HIG2
DCTD	DRYD	ENO2	FBX08	FLJ22875	GCH1	hAA6427	HIMAP2
DCTM4F2	DRAP1	ENO3	FCGRT	FLJ22938	GCNT1	hAA6450	HIRA
DCTN6	DSC1	ENPP2	FCN1	FLJ23018	GCS1	hAA6490	HIRIP3
DDB1	DSCAM	ENTPD1	FCN2	FLJ23027	GDA	hAA6780CC	HIST1H1C
DDIT3	DSG1	ENTPD3	FDXR	FLJ23153	GDF1	T6A	HIST1H3D
DDX23	DSG2	ENTPD5	FEM1B	FLJ23360	GDF11	hAA6864	HIST1H4B
DDX3X	DUSP22	EP400	FER	FLJ23451	GDF5	hAA6919	HIST1H4F
DDX6	DUSP4	EPAS1	FGD1	FLJ23468	GEMIN5	hAA6990	HIST1H4H
DEDD	DUT	EPB41	FGF1	FLJ23476	GFI1	hAA7519C	HIST1H4J

HIST2H2BE	Hs432355T	IL10RB	JARID1A	LBR	MAP3K4	MICB	MYCBP
HK1	~28	IL11	JM1	LCE	MAP3K6	MIG12	MYCL1
HKE2	Hs435052A	IL12RB2	JM5	LCK	MAP3K7	MINK	MYCN
HLADMA	T~1	IL13	JMJD1C	LCMT2	MAP3K7IP	MIPEP	MYL5
HLADMB	Hs45836~	IL13RA1	JMJD2B	LCN2	1	MIR	MYO1B
HMG2	113A	IL13RA2	JUN	LCP1	MAP4K1	MITF	MYO6
HMG4	Hs493655S	IL17C	JUNB	LCP2	MAP4K4	MIZ1	MYOZ1
HMMR	L~P	IL18BP	K6HF	LDB2	MAP6	MJD	N33
HNMT	Hs50635~	IL18R1	KAI1	LEPRE1	MAPK10	MLANA	NADSYN1
HNRPF	107A	IL18RAP	KCNAB2	LHFPL2	MAPK12	MLF1	NAP1
HOXA1	Hs513660C	IL1A	KCNE3	LHX1	MAPK13	MLH3	NAPG
HOXA10	~16	IL1B	KCNK6	LHX6	MAPK14	MLL	NCAM1
HOXA2	Hs519337B	IL1F9	KCNQ2	LIFR	MAPK4	MLL3	NCB5OR
HOXB13	RD8	IL1R2	KCTD15	LIG3	MAPK8IP1	MLL4	NCOA4
HOXB2	Hs521456	IL1RAP	KDR	LITAF	MAPK8IP3	MMP11	NCOR1
HOXB5	~10B	IL1RAPL1	KIAA0125	LMO7	MAPKAP1	MMP15	NDFIP2
HOXB6	Hs528111I	IL1RL1	KIAA0157	LNX	MAPKAPK2	MMP19	NDRG4
HOXB7	L27	IL27RA	KIAA0195	LOC114225	MAPKAPK3	MMP2	NDUFAB1
HOXC11	Hs59214D	IL2RB	KIAA0261	LOC51068	MAPKAPK5	MMP23B	NDUFAB4
HOXC13	NA~3	IL5RA	KIAA0280	LOC51107	MASP1	MMP24	NDUFB7
HOXD10	HSBP1	IL6R	KIAA0335	LOC51668	MAST2	MMP25	NDUFB8
HOXD4	HSD17B3	IL6ST	KIAA0355	LOC54499	MAT1A	MMP7	NDUFS8
HOXD8	HSD17B4	IL7	KIAA0408	LOC56181	MAT2A	MMP9	NEDD4
HPCA	HSF2	IL7R	KIAA0459	LOC56926	MATN1	MNT	NEK6
HPRP8BP	HSGT1	IL8RB	KIAA0460	LOC84661	MAZ	MPDZ	NET1
HRAS	HSPA1L	ILF2	KIAA0494	LOC88523	MBD2	MPP1	NF2
HRASLS3	HSPA4	ILF3	KIAA0495	LOC91689	MBD5	MPP6	NFATC3
HRB2	HSPA5	IMAGE345	KIAA0601	LRAP	MBNL1	MRAS	NFIL3
