

# UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE MEDICINA

Departamento de Medicina Interna



## TESIS DOCTORAL

Microarns como factor pronóstico en linfomas cutáneos de células B

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Verónica Monsálvez Honrrubia

Directores

Pablo Luis Ortiz Romero  
José Luis Rodríguez Peralto

Madrid, 2013

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE MEDICINA

Departamento de Medicina Interna

TESIS DOCTORAL

# MICROARNS COMO FACTOR PRONÓSTICO EN LINFOMAS CUTÁNEOS DE CÉLULAS B



DIRIGIDA POR Pablo Luis Ortiz Romero y José Luis Rodríguez Peralto

PRESENTADA POR Verónica Monsálvez Honrubia

Madrid, 2012





**D. Pablo Luís Ortiz Romero**, Profesor Titular del Departamento de Medicina Interna de la Universidad Complutense de Madrid y **D. José Luís Rodríguez Peralto**, Profesor Titular del Departamento de Anatomía Patológica de la Universidad Complutense de Madrid.

#### CERTIFICAN:

Que **Dña Verónica Monsálvez Honrubia** ha realizado bajo nuestra dirección el trabajo “**MicroARNs como factor pronóstico en Linfomas Cutáneos de Células B**” que a nuestro juicio reúne las condiciones para optar al Grado de Doctor.

Para que así conste, firmamos el presente certificado en Madrid a 23 de abril del año dos mil doce.

Vº Bº Directores de la Tesis Doctoral

**Dr. Pablo Luis Ortiz Romero**  
Profesor Titular  
Departamento de Medicina Interna  
Facultad de Medicina  
Universidad Complutense de Madrid

**Dr. José Luis Rodríguez Peralto**  
Profesor Titular  
Departamento de Anatomía Patológica  
Facultad de Medicina  
Universidad Complutense de Madrid

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 Anatomía Patológica y Dermatología del Hospital Universitario 12 de Octubre, así como en el Laboratorio de Linfomas del Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas (CNIO), bajo la dirección de los doctores Pablo Luis Ortiz-Romero (Hospital 12 de Octubre) y José Luis Rodríguez-Peralto (Hospital 12 de Octubre). La realización de este trabajo ha sido posible gracias a la financiación proporcionada por unas becas de Ministerio de Sanidad y Consumo. El trabajo de esta memoria ha sido aceptado y está pendiente de publicación por parte de la revista *Modern Pathology*.

## AGRADECIMIENTOS:

La andadura en esta tesis empezó no hace más de 2 años cuando el germen de los microARNs y los linfomas B cutáneos fue despertado en mí por el Dr. Ortiz-Romero. El desconocimiento sobre la materia era tal que el abismo se plantó ante mi cuando comencé. Pero sin duda, fue gracias al Dr. Santiago Montes que me acompañó en el camino hasta ver la luz al final del túnel, sin su apoyo y su paciencia esta tesis doctoral no habría sido posible. También agradecer su participación a todo el personal técnico del CNIO (E Rodríguez, B Sánchez Espiridión, M Lozano, MJ Artiga), ya que sin su colaboración para la parte técnica y el manejo de toda la maquinaria este trabajo no se podría haber concluido.

Al Dr. Miguel Angel Piris que en la sombra ha supervisado y revisado todo el proceso de la investigación y ha permitido la utilización de parte de las muestras del CNIO. Agradecer al Dr. Pablo Ortiz Romero y al Dr. José L. Rodríguez-Peralto la supervisión del proyecto. A Alicia Maroto y al banco de tumores del Hospital 12 de Octubre cuya labor ha sido fundamental para la organización y manejo de las muestras.

Por último, agradecer a mi familia el apoyo recibido, que han vivido el proyecto con igual o mayor ilusión que yo. A todos, gracias.



# ÍNDICE

## ÍNDICE

<b>AGRADECIMIENTOS</b>	<b>5</b>
<b>INDICE</b>	<b>7</b>
<b>ABREVIATURAS</b>	<b>11</b>
<b>RESUMEN</b>	<b>19</b>
<b>INTRODUCCIÓN</b>	<b>25</b>
<b>Linfomas Cutáneos Primarios de Células B</b>	<b>26</b>
<b>Definición</b>	<b>26</b>
<b>Evolución histórica</b>	<b>26</b>
<b>Características clínicas e histológicas</b>	<b>29</b>
<b>Estadificación y factores pronósticos</b>	<b>34</b>
<b>Tratamiento</b>	<b>38</b>
<b>Etiopatogenia de los Linfomas Cutáneos Primarios de Células B</b>	<b>41</b>
<b>Desarrollo normal de la célula B</b>	<b>41</b>
<b>Alteraciones moleculares y genéticas</b>	<b>46</b>
<b>Etiología infecciosa</b>	<b>54</b>
<b>MicroARNs</b>	<b>58</b>
<b>HIPÓTESIS Y OBJETIVOS</b>	<b>63</b>
<b>MATERIAL Y MÉTODOS</b>	<b>65</b>
<b>Selección de pacientes</b>	<b>66</b>
<b>Histología e inmunohistoquímica.</b>	<b>66</b>
<b>Extracción de ARN de muestras de parafina</b>	<b>67</b>
<b>Hibridación</b>	<b>67</b>
<b>PCR en tiempo real (RT-PCR) para la cuantificación de miRNAs</b>	<b>69</b>

<b>usando ARN de las muestras de tejido.</b>	
<b>Microdissección</b>	<b>71</b>
<b>Estadística</b>	<b>72</b>
<b>RESULTADOS</b>	<b>73</b>
<b>Características clínicas e histológicas:</b>	<b>74</b>
<b>Diferencias de expresión de miRNAs entre los grupos de linfomas cutáneos primarios</b>	<b>77</b>
<b>Microdissección</b>	<b>79</b>
<b>MiRNAs con valor pronóstico en LCCB.</b>	<b>80</b>
<b>DISCUSIÓN</b>	<b>89</b>
<b>MiR-150 y miR-155 en neoplasias</b>	<b>90</b>
<b>MiR-150 y miR-155 en linfomas sistémicos</b>	<b>94</b>
<b>MiR-150 y miR-155 en linfomas cutáneos</b>	<b>96</b>
<b>MiR-150 y miR-155 y sus dianas génicas</b>	<b>98</b>
<b>CONCLUSIONES</b>	<b>109</b>
<b>ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS</b>	<b>111</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>115</b>
<b>ANEXOS</b>	<b>129</b>



# **ABREVIATURAS**

## ABREVIATURAS:

ADN	Ácido desoxirribonucleico
AGA	Aspartylglucosaminidase
AID	Activation induced deaminase
AIDCA	Activation-induced cytidine deaminase
AKT	Serine/threonine protein kinase
AKT2	Serine/threonine protein kinase 2
AP-1	Activador de la proteína 1
ARN	Ácido ribonucleico
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
ATF-2	Activator transcription factor 2
BACH-1	Basic leucine zipper transcription factor 1
BCL2	B cell lymphoma 2
BCL6	B cell lymphoma 6
BCL-xl	BCL2-associated agonist of cell death
BCR-ABL	Breakpoint cluster region-Abelson tyrosine protein Kinase
BIM	Isoforma de bcl-2
BNIP3	BCL2/adenovirus E1B 19kDa interacting protein 3
CALCR	Calcitonin receptor
CCND1	Cyclin D1
CDK4	Cyclin-dependent kinase 4
CDN2A	Cyclin-dependent kinase inhibitor 2A
CDN2B	Cyclin-dependent kinase inhibitor 2B
CD3	Clustter of differentiation 3
CD5	Clustter of differentiation 5
CD10	Clustter of differentiation 10

## MicroARNs como factor pronóstico en linfomas cutáneos de células B

CD20	Clustter of differentiation 20
CD21	Clustter of differentiation 21
CD35	Clustter of differentiation 35
CD43	Clustter of differentiation 43
CD79alfa	Clustter of differentiation 79 alfa
CGH	Hibridación genómica comparada
CHOP	Cyclophosphamida + hydroxydaunorubicina + oncovin + prednisona
CNIO	Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas
COL1A1	Collagen type 1, alpha 1
COP	Cyclophosphamida + oncovin + prednisone
CXCL9	Chemokine ligand 9
CXCL10	Chemokine ligand 10
CXCR3	Chemokine receptor 3
Cy3	Cyanine 3-conjugated dUTP
Cy5	Cyanine 5-conjugated dUTP
C6orf134	Chromosome 6 open reading frame 134
DKC1	Dyskeratosis congenita 1
DMSO	Dimethyl Sulphoxide
dNTP	2'-Deoxyribonucleoside-5'-triphosphate
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
EGFR2	Epidermal growth factor receptor 2
ELK1	Member of ETS oncogene family
FDR	False Discovery Rate
FGFR2	Fibroblast growth factor receptor 2
FISH	Fluorecent in situ hybridization
FLIP	Flagellar biosynthesis protein

## MicroARNs como factor pronóstico en linfomas cutáneos de células B

FOX	FBJ osteosarcoma oncogene
FOXP1	Forkhead box P1
FOXO3a	Forkhead box O3A
IFN	Interferón
Ig	Inmunoglobulina
IGFR1	Insulin-like growth factor type 1 receptor
IgH	Cadena pesada de inmunoglobulina
IHQ	Inmunohistoquímica
IKK	IkappaB kinase-like 2
IRF4	Interferon regulatory factor 4
JNK	c-Jun N terminal Kinase
JMJD1A	Jumonji domain containing 1A
JUNB	Jun-B oncogene
LCCB	Linfomas cutáneos de células B
LCF, PCLCF	Linfomas del centro folicular
LCCT	Linfomas cutáneos de células T
LCG otros	Linfomas cutáneos primarios difusos de células grande B, otros
LCGP	Linfomas de células grandes difusos, tipo piernas
LDH	Lactato deshidrogenasa
LH	Linfoma Hodgkin
LLA	Leucemia linfática aguda
LLC	Leucemia linfática crónica
LMP1	Latent membrane protein 1
LNH	Linfoma no Hodgkin
LZM, PCLZM	Linfoma zona marginal
MALT	Mucosa associated lymphoid tissue
MiRNA	microARN
mM	micromoles
MMLV-RT	Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase

mmM	micromilimoles
MUC4	Mucin 4, cell surface associated
MUM-1	Murine molecular 1
MYB	mieloblastosis viral oncogene homolog
MYC	myelocytomatosis viral oncogene homolog
MYCL	v-myc myelocytomatosis viral oncogene homolog 1
NF-κB	Nuclear Factor Kappa B
NHL	Linfoma no Hodgkin
NK	Natural killer
NOTCH3	Neurogenic locus notch homolog protein 3
NT	No tratamiento
OCT2	Organic cation transporter 2
OMS	Organización mundial de la salud
OMS-EORTC	Organización mundial de la salud – Organización europea para la investigación y tratamiento del cáncer (European Organisation for Research and Treatment of Cancer)
PAX5	Paired box gene 5
PCR	Polimerasa Chain Reaction (Reacción en cadena de la polimerasa)
PDFGFB	Platelet-derived growth factor beta polypeptide
PFS	Progression Free Survival (Tiempo libre hasta la progresión)
PIK3	Phosphatidylinositol-3-kinase
PTEN	3' inositol phosphatase
PTPTRR	Protein tyrosine phosphatase receptor R
P2X7	Purinergic receptor P2X, ligand-gated ion channel, 7
QX	Cirugía
RAF	Root abundant factor
RB2	Retinoblastoma 2
RC	Remisión completa