Hs119887C	HSPA5BP1	1454	KIAA0608	LRBA	MBNL2	MRLC2	NFKB2
DK6	HSPA6	IMP2	KIAA0664	LRP5	MC1R	MRPL1	NFKBIE
Hs131188S	HSPA8	IMPA1	KIAA0690	LRRC2	MCF2	MRPL12	NFRKB
YT7	HSPB7	ING1	KIAA0789	LRRFIP2	MCM3	MRPL13	NGFB
Hs133389T	HSPC150	INHBB	KIAA0826	LSM10	MCSC	MRPL16	NGFR
G~2	HSPC196	INPP5B	KIAA0913	LSM4	MDM2	MRPL22	NICE4
Hs133421L	HSPE1	INSIG1	KIAA0970	LTA	MDM4	MRPL32	NID2
IFR	HSPH1	INVS	KIAA1008	LTB	MDS024	MRPL35	NINJ1
Hs133534K	HSXIAPAF1	IPO4	KIAA1181	LTB4R2	MECP2	MRPL37	NISCH
SR	HTATSF1	IPO8	KIAA1194	LTBR	MED6	MRPS15	NKTR
Hs149261R	HTR2B	IQGAP1	KIAA1212	LTF	MEIS1	MRPS2	NME1
UNX	HUCEP11	IRF1	KIAA1268	LYN	MEIS2	MRPS22	NME2
Hs166539I	HUS1	IRF2	KIAA1279	LYPLA1	MEIS4	MRPS27	NME3
T~P	HYAL1	IRF6	KIAA1354	M11S1	MEOX2	MRPS30	NME4
Hs22867EI	HYAL3	ISYNA1	KIAA1545	MADH2	MET	MS4A7	NME6
F~1	ICAM2	ITGA1	KIAA1579	MADH4	MFAP1	MSH2	NMI
Hs25766W	ID2	ITGA10	KIAA1789	MADH5	MFAP2	MSH3	NMT2
NT4	ID4	ITGA11	KIAA1799	MADH7	MFN2	MSH5	NNMT
Hs260928S	IDE	ITGA2	KIAA1866	MADHIP	MFTC	MSN	NOC4
L~1	IDH3G	ITGA3	KIF11	MAF	MGC10966	MST1R	NODAL
Hs270279T	IFI30	ITGA4	KIF2C	MAFB	MGC10993	MST4	NOL8
Y~1	IFITM1	ITGA5	KIT	MAFF	MGC12904	MT3	NOLA2
Hs325531F	IFITM2	ITGA6	KLF4	MAFG	MGC2747	MTA1	NOS3
NTB	IFITM3	ITGAE	KLF8	MAG	MGC2865	MTF1	NOTCH4
Hs33962SN	IFNAR1	ITGAX	KLIP1	MAGEA10	MGC3248	MTIF2	NOV
~40	IFNAR2	ITGB1	KRAS2	MAGEA2	MGC4172	MTL5	NOVA1
Hs378836H	IGF1	ITGB3BP	KRT13	MAGEA8	MGC4189	MTM1	NP
O~1	IGF1R	ITGB4BP	KRT19	MAGEB1	MGC4251	MTMR4	NPD007
Hs3ST3B1	IGF2	ITGB5	KRT20	MAGEF1	MGC4399	MTVR1	NPD014
Hs40582C	IGFBP1	ITGB8	KRT4	MAL	MGC4645	MUF1	NPDC1
~14B	IGFBP2	ITIH3	L1CAM	MALT1	MGC5370	MX1	NPM3
Hs42771cd	IGFBP6	ITM2A	LAMA3	MAN1	MGC5508	MXD4	NPPB
h19	IGHMBP2	ITPR1	LAMA4	MAP17	MGC5528	MYB	NR0B2
Hs431048A	IGLJ3	ITSN2	LAMC1	MAP2K3	MGEA5	MYBBP1A	NR2C2
BL1	IGSF1	JAG2	LAMC3	MAP2K4	MGEA6	MYBL1	NR2F6
Hs431101G	IKBKAP	JAK1	LAMP2	MAP3K10	MGMT	MYBL2	NR4A1
~12	IL10RA	JAK2	LATS2	MAP3K14	MICAL2	MYC	NR6A1

NRCAM	PC4	PLCE1	PRDM2	PTOV1	RAP1B	RPS21	SHANK2
NRG1	PCAF	PLEKHB1	PRDX1	PTP4A3	RAP2A	RPS24	SHARP
NSF	PCANAP1	PLK1	PRDX2	PTPN18	RAP80	RPS27	SHC1
NT5C2	PCDH1	PLOD	PRF1	PTPN3	RAPGEF4	RPS6KA1	SHC3
NTN4	PCDH7	PLOD2	PRIM2A	PTPN6	RARA	RPS8	SHFM3
NTRK3	PCDHB10	PML	PRKAA1	PTPN7	RARRES2	RRAD	SHAH1
NUCB1	PCDHB2	PMM1	PRKAB1	PTPNS1	RARRES3	RRAGA	SHAHBP1
NUCB2	PCF11	PMS1	PRKAB2	PTPRE	RASGRP1	RRM1	SIAT4C
NUDT9	PCMT1	PMSCL2	PRKACB	PTPRJ	RASSF1	RRM2B	SIAT9
NUFIP1	PCNA	PNMA1	PRKAG1	PTPRK	RASSF2	RRN3	SIGLEC7
NUP155	PCNT2	POFUT1	PRKAG2	PTPRM	RASSF5	RSC1A1	SIL
NUP214	PCTAIRE2B	POLA	PRKAG3	PTPRN	RBAF600	RSU1	SKD3
NXT2	P	POLD4	PRKAR1A	PTPRO	RBBP6	RTN4R	SKI
NYREN58	PCTK1	POLE3	PRKAR1B	PTPRS	RBBP7	RTTN	SKP1A
OAS1	PDCD1	POLE4	PRKAR2B	PTTG1	RBL2	RUNX3	SLC12A4
OAS2	PDCD5	POLR1C	PRKCA	PTX1	RBM17	RUVBL1	SLC19A1
OAS3	PDCD6IP	POLR2G	PRKCBP1	PUNC	RBM27	RXR	SLC1A2
OBP2B	PDE2A	POLR3D	PRKCD	PURA	RBM4	S100A10	SLC1A3
ODC1	PDE4B	POLR3K	PRKCE	PUS1	RBP1	S100A9	SLC22A6
ODF2	PDE6D	POLRMT	PRKCH	PXN	RBX1	SACS	SLC25A14
OGG1	PDGFA	POLS	PRKCL1	QPC	RCD8	SAMD4	SLC25A17
OGN	PDGFRA	POP4	PRKCL2	RAB10	RCOR1	SAMSN1	SLC26A3
OGT	PDGFRB	POR	PRKCM	RAB11A	RECK	SARDH	SLC28A1
OLIG2	PDGFRL	POU2AF1	PRKCN	RAB11B	RECQL	SAT	SLC29A1
OMD	PDIR	POU2F2	PRKCQ	RAB13	RECQL4	SCAP2	SLC29A3
OPCML	PEX1	POU2F3	PRKCSH	RAB14	REL	SCARA3	SLC2A1
OPTN	PEX14	POU5F1	PRKCZ	RAB1A	RENT1	SCD	SLC2A2
OR2A9P	PFKL	PP	PRKDC	RAB2	REPS1	SCGB2A1	SLC2A3
OR2I6	PFKM	PP591	PRKG1	RAB26	RER1	SCN3A	SLC2A4
ORF1FL49	PFTK1	PPAP2B	PRKRIP1	RAB27A	REST	SCYD1	SLC2A5
OSAP	PGF	PPAP2C	PRKRIR	RAB28	RFC4	SDCCAG16	SLC2A8
OSBP	PGK1	PPARA	PRNPIP	RAB31	RG9MTD1	SDCCAG3	SLC31A1
OSBPL10	PHF19	PPARD	PRO0823	RAB38	RGS2	SDHD	SLC35A3
OSBPL9	PHF2	PPBP	PRO2730	RAB3A	RGS3	SEC31L2	SLC35B1
OSMR	PHT2	PPFIA1	PRP19	RAB31L1	RGS9	SEC61A1	SLC35E2
OSTF1	PI4KII	PPFIA2	PRRG1	RAB5A	RHOD	SECP43	SLC43A1
OTC	PICALM	PPFIA4	PRSS15	RAB5B	RHOH	SELL	SLC6A16
OTUB1	PIG11	PPIE	PRSS16	RAB5C	RIMS2	SELP	SLC6A8
OVOL1	PIGCP1	PPIF	PSAP	RAB6A	RIMS3	SELPLG	SLC7A10
P	PIK3C2A	PIIH	PSD	RAB7L1	RING1	SELT	SLC7A9
P29	PIK3C2B	PPIL1	PSIP1	RAB8B	RINZF	SEMA3C	SLC9A1
P2RY2	PIK3C2G	PPIL2	PSMA1	RAB9A	RLF	SEMA4C	SLIT1
P2RY6	PIK3C3	PPOX	PSMA5	RABAC1	RMP	SEPN1	SMARCA1
PA2G4	PIK3CA	PPP1CA	PSMB10	RABGEF1	RNASE4	SEPX1	SMARCA2
PACS1	PIK3CB	PPP1CC	PSMB4	RABGGTA	RNF110	SERPINA1	SMARCA3
PADI2	PIK3CD	PPP1R11	PSMB9	RABL2B	RNF121	SERPINA6	SMARCA5
PAEP	PIK3CG	PPP1R13B	PSMC2	RAD23A	RNF138	SERPINB3	SMARCB1
PAFAH2	PIK3R1	PPP1R15B	PSMC3	RAD23B	RNF14	SERPINH1	SMARCC1
PAH	PIK3R2	PPP1R1B	PSMC5	RAD50	RNF159	SERTAD1	SMARCC2
PAIP2	PIK3R3	PPP1R3A	PSMC6	RAD51C	RNF25	SESN2	SMARCD3
PAK1	PIK4CA	PPP1R3C	PSMD1	RAD54B	RNF31	SF3A1	SMC2L1
PAK6	PIK4CB	PPP1R7	PSMD10	RAD54L	RNPEP	SFRP1	SMP1
PANX1	PIM1	PPP2CB	PSMD12	RAF1	RNPEPL1	SFRP4	SMURF1
PAPD5	PIM2	PPP2R1B	PSMD13	RAGE	ROCK1	SFRS11	SNAI1
PAPPA	PINK1	PPP2R2B	PSMD2	RAI2	ROR2	SFRS3	SNCAIP
PAPSS1	PITPNM1	PPP2R3A	PSMD4	RALA	RORC	SFRS7	SNCG
PAPSS2	PJA2	PPP2R5A	PSME2	RALGDS	RP4622L5	SFRS9	SNRPA
PAWR	PKM2	PPP2R5B	PSME3	RALGPS1A	RPA1	SFTPA1	SNRPG
PAX5	PKNOX1	PPP2R5C	PTEN	RAMP	RPAP1	SFTPD	SNX1
PAX6	PLA2G5	PPP2R5E	PTGER3	RANBP2	RPL10A	SGCB	SNX15
PAX8	PLAA	PPP3CA	PTGS1	RANBP3	RPL18	SGNE1	SNX9
PAX9	PLAG1	PPP3CB	PTH	RANBP6	RPP14	SH2D1A	SOCS1
PAXIP1L	PLAGL1	PPP6C	PTHR1	RANBP7	RPP21	SH3D5	SOCS3
PBF	PLAGL2	PPT1	PTK2	RANGAP1	RPP30	SH3GL2	SOCS6
PC	PLAU	PQBP1	PTK6	RAP1A	RPS10	SH3KBP1	SOD1