R-CHOP	Rituximab + Cyclophosphamida + hydroxydaunorubicina + oncovin + prednisona
REL	Reticuloendotheliosis oncogene
RISC	RNA induced silencing complex (complejo silenciador inducido del ARN)
RFS	Release Free Survival (tiempo libre hasta la recidiva)
RP	Remisión parcial
RPM	Revoluciones por minuto
RPS	Revoluciones por segundo
RISC	RNA induced silencing complex
RhoA	Ras homolog family member A
RhoH	Ras homolog family member H
RT	Radioterapia
RT-PCR	Real time- polimerasa chain reaction
RX	Rituximab
SAS	Stranded at second
SHIP	5' inositol phosphatase
SKG	Interleukina 6
SKI	Sarcoma viral oncogene homolog
SMARCD1	SWI/SFN related, matrix associated, actin dependent regulator of chromatin, subfamily d, memeber1, variant 1 and 2
SOCS1	Suppressor of cytokine signaling 1
SS	Sindrome de sézary
ST	Corticoterapia
STAT3	Signal-transducer and activator of transcription protein 3
TAC	Tomografía Axial Computerizada
TGF	Transforming growth factor
Th1	T helper 1 cell
Th2	T helper 2 cell

## MicroARNs como factor pronóstico en linfomas cutáneos de células B

TMM	Transcription Master mix
TNM	Tumor Node Metastasis
TTF	Tintenfisch
UTR	Untranslated region
VEGF	Vascular endothelial growth factor
ZFP91	Homo sapiens zinc finger protein 91 homolog



## **RESUMEN**

## RESUMEN:

### INTRODUCCIÓN:

Los linfomas primarios cutáneos de células B, son procesos linfoproliferativos que se manifiestan inicialmente en piel, sin evidencia de enfermedad extracutánea al diagnóstico.

Durante su evolución histórica han sido varias las clasificaciones que se han utilizado para intentar catalogar dichos linfomas, pero no fue hasta la clasificación de la OMS-EORTC (2005), cuando se consideraron como un grupo independiente.

Actualmente se consideran 4 grupos de linfomas de células B cutáneos primarios: linfoma de la zona marginal, linfoma centro folicular, linfoma difuso de células B grandes, tipo piernas y linfoma difuso de células B grandes, otros.

El interés de este trabajo se centra en el grupo de linfomas cutáneos primarios de células B indolentes (linfoma de la zona marginal y centro folicular).

La etiopatogenia de estos linfomas ha sido ampliamente estudiada, relacionándola con alteraciones moleculares, genéticas y agentes infecciosos.

Los microARNs son pequeños fragmentos de ARN de 22 nucleótidos que modulan la propia transcripción del ARN. Los microARNs son moléculas de ARN transcritas a partir de genes de ADN, pero que no son traducidas a proteínas. Son múltiples las funciones que se han descrito hasta el momento de éstas partículas de ARN, pero su papel en la tumorigénesis es el que más interés ha despertado. Su utilidad como marcador diagnóstico y pronóstico ha sido descrito en diversas neoplasias tanto sólidas como hematológicas.

### OBJETIVOS

- 1.- Determinar la expresión diferencial de microARNs entre los 2 tipos de linfomas cutáneos de células B primarios indolentes (linfoma de la zona marginal y linfoma centro folicular).
- 2.- Determinar si la expresión de microARNs en ambos linfomas tiene valor pronóstico.
- 3.- Determinar si la expresión de microARNs dentro de la muestra tumoral proviene de los linfocitos tumorales ó de las células acompañantes del tumor.

## MATERIAL Y MÉTODO

Se ha estudiado una serie de 68 casos de linfomas B cutáneos primarios (30 LZM, 38 LCF) recogidos de forma secuencial retrospectivamente con carácter multiinstitucional. De ellos, disponíamos datos clínicos en 57 casos, que se usaron posteriormente para los análisis estadísticos.

Se estudiaron 11 microARNs (miR150, miR155, miR331, miR221, miR222, miR223, miR15a, miR16, miR17, miR19a, miR93) junto con 2 controles endógenos: RNU 44 and RNU6b, cuyo análisis de expresión fue realizada mediante Applied Biosystems 384-well multiplexed real-time PCR assay con 250 ng del total de ARN. Los valores Ct (valor medio) fueron exportados a los ordenadores donde se utilizó el software SDS (SDS2.3), y se analizaron con Real-Time StatMiner software (INTEGROMICSTM; [www.Intergromics.com](http://www.Intergromics.com)). En el análisis estadístico se realizó un T test para determinar la diferencia de expresión entre ambos grupos de linfomas (LZM vs LCF) y una regresión de Cox para correlacionar la expresión de cada miRNA con el pronóstico. Para ello se utilizó el programa SPSS 15.0.