SOD2	STK17B	TCL1A	TMEM24	TRAF3	UBD	UVRAG	ZAP70
SOD3	STK24	TCL6	TMLHE	TRAF5	UBE2B	VANGL1	ZBTB11
SP110	STK32B	TCN1	TMPO	TRAF6	UBE2C	VAV2	ZBTB2
SP140	STK6	TCOF1	TNC	TRAP1	UBE2D1	VAV3	ZCCHC10
SP192	STOM	TDG	TNF	TRH	UBE2D2	VBP1	ZCCHC11
SP2	STXBP2	TDGF1	TNFAIP1	TRHDE	UBE2D3	VCAM1	ZDHHC16
SPA17	SULF1	TDRKH	TNFAIP3	TRIM32	UBE2E2	VDR	ZDHHC18
SPAM1	SUPT3H	TEC	TNFAIP6	TRIP3	UBE2G2	VENTX2	ZDHHC5
SPARCL1	SUPT5H	TEK	TNFRSF11	TRIP4	UBE2L3	VGLL1	ZDHHC9
SPG3A	SUPV3L1	TERF1	A	TRPC5	UBE2L6	VHL	ZFP37
SPIN	SURF1	TERF2	TNFRSF14	TRRAP	UBE2N	VIL2	ZFP64
SPINK1	SURF5	TERT	TNFRSF17	TSG101	UBE2S	VNN1	ZFPL1
SPOCK2	SYBL1	TESK2	TNFRSF19L	TSHR	UBTF	VPS13D	ZHX1
SPOP	SYK	TFAM	TNFRSF25	TSPAN1	UCHL5	VPS28	ZMYM1
SPRR2C	SYNCOILIN	TFAP2A	TNFRSF5	TSSC1	UCK1	VPS35	ZNF151
SPRR3	SYNCRIP	TFAP2C	TNFRSF6	TSSC4	UCP2	VT11B	ZNF183
SPRY1	SYNE1	TFDP1	TNFRSF7	TSTA3	UCP3	VWF	ZNF185
SPRY2	SYNPO	TFDP2	TNFRSF8	TTF1	Ufc1	WARP	ZNF212
SRA1	SYT7	TFR2	TNFSF10	TTF2	UGCG	WASPIP	ZNF216
SRC	TACTILE	TG	TNFSF11	TTR	UMPCMPK	WBP1	ZNF235
SRI	TAF12	TGFA	TNFSF13	TUBA1	UPF2	WBSCR14	ZNF259
SRPK2	TAF2S	TGFB114	TNKS2	TUBA2	UPK1A	WBSCR5	ZNF265
SRR	TAKRP	TGFB2	TNNT1	TUBA3	UPP1	WDR13	ZNF266
SRRM2	TANK	TGFB3	TNXB	TUBA8	UQCR	WEE1	ZNF274
SS18	TARBP1	TGFBR1	TOB2	TUBB	UQCRC1	WNT11	ZNF275
SSB1	TARBP2	THBS3	TOP1	TUBE1	UREB1	WNT2	ZNF313
SSFA2	TARDBP	THBS4	TOP2A	TUBG1	UROD	WNT2B	ZNF345
ST13	TARSH	THPO	TOP3A	TUBG2	USP12	WNT4	ZNF43
ST14	TAX1BP2	THRAP3	TOP3B	TUBGCP2	USP15	WNT5A	ZNF46
ST5	TAZ	THRAP5	TOPORS	TULP2	USP16	WNT5B	ZNF521
ST6GALNA C6	TBCE	TIEG	TOR1B	TWIST1	USP18	WT1	ZNF562
ST7	TBK1	TIF1	TOSO	TXK	USP19	WWP2	ZNF593
STAC	TBPL1	TIMP3	TP53	TXN2	USP20	XBP1	ZNF6
STAM	TCEA1	TIMP4	TP53BP1	TXNDC4	USP22	XCL1	ZNF75
STAM2	TCEA2	TIPARP	TP53INP1	TXNRD1	USP25	XPA	ZNF79
STAT3	TCEB1	TK2	TP73L	TYROBP	USP3	XPO7	ZNFN1A1
STAT4	TCEB3	TLE1	TPD52L1	TYRP1	USP33	XRCC1	
STAT4	TCERG1	TLL2	TPD52L2	U2AF1	USP39	XRCC4	
STIM1	TCF20	TLX1	TRA1	UBA2	USP7	XRCC5	
STIP1	TCF21	TM4SF6	TRAD	UBA52	USP8	XTP2	
STK111P	TCF4	TM4SF7	TRAF1	UBADC1	USP9X	YES1	
STK17A	TCFL4	TMEFF1	TRAF2	UBAP1	USP9Y	YWHAH	

Anexo III

Listado de los 97 genes seleccionados para el estudio de validación con NanoString.

ABCF1	FGFR1	PLCG1
AKT	FGFR3	PLS3
ALAS1	FJX1	POLR2A
LARG	FOXP3	PRF1
BIRC3	FYN	PRKACB
CARD11	GATA3	PRKCQ
CCDC32	GATA6	PTEN
CCR4	GZMA	PTK7
CCR7	HDAC3	RHOA
CD19	HPRT1	RHOB
CD2	HRAS	RORC
CD274	IKZF2	L selectina/SELL
CD28	IL10	CLA/SELPLG
CD38	IL10RA	STAT3
CD3D	IL15	STAT4
CD3E	IL17A	STAT5B
CD3G	ITK	SYK
CD4	JAK1	SYNE-1B
CD5	JUN-B	TBX21
CD52	KIR3DL2	TNFRSF25
CD7	NKG2D	TNFRSF8
CD79A	LCK	CD137L (TNFSF9)
CD79B	LCP1	TP53
CD8	LSP1	TRAC
CIT	LYN	TRAF1
CXCL10	MAPK1	TRBC1_new
CXCL12	MAPK13	TRBC1
CXCL13	MTOR	TRBC2
CXCR3	MYC	TRBC2_new
CXCR4	CD56	TRGC1/2
CD26/DPP4	NKP30	TUBB
DUSP15	B7H6	USP39
EGR2	NUAK1	VCAM1
ERCC3	PDCD1	VEGFB
CD16(FCGR3)	PIK3CA	ZEB1

Anexo IV

Modelo de consentimiento informado que se da a los pacientes:

INFORMACIÓN Y CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA DONACIÓN, ALMACENAMIENTO Y USO DE MUESTRAS EN BIOBANCO DEL HOSPITAL UNIVERSITARIO 12 DE OCTUBRE

Usted está siendo invitado a donar la parte sobrante del material biológico (muestras o partes de su cuerpo) resultante después de su utilización para uso diagnóstico o tras algún procedimiento terapéutico (cirugía...). Si usted acepta, dicho material será utilizado para fines científicos, según dispone al respecto la legislación vigente, con el objetivo de intentar contribuir al mejor conocimiento de las enfermedades y lograr avanzar en su diagnóstico y tratamiento.

Con este material se realizarán análisis de expresión genética / perfil mutacional de las células tumorales (micosis fungoide), la información que podamos obtener representa un valioso instrumento con destino a abrir nuevas líneas de la investigación de enfermedades y puede permitir desarrollar de nuevas estrategias y terapias aplicables a los pacientes.