Para validar el origen tumoral de la expresión de los miRNAs se realizó una microdissección, con el microscopio Axio Observer de Carl Zeiss y a través del software Palm-microbeam, de los diferentes compartimentos celulares. Posteriormente se cuantificó de nuevo la expresión de los miRNAs que habían presentado significación estadística previa.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN:

Los microARNs son pequeños fragmentos de ARN no codificante cuyo papel etiopatogénico en las neoplasias, cada día es mayor. Hay mayor evidencia de la diferencia de expresión entre las células patológicas y las células sanas en diversos tumores. La expresión diferencial de los mismos ya ha quedado patente en la línea celular linfoide, en la cual la expresión de diversos miRNAs se relaciona con el estadio de diferenciación celular B. Existen múltiples ejemplos del valor de estos microARNs como factor diagnóstico y pronóstico en muchos cánceres.

A pesar del aumento del número de estudios de miRNAs en linfomas sistémicos, son escasos los estudios sobre expresión de miRNAs en linfomas cutáneos, existiendo sólo datos sobre linfomas cutáneos de células T. No existe nada hasta el momento sobre la expresión de miRNAs en linfomas B cutáneos primarios.

Ante la aparente relación entre la expresión de miRNAs según el estadio de diferenciación celular B, decidimos investigar la expresión de una serie de miRNAs en el grupo de linfomas cutáneos primarios indolentes (linfoma de la zona marginal y centro folicular). Basándonos en la literatura seleccionamos 11 miRNAs que ya habían sido descritos en células B normales o células de linfomas sistémicos.

Se estudió la expresión de los 11 miRNAs en el set de 68 linfomas cutáneos primarios, pero sólo la expresión de miR-150 fue estadísticamente significativo entre ambos grupos ( $FDR < 0.1$ ), siendo mayor la expresión en el grupo de linfomas de la zona marginal. La disección por laser confirmó que el origen de miR150 y miR155 procedía del compartimento extracentro germinal y de las células CD20+ neoplásicas. Estos resultados sugieren que los niveles de miR150 en linfomas de la zona marginal está parcialmente relacionado con la presencia de células en un estadio postcentro germinal, que son las que se constituyen dicho tumor. Sin embargo, la expresión de miR150 también se expresaba en las células CD3+ no neoplásicas del microambiente (aunque en menor medida que en las células CD20+ neoplásicas), lo que nos hace pensar que el microambiente tumoral influye en el desarrollo tumoral.

Ante la falta de marcadores pronóstico en linfomas cutáneos indolentes (ya que los índices pronósticos existentes sólo son válidos para linfomas difusos de células B grandes, tipo piernas), hipotetizamos que estos miRNAs podrían ser marcadores moleculares pronósticos en los linfomas B cutáneos primarios indolentes.

Investigamos la asociación entre la expresión de miRNAs y el pronóstico clínico en el set de 57 casos de los que disponíamos datos clínicos. Mediante regresión univariante de Cox obtuvimos que miR155 y miR150 se correlacionaban directamente con el pronóstico (PFS mayor) ( $p < 0.1$ ). La menor expresión de ambos miRNAs en el diagnóstico aumenta el riesgo de progresión cutánea en el total de la serie ( $p < 0.1$ ), pero tras la estratificación de casos según el grupo histológico, sólo se valida en el grupo de linfoma de la zona marginal. Esto se ratifica al estratificar los valores de expresión de miR150 y miR155 según la mediana de expresión de los mismos (considerando dicha expresión como una variable continua). Se obtuvo que la expresión de ambos miRNAs se correlaciona positivamente con la PFS (long Rank test,  $p < 0,05$ ) en toda la serie y de nuevo se valida sólo en el grupo de linfoma de la zona marginal.

MiR-155 está implicado en la regulación del sistema inmune, sobre todo en la maduración de las células B. Este microARN se necesita para la regulación de la respuesta de las células B a los antígenos, y este efecto parece estar regulado directamente por la proteína PU.1. MiR-155 tiene una principal función como supresor de tumores, ya que reduce las traslocaciones generadas por la proteína AID durante la hipermutación somática.

La infraexpresión de miR150 también se encontraba relacionada con un tiempo hasta progresión más corta. La diferencia de expresión entre ambos grupos histológicos puede explicar que la pérdida de expresión de dicho miRNA se asocie sólo al peor pronóstico cutáneo en linfomas de la zona marginal.

**CONCLUSIÓN:**

Hemos encontrado que ciertos miRNAs, en particular miR-155 y miR-150, tienen valor pronóstico en pacientes con linfomas cutáneos B primarios indolentes, tipo zona marginal. La expresión de estos miRNAs puede ser medido fácilmente usando ARN extraído de muestras de tejido en parafina. La pérdida de la expresión de dichos miRNAs está asociada con el peor pronóstico de dichos pacientes. El mecanismo por el cual se produce este peor pronóstico permanece oscuro y necesita más estudios para ser aclarado, al igual que hasta el momento no tenemos dianas genéticas que puedan implicarse en este tipo de linfomas, que nos permita entender mejor la etiopatogenia de los mismos



# INTRODUCCIÓN

## INTRODUCCIÓN:

### **LINFOMAS CUTÁNEOS PRIMARIOS DE CÉLULAS B**

#### ***Definición:***

Los linfomas son tumores clonales de células maduras e inmaduras B, T y natural killer (NK). Los linfomas de células B y T en muchos aspectos parecen la contrapartida maligna de los estadios de diferenciación normal de los linfocitos B y T. Aún así, existen ciertos linfomas (sobre todo sistémicos) en que no hay estadio normal de diferenciación celular linfoide que corresponda con la contrapartida maligna<sup>1</sup>. La mayoría de los linfomas se desarrollan en los órganos linfoides; sin embargo, éstos pueden invadir o desarrollarse en cualquier órgano. Los órganos dianas más afectados son los ganglios linfáticos, seguidos del bazo y la médula ósea, mientras que la piel, es un órgano que se suele afectar en menor proporción.