Se le pide su consentimiento para realizar el almacenamiento y estudio de las muestras donadas. Estos serán evaluados en sus aspectos éticos y científicos por el Comité Ético de Investigación Clínica. Estos proyectos se podrán desarrollar tanto en el Hospital Universitario "12 de Octubre" como en otros centros. Se podrán realizar análisis genéticos (en ocasiones, generar modelos animales) que se usarán en el desarrollo y mejora de nuevas terapias y tratamientos, pudiéndose beneficiar usted, sus familiares, y en general, toda la sociedad.

Su colaboración es voluntaria y gratuita, por lo que renuncia a cualquier derecho de naturaleza económica, patrimonial o potestativa sobre los potenciales beneficios que puedan derivarse de manera directa o indirecta de las investigaciones que se lleven a cabo con las muestras que cede para investigación. Independientemente de que otorgue o no este consentimiento, la calidad asistencial que se le dará será la misma. Su único beneficio es el que corresponde al avance de la medicina en beneficio de la sociedad, y el saber que ha colaborado en este proceso. La muestra así recogida no podrá ser objeto directo de actividades con ánimo de lucro. La donación de su muestra no supone ningún gasto extra para usted (o su representante legal). Su participación tampoco supondrá ningún riesgo o molestia adicional para usted, ya que no se realizará ninguna prueba o intervención distinta de aquella en la que se obtiene la muestra.

Sus muestras y datos clínicos se cederán codificados, por lo que su identidad estará protegida, cada muestra se identificará con un código y nunca el grupo científico que lleve a cabo la investigación podrá asociar su identidad con el código asignado, aunque podría conocerse, si fuera necesario, utilizando dicho código.

Los resultados serán analizados por grupos de investigadores y expertos y podrán ser comunicados en reuniones, congresos médicos o publicaciones científicas, manteniéndose la confidencialidad.

En caso de necesitar algún dato o muestra adicional, se contactara con usted pero siempre tendrá derecho a elegir si desea participar. Si se obtuviera información relativa a su salud o a la de sus familiares, usted tendrá derecho a ser informado de los datos genéticos generados y usted decidirá sobre su conocimiento. Según prevé la Ley,

cuando esta información a criterio del médico responsable, sea necesaria para evitar un grave perjuicio para su salud o la de sus familiares biológicos, se informará a un familiar próximo o a un representante, previa consulta del comité asistencial si lo hubiera. En todo caso, la comunicación se limitará exclusivamente a los datos necesarios para estas finalidades.

Usted es libre de solicitar en cualquier momento la revocación del consentimiento para utilizar sus muestras, pudiendo solicitar la destrucción o anonimización (destrucción del código que vincula la muestra con su identidad) de las mismas. No obstante, los efectos de la revocación no se extenderán a los datos resultantes de las investigaciones que se hayan llevado a cabo previamente a la misma. Asimismo tiene derecho a incluir las restricciones que desee respecto del uso de sus muestras.

Los datos personales que se recojan serán obtenidos, tratados y almacenados cumpliendo en todo momento el deber de secreto, de acuerdo con la legislación vigente en materia de protección de datos de carácter personal. Sus datos personales se incorporarán a un fichero inscrito en la Agencia Española de Protección de datos, conforme a los términos establecidos en la legislación vigente. Para mayor facilidad en el ejercicio de sus derechos de acceso, oposición, rectificación o cancelación de sus datos, además de retirar, destruir, o anonimizar sus muestras o datos comunicándolo al médico clínico responsable que le informó, al servicio de este hospital que le facilitó este consentimiento, también puede hacerlo a través de la dirección de correo electrónico: biobanco.hdoc@salud.madrid.org

En el caso de almacenamiento de muestras de menores de edad, se garantiza el acceso a la información sobre la muestra por el sujeto fuente cuando éste alcance la mayoría de edad. Si precisa más información o alguna aclaración, no dude en preguntar a su médico

DECLARACIONES Y FIRMAS

Declaro: He leído, he sido informado y comprendo el contenido de la presente hoja de información, lo que acredito con mi firma en prueba de mi consentimiento.

He preguntado y aclarado las posibles dudas al Dr./Dra

Entiendo que mi participación es voluntaria y gratuita y comprendo que puedo solicitar la revocación de este consentimiento en cualquier momento, sin tener que ofrecer explicaciones y sin que repercuta en mis cuidados médicos presentes y/o futuros.

Autorizo que se realicen estudios genéticos y moleculares con las muestras aportadas.

Autorizo que a que se consulte mi historia clínica, cuando sea imprescindible para la realización del proyecto .

Si de las investigaciones con mis muestras derivan resultados biomédicos que puedan interesar a mí o a mis familiares, según la legislación vigente:

- Quiero ser informado. Si No
- No quiero ser informado, aunque acepto que mis familiares lo sean, si los resultados les pudieran afectar. SI No

No quiero que mis muestras sean utilizadas en proyectos de investigación que tengan que ver con

Este documento se expide en tres ejemplares, uno de ellos para usted, otro se conservará en el Biobanco del HOSPITAL UNIVERSITARIO 12 DE OCTUBRE y la tercera en el centro donde se obtuvo la muestra.