Los linfomas que afectan primariamente la piel se clasifican según la estirpe celular, en linfomas cutáneos primarios de células T (LCCT) y linfomas cutáneos primarios de células B(LCCB). El interés de este trabajo se centra en el grupo de linfomas cutáneos primarios de células B.

Los linfomas primarios cutáneos de células B, son procesos linfoproliferativos que se manifiestan inicialmente en piel, sin evidencia de enfermedad extracutánea al diagnóstico (a diferencia de lo que ocurre con los linfomas sistémicos). En fases avanzadas de la enfermedad, estos linfomas pueden diseminarse a otros órganos, entre ellos ganglios linfáticos y médula ósea. Inicialmente, este grupo de linfomas se englobaba dentro de los linfomas sistémicos, pero sus características clínicas, su buen pronóstico en general y sus peculiaridades histopatológicas han evidenciado que se trata de un grupo aparte.

#### ***Evolución histórica:***

La primera descripción de un linfoma fue publicada en 1832 por Thomas Hodgkin, lo que motivó que un tipo específico de linfoma llevara su nombre<sup>2</sup>. Inicialmente se separaron dos grandes grupos de linfomas: linfomas de Hodgkin (LH) y linfomas no Hodgkin (LNH).

Antes de los años ochenta, los LCCB primarios no se consideraban una entidad propia, sino que se consideraban una manifestación extraganglionar de las formas sistémicas. Por tanto, se incluían dentro de las clasificaciones de linfomas sistémicos propuestas por los hematopatólogos. Inicialmente, aquellos

linfomas con afectación cutánea con buen pronóstico y que respondían al tratamiento se catalogaban como pseudolinfomas<sup>3-6</sup>.

En 1980 con el desarrollo de las técnicas inmunohistoquímicas, se comenzaron a clasificar y a distinguir diferentes subtipos dentro de los linfomas. El desarrollo de los sistemas de detección de restricción de cadenas ligeras en los procesos malignos linfáticos facilitó el diagnóstico de los linfomas y su distinción de los procesos reactivos, como la hiperplasia linfoide, además de ser utilizado como criterio mayor para distinguir a los LCCB primarios<sup>7</sup>. Durante este período, la clasificación de Kiel fue la más utilizada para clasificar los linfomas sistémicos B. Los LCCB primarios estaban incluidos dentro de éstos con términos como inmunocitomas, linfomas centroblasticos/centrocíticos, o linfomas inmunoblásticos. Ante la publicación de series largas que trataban de separar estos linfomas de las formas sistémicas, se llegó a la conclusión de que los LCCB primarios eran entidades diferentes, con buen pronóstico y respuesta excelente al tratamiento<sup>8,9</sup>.

En 1994, Willemze y colaboradores propusieron una clasificación (the Dutch classification) específica para los LCCB primarios, aunque siguiendo la terminología de la clasificación Kiel. Esta clasificación fue asumida por la EORTC como clasificación de la EORTC para linfomas cutáneos primarios<sup>10</sup>, en la que por primera vez se distinguieron 3 subtipos principales dentro de los LCCB (inmunocitoma primario cutáneo, incluido posteriormente dentro de los linfomas cutáneos de la zona marginal, linfoma centro folicular primario y linfoma B de células grandes de las piernas).

En 2001, la clasificación de la OMS de tumores hematopoyéticos y del tejido linfoide sustituyó a la clasificación REAL, que había reemplazado previamente a la de Kiel. Esta clasificación no distinguía a los LCCB primarios como entidad aparte, pero reconocía al linfoma de la zona marginal como una forma extraganglionar<sup>11</sup>. En esta clasificación los linfomas del centro germinal con patrón de crecimiento folicular fueron considerados como una forma cutánea de los linfomas foliculares, mientras que aquellos con un patrón de crecimiento difuso se consideraron una variante de los linfomas B difuso de células grandes<sup>12</sup>.

Debido a la diferente terminología utilizada entre la clasificación de la OMS y la de la EORTC, la confusión a la hora de catalogar los diferentes linfomas cutáneos primarios fue importante, y varias publicaciones intentaron encontrar concordancias. El mayor problema se encontraba a la hora de clasificar los linfomas foliculares, debido a la ausencia de la traslocación t(14:18) y de expresión de bcl-2<sup>13,14</sup>, así como la dificultad para distinguir a los linfomas B difusos de células grandes<sup>15</sup>.

Pero no fue hasta 2005, cuando la controversia sobre la clasificación de los LCCB finalizó gracias a la publicación de la clasificación OMS-EORTC, que permitió catalogar a los LCCB como grupo independiente<sup>16</sup>,

en la que se aunaban los puntos más destacados e importantes de las dos clasificaciones previas, formando un consenso entre ambas (**Tabla 1**).