DOY CONFORMIDAD, PARA DONAR MIS MUESTRAS Y DATOS
CONSINTIENDO EL ALMACENAMIENTO Y USO EN LAS CONDICIONES
DETALLADAS EN ESTE DOCUMENTO, Y PARA QUE ASÍ CONSTE, FIRMO
ESTE CONSENTIMIENTO INFORMADO.

Madrid, ade.....

Firma del paciente,

Firma del médico,

Nombre del representante legal en caso de incapacidad del paciente para consentir, ya sea por minoría de edad, incapacidad legal o incompetencia, con indicación del carácter con que interviene (Padre, Madre, Tutor, etc.).

Nombre:

D.N.I.:

Firma,

En calidad de..... autorizo la realización del procedimiento mencionado.

Para cualquier duda, revocación de consentimiento, etc. puede dirigirse: el médico clínico responsable que le informó, el servicio de este hospital que le facilitó este consentimiento, a la Unidad de Atención al Paciente del HOSPITAL 12 DE OCTUBRE o a la dirección de correo electrónico: biobanco.hdoc@salud.madrid.org

Anexo V

	Log2 fold change	std error (log2)	Lower confidence	Upper confidence	Linear fold change	Lower confidence	Upper confidence	P-value	
CXCL10-mRNA	-2.16		496	-3.13	-1.19	224	114	7.55e-05	
CD8-mRNA	-1.23		313	-1.84	-614	427	279	0.0291	
JUN-B-mRNA	-1.07		278	-1.61	-522	478	327	0.0377	
CD79B-mRNA	1.47		417	657	2.29	2.78	1.58	0.0936	
TRBC2_new-mRNA		983	333	331	1.63	1.98	1.26	0.49	
CCR4-mRNA		01.06	377	0.32	1.8	02.08	1.25	0.728	
RORC-mRNA		752	297	171	1.33	1.68	1.13	0.147	
CXCR3-mRNA		-688	278	-1.23	-142	621	425	0.172	
TNFRSF25-mRNA		452	186	882	817	1.37	01.06	1.76	0.188
MYC-mRNA		-593	246	-1.08	-111	663	475	0.199	
CXCL13-mRNA		2.2	927	384	04.02	4.59	1.3	16.2	0.218
CXCL12-mRNA		-597	253	-1.09	-101	661	469	932	0.226
IL15-mRNA		-348	151	-643	-523	786	0.64	964	0.256
CIT-mRNA		627	272	928	1.16	1.54	01.07	2.24	0.26
CD28-mRNA		677	306	769	1.28	1.6	01.05	2.43	0.321
CD19-mRNA	1.24		582	998	2.38	2.36	01.07	5.21	0.384
CD52-mRNA		571	268	454	1.1	1.49	01.03	2.14	0.386
IKZF2-mRNA		544	0.26	351	01.05	1.46	01.02	02.08	0.417
L selectina/SEL	0.86		411	544	1.67	1.82	01.04	3.17	0.419
RHOB-mRNA		-654	318	-1.28	-306	635	412	979	0.455
EGR2-mRNA		-505	246	-988	-221	705	504	985	0.461
CD79A-mRNA	1.64		809	585	3.23	3.13	01.04	9.38	0.479
CD5-mRNA		846	417	285	1.66	1.8	01.02	3.17	0.483
TRBC1_new-mRNA		606	308	225	1.21	1.52	1	2.31	0.552
PRF1-mRNA	-0.52		267	-1.04	357	697	485	1	0.577
CCR7-mRNA		818	434	-324	1.67	1.76	978	3.18	0.657
NKG2D-mRNA		-686	0.37	-1.41	39	622	376	01.03	0.701
CXCR4-mRNA		-523	288	-1.09	425	696	0.47	01.03	0.764
PIK3CA-mRNA		185	109	-273	398	1.14	981	1.32	0.943
CD3G-mRNA		499	296	-819	01.08	1.41	945	2.11	0.99
TNFRSF8-mRNA		584	348	-974	1.26	1.5	935	2.4	0.998
FYN-mRNA		-248	152	-547	508	842	684	01.04	0.111
AKT-mRNA	-0.19		119	-423	435	877	746	01.03	0.118
PTEN-mRNA		839	532	-203	1.88	1.79	869	3.68	0.121
CD4-mRNA		393	252	-0.1	887	1.31	933	1.85	0.125