## Clasificación linfomas cutáneos primarios

### Linfomas cutáneos de células T y NK

- Micosis fungoide
- Variantes Micosis fungoide
  - MF foliculotropa
  - Reticulosis pagetoide
  - Piel laxa granulomatosa
- Síndrome de Sézary
- Leucemia/linfoma de células T del adulto
- Desórdenes linfoproliferativos primarios cutáneos CD30+
  - Linfoma primario cutáneo de células grandes anaplásico
  - Papulosis linfomatoide
- Linfoma de células T paniculítico
- Linfoma extranoatl NK/T, tipo nasal
- Linfoma cutáneo primario periférico de células T, inespecíficos (provisionales)
  - Linfoma primario cutáneo agresivo epidermotrópico de células T CD8+
  - Linfoma de células T gamma/delta
  - Linfoma primario cutáneo pleomórfico de células T cd4+ de pequeño/mediano tamaño

### Linfomas cutáneos primarios B

- Linfoma primario cutáneo de células B de la zona marginal
- Linfoma primario cutáneo folicular
- Linfoma primario cutáneo de células grandes B difuso, tipo piernas
- Linfoma primario cutáneo de células grandes B difuso, otros
  - Linfoma de células B intravascular

### Neoplasias de precursores hematológicos

- Neoplasia hematodermico CD+/CD56+

1

Tras la publicación de la clasificación OMS-EORTC, el grupo de Willemze publicó una serie de 300 casos de LCCB para ver los cambios en su diagnóstico según ambas clasificaciones (EORTC (1997) y OMS-EORTC (2005))<sup>17</sup>. De los 300 casos, no se observaron diferencias de clasificación en el grupo de linfomas de la zona marginal. Sin embargo, de los 169 casos inicialmente considerados según la EORTC como linfomas del centro folicular, 162 se reclasificaron según la clasificación de la OMS-EORTC en centro foliculares y los 7 restantes como linfomas B de células grandes, tipo piernas. La correlación entre OMS y OMS-EORTC no varió en el grupo de linfomas centro foliculares, pero sí en aquellos que se clasificaron inicialmente como linfomas B de células grandes, tipo piernas (60), que al reclasificarlos según la OMS-EORTC, 51 casos permanecieron siendo linfomas B de células grandes, tipo piernas, mientras que 9 pasaron a formar parte de los centro foliculares. De igual forma, al reclasificar los casos de la clasificación EORTC, de 167 casos clasificados inicialmente como linfomas B difusos de células grandes, al reclasificarlos según la OMS-EORTC, 109 casos se diagnosticaron como centro foliculares y 58 como linfomas de células B grandes, tipo piernas<sup>18</sup>.

<sup>1</sup> **Tabla 1.- Clasificación OMS-EORTC.** Clasificación más reciente (2005) que engloba a los LCCB.

Por tanto, cabe decir, que con la nueva clasificación el diagnóstico varía, lo cual a su vez modifica la forma de enfrentarse al tipo de linfoma y la forma de manejo y tratamiento. Para poder aunar terminología se muestra a continuación una tabla que correlaciona las diferentes clasificaciones que han englobado a los LCCB (**Tabla 2**).

CLASIFICACION KIEL	CLASIFICACIÓN EORTC	CLASIFICACIÓN REAL	CLASIFICACIÓN OMS-EORTC
Inmunocitoma Plasmocitoma	Linfoma primario cutáneo inmunocitoma/linfoma B zona marginal	Linfoma B zona marginal extranodal de las mucosas (MALT) Plasmocitoma	Linfoma B cutáneo primario de la zona marginal
Linfoma centroblástico/centrocítico o centroblástico	Linfoma cutáneo primario centro folicular	Linfoma B cutáneo primario centro folicular Linfoma difuso de células grandes	Linfoma B primario cutáneo centro folicular
Linfoma centroblástico Linfoma inmunoblástico	Linfoma cutáneo primarios de células B grande, tipo piernas	Linfoma B difuso de células grandes	Linfoma B cutáneo primario difuso de células grandes, tipo piernas
Linfoma centroblástico Linfoma inmunoblástico	Linfoma cutáneo primarios de células B grande, no tipo piernas	Linfoma B difuso de células B grandes	Linfoma B cutáneo primario difuso de células grandes, no tipo piernas

2

### ***Características clínicas e histológicas de los LCCB:***

Los LCCB primarios son el segundo grupo de linfomas B extraganglionares más frecuente, después de los linfomas gastrointestinales. Dentro de las formas primarias cutáneas, los LCCB son el segundo grupo de linfomas más frecuentes (20-25%)<sup>10,19</sup>, después de la micosis fungoide. Los LCCB engloban 4 grupos principales de tumores: linfomas de la zona marginal, linfomas del centro folicular, linfomas B de células grandes difusos, tipo piernas, y linfomas B de células grandes difusos, otros.

<sup>2</sup> **Tabla 2.- Correlación diferentes clasificaciones de linfomas cutáneos primarios B**

Los linfomas cutáneos primarios de células B de la zona marginal (LZM), son un grupo de linfomas indolentes. Clínicamente se caracterizan por la presencia de lesiones solitarias o múltiples, tipo pápula, nódulo o tumor, eritemato-violáceas, de localización preferentemente en extremidades, aunque se pueden presentar en cualquier localización (**Figura 1**). Suelen ser clínicamente asintomáticos. Son linfomas de bajo grado, sin tendencia a la diseminación extracutánea, aunque pueden recurrir en piel (variable según las series, 23%-33%<sup>20,21</sup>), tanto en zonas previamente afectas o a distancia. El tiempo de aparición de las recidivas es variable, desde meses hasta años desde la primera manifestación<sup>20</sup>. La diseminación extracutánea es extremadamente rara.

Histológicamente, están formados por una celularidad polimorfa (linfocitos B pequeños tipo centrocito, células grandes, células monocitoides, células linfoplasmocitoides y células plasmáticas). En el 65% de los casos, las células neoplásicas simulan zonas del manto aberrantes<sup>20</sup>. Es característica la presencia de grupos de células plasmáticas maduras monoclonales rodeando periféricamente el infiltrado de centrocitos. Además, es muy típica la ausencia de epidermotropismo, dejando una zona grenz por debajo de la epidermis. Es característico que el infiltrado linfocitario se agregue de forma nodular alrededor de los folículos pilosos y estructuras ecrinas<sup>11,22</sup>. Inmunohistoquímicamente destaca la positividad para CD20, CD79alfa y bcl-2 tanto en los centrocitos como en las células linfoplasmocitoides, mientras que CD5, CD10, bcl-6 y MUM1 son negativos. Son varios los artículos publicados en que se ha descrito la presencia de células CD30 positivas<sup>11,20,21</sup>. Las células plasmáticas a su vez presentan restricción para la cadena ligera (lambda o kappa) de las inmunoglobulinas. Dentro de este grupo se engloban los antiguamente denominados inmunocitomas y plasmocitomas. Estudios recientes han descrito en este subgrupo mutaciones (t(14:18)) similares a las descritas en linfomas ganglionares tipo zona marginal<sup>16,23</sup> (ver más adelante en etiología de LCCB).

La supervivencia a los 5 años se estima en un 95-99%<sup>7,11,22,24,25</sup>.



Los *linfomas cutáneos primarios de células B centro foliculares o de centro germinal (LCF)* se caracterizan clínicamente, al igual que los LZM, por manifestarse como lesiones asintomáticas únicas o múltiples en forma de placas, tumores o nódulos, de localización preferentemente cefálica o troncal (**Figura 2**), más raramente se localizan en miembros. La presentación en forma de múltiples lesiones diseminadas cutáneas no conlleva un peor pronóstico<sup>26</sup>. Si las lesiones se dejan sin tratar, suelen crecer en tamaño y número. La diseminación cutánea se estima en un 58%<sup>27</sup>, mientras que la extracutánea es menor (19%)<sup>27</sup>.

Histológicamente, según la actual clasificación de la OMS-EORTC, están constituidos por células polimorfas entre las que se reconocen centrocitos y centroblastos, con un infiltrado T acompañante. Las lesiones de este tipo de tumores se caracterizan porque al aumentar el crecimiento de la lesión aumenta la cantidad de células B, mientras que el componente T acompañante disminuye. Pueden presentar un patrón folicular bien definido, difuso ó mixto. Como se ha hablado en apartados previos, inicialmente este tipo de linfoma sólo englobaba aquellos linfomas con patrón folicular, aunque tras publicaciones posteriores, se incluyeron las formas con patrón difuso, ya que previamente algunas de estas formas se incluían dentro de los linfomas B difusos de células grandes, tipo piernas<sup>28</sup>. Presentan inmunohistoquímicamente positividad para CD20, CD79alfa y bcl-6, mientras que son mayoritariamente negativos para bcl-2, MUM-1 y FOXP1<sup>13,28-34</sup>. La ausencia de inmunoglobulinas en superficie es común, sobre todo en formas tumorales avanzadas.

<sup>3</sup> **Figura 1** .- **Linfoma B de la zona marginal (LZM)**. Se ilustran 3 formas de presentación de este tipo de tumor. Normalmente se presentan como nódulos aislados en cualquier localización, aunque pueden ser también lesiones múltiples.

La supervivencia a los 5 años se estima en 95%<sup>13,34-39</sup>.



Los *linfomas B cutáneos primarios difusos de células grandes, tipo piernas (LCGP)*, son el subgrupo más agresivo de los LCCB primarios. Clínicamente se manifiestan, sobre todo en mujeres de edad avanzada, como grandes lesiones tumorales de aspecto contusiforme, en piernas, aunque existen casos descritos fuera de miembros inferiores (**Figura 3**). Se estima que hasta un 15% de las lesiones aparecen fuera de las piernas. Su diseminación extracutánea es frecuente.

Histológicamente están constituidos por grandes masas de células monomorfas de aspecto centroblastico o inmunoblastico con patrón difuso en sábana, ausencia de epidermotropismo, y frecuente invasión perivascular. En la IHQ expresan CD20, CD79alfa, bcl-2, MUM-1 y FOXP1, y algo menos bcl-6. CD10 es negativo<sup>31,32,34,37,40,41</sup>. Son de todas las formas de LCCB los que tienen un peor pronóstico con una supervivencia del 50% a los 5 años<sup>26,37,42,43</sup>.

<sup>4</sup> **Figura 2.- Linfoma B centro folicular (LCF).** Neoplasia que suele manifestarse como nódulos eritematoso, duros, de consistencia gomosa con mayor predisposición a la localización cefálica, aunque se puede localizar en cualquier parte del cuerpo. Suele ser más frecuente su presentación como nódulos múltiples.



<sup>5</sup> **Figura 3.- Linfoma de células grandes, tipo piernas (LCGP).** Linfoma que suele manifestarse como grandes nódulos de localización principalmente en piernas, siendo muy frecuente su rápida evolución a nódulos ulcerados.

<sup>6</sup> **Figura 4.- Subtipos clínicos de LCCB.** Se presentan las características clínicas más relevantes diferenciales entre los 4 subtipos histológicos más importantes de LCCB, aparte de las características histológicas y la supervivencia global.