CCDC32-mRNA		681	448	-197	1.56	1.6	873	2.95	0.135
MAPK13-mRNA		451	299	-135	01.04	1.37	911	02.05	0.138
IL10RA-mRNA		-247	165	-569	757	843	674	01.05	0.14
CD26/DPP4-mRNA		403	276	-138	945	1.32	909	1.92	0.151
TRGC1/2-mRNA		738	506	-255	1.73	1.67	838	3.32	0.152
MAPK1-mRNA	0.6		414	-212	1.41	1.52	864	2.66	0.154
PLS3-mRNA	0.36		249	-129	849	1.28	914	1.8	0.156
BIRC3-mRNA		392	0.29	-176	0.96	1.31	885	1.94	0.183
FJX1-mRNA		365	275	-173	904	1.29	887	1.87	0.019
SYNE-1B-mRNA	-0.16		122	-399	796	895	759	01.06	0.198
TRBC1-mRNA		324	256	-177	825	1.25	884	1.77	0.212
PRKACB-mRNA		333	268	-192	857	1.26	875	1.81	0.22
STAT4-mRNA		-396	342	-1.07	273	0.76	478	1.21	0.252
B7H6-mRNA		304	265	-216	824	1.23	861	1.77	0.257
NUAK1-mRNA		-271	242	-745	203	829	597	1.15	0.268
ZEB1-mRNA		508	0.46	-395	1.41	1.42	761	2.66	0.276
STAT5B-mRNA		126	115	-991	0.35	01.09	934	1.27	0.279
VCAM1-mRNA		288	265	-232	807	1.22	851	1.75	0.284
CD3D-mRNA		304	298	-279	888	1.23	824	1.85	0.312
FOXP3-mRNA		416	0.43	-427	1.26	1.33	744	2.39	0.338
TRBC2-mRNA		-236	255	-735	264	849	601	1.2	0.36
TRAC-mRNA		235	262	-278	749	1.18	825	1.68	0.373
FGFR3-mRNA	-0.22		263	-736	296	859	0.6	1.23	0.407
TRAF1-mRNA		232	277	-312	775	1.17	805	1.71	0.408
LYN-mRNA		206	248	-279	692	1.15	824	1.62	0.409
MTOR-mRNA		-104	129	-356	148	931	782	1.11	0.424
CD7-mRNA	-0.29		381	-1.04	457	818	487	1.37	0.45
HRAS-mRNA		112	148	-177	401	01.08	884	1.32	0.452
ITK-mRNA		221	321	-408	0.85	1.17	754	1.8	0.495
TBX21-mRNA		-257	401	-1.04	529	837	485	1.44	0.524
FGFR1-mRNA		106	166	-219	431	01.08	859	1.35	0.526
PDCC1-mRNA		259	408	-0.54	01.06	1.2	688	02.08	0.528
PTK7-mRNA		122	193	-256	501	01.09	837	1.41	0.529
LARG-mRNA		-978	168	-427	232	934	744	1.17	0.564
SYK-mRNA		141	258	-364	647	1.1	777	1.57	0.586
CD274-mRNA		212	392	-556	981	1.16	0.68	1.97	0.591
VEGFB-mRNA		-578	123	-299	183	961	813	1.14	0.64
GZMA-mRNA		-212	455	-1.1	0.68	863	465	1.6	0.644
PLCG1-mRNA		-689	168	-398	0.26	953	759	1.2	0.684
CD2-mRNA		-997	291	-0.67	0.47	933	629	1.39	0.733
GATA3-mRNA		-582	172	-395	278	0.96	761	1.21	0.736
CD16(FCGR3)-mRNA		-124	388	-883	636	918	542	1.55	0.751
CLA/SELPLG-mRNA		-909	286	-651	0.47	939	637	1.38	0.752
LCP1-mRNA		-62	225	-502	378	958	706	1.3	0.784
JAK1-mRNA		21	764	-129	171	01.01	915	1.13	0.785
CD56-mRNA		-743	275	-613	464	0.95	654	1.38	0.788
RHOA-mRNA		41	159	-271	353	01.03	829	1.28	0.798
LCK-mRNA		-619	0.25	-552	428	958	682	1.35	0.805
CD137L(TNFSF)		583	247	-426	543	01.04	744	1.46	0.814
PRKCCQ-mRNA		75	328	-569	719	01.05	674	1.65	0.82
NKP30-mRNA		-784	402	-867	0.71	947	548	1.64	0.846
STAT3-mRNA		-204	118	-251	0.21	986	0.84	1.16	0.863
CD3E-mRNA		359	234	-422	494	01.03	746	1.41	0.879
CD38-mRNA		-538	0.46	-955	848	963	516	1.8	0.907
CARD11-mRNA		-362	0.31	-644	572	975	0.64	1.49	0.908
TP53-mRNA		482	822	-156	166	1	897	1.12	0.954
LSP1-mRNA	6.01e-05	0.22		-432	432	1	741	1.35	1