### SUBTIPOS LINFOMAS CUTANEOS PRIMARIOS B (LCCB)

ZONA MARGINAL	CENTROFOLICULAR	CÉLULAS GRANDES TIPO PIERNAS	CÉLULAS GRANDES, OTROS
<p>Único o múltiple Miembros/tronco Rara diseminación extracutánea</p> <p>Polimorfo IgH</p> <p>Supervivencia global 95% a 5 años</p>	<p>Único o múltiple Cabeza o tronco Diseminación extracutánea 5-10%</p> <p>Polimorfo Hipermutación cadenas Ligeras y pesadas</p> <p>Supervivencia global 95% a 5 años</p>	<p>Único o múltiple Miembros Diseminación extracutánea frecuente</p> <p>Células grandes monomorfas</p> <p>Supervivencia global 50% a 5 años</p>	<p>Único o múltiple Cualquier localización Diseminación extracutánea frecuente</p> <p>Células grandes monomorfas</p> <p>Supervivencia global 50% a 5 años</p>

6

Los linfomas cutáneos primarios difusos de células grande B, otros (LCG otros), se considera un cajón de sastre en el que se engloban aquellos linfomas cutáneos de células B que no se pueden encuadrar dentro del grupo de linfomas foliculares ni de LCGP. Inicialmente formaban parte del gran grupo de los linfomas B difusos de células grandes. Actualmente, en este grupo según la clasificación OMS-EORTC se incluyen los linfomas constituidos por células grandes que no se pueden catalogar dentro de los LCF o de los LCGP.

**Diagnóstico, estadificación y factores pronósticos de LCCB:**

La EORTC propuso unas guías de consenso de diagnóstico, estadiaje y manejo de los LCCB en 2008. Para el diagnóstico de dichos linfomas se propone, además de una historia clínica con exploración física exhaustiva, una biopsia en fresco con tinción de hematoxilina y eosina e inmunohistoquímica. Para el diagnóstico definitivo, se sugiere un despistaje extracutáneo mediante tomografía axial computerizada (TAC) que englobe tórax, abdomen y pelvis, con extensión a cuello en caso de palpase adenopatías, además de una biopsia de médula ósea para descartar invasión por células tumorales<sup>44</sup>.

En el diagnóstico inicial de los LCCB, los expertos consideran necesario que la biopsia sea excisional y no un punch, ya que la información que se obtiene es menor con ésta última técnica. Con respecto al estudio histológico, consideran básico la utilización de una batería estándar que incluya: CD3, CD20, CD43 y

CD79a para confirmar el origen B de las células tumorales; el uso de inmunoglobulinas de superficie; CD35 y CD21 para visualizar los folículos reactivos; Ki67 para determinar el índice proliferativo del tumor; marcadores para diferenciar los diferentes subtipos tumorales como son Bcl2, Bcl6, CD10, MUM1 y FOXP1; además de las tinciones con anticuerpos para CD5 y ciclina D1, que permiten diferenciar los LZM (CD5-, ciclina D1-) de los linfomas de células del manto sistémicos (CD5+, ciclina D1+) y de las infiltraciones cutáneas por leucemias linfocíticas (CD5+, ciclinaD1-). Además del estudio inmunohistoquímico, es de utilidad la realización del reordenamiento genético de la cadena pesada de la inmunoglobulina (IgH) para diferenciarlos de las hiperplasias linfoides, que no reordenan; y la detección de restricción de cadenas ligeras en el corte histológico, que permite diferenciar los pseudolinfomas que no presentan restricción de cadenas ligeras, de los linfomas que sí presentan dicha restricción<sup>44</sup>.

Existe controversia en la necesidad de la realización de una biopsia de médula ósea<sup>44-46</sup> en estos pacientes, ya que se trata de una técnica invasiva. En el trabajo de Quereux y colaboradores<sup>46</sup>, tras analizar 57 casos de LCCB, sólo obtuvieron alteración en la médula ósea en 3 casos (5.7%), y como bien afirman ellos, el hecho de presentar células linfoides atípicas en médula no cambia el tratamiento de los pacientes, puesto que la afectación suele ser mínima, por tanto en su opinión no es necesario hacer una biopsia de médula si el TAC y las pruebas analíticas no presentan alteraciones. Por otro lado, en la guía de la EORTC consideran oportuno realizar una biopsia ó aspirado de médula en aquellos casos de LCGP, mientras que no sería necesario en los linfomas indolentes (LZM y LCF)<sup>47</sup>.

A pesar de ello, Senff y colaboradores consideran necesaria la realización de la biopsia o del aspirado de médula ósea, para poder diagnosticar a un LCCB como primario cutáneo<sup>44</sup>.

Otro de los elementos controvertidos en el manejo de los LCCB, sobre todo del tipo zona marginal, es la necesidad de realización de serologías de *Borrelia*<sup>11,48-50</sup>, ya que en países americanos y centroeuropeos sí se ha visto cierta relación entre el desarrollo de linfomas cutáneos y la detección de ADN de *Borrelia* mediante PCR en tejido de linfoma, mientras que en el resto de Europa, dicha asociación no es tan constante (ver en etiopatogenia de LCCB).

La estadificación de los LCCB se realiza con la clasificación TNM para linfomas cutáneos primarios diferentes de micosis fungoide y síndrome de Sézary, de la EORTC<sup>47</sup>. Antes de considerarse un grupo aparte de las formas ganglionares, se utilizaba el sistema de estadificación de Ann Arbor, por tanto, de entrada eran considerados un estadio IV. Objetivamente, este sistema de estadificación no era útil, puesto que el pronóstico de los linfomas cutáneos es excelente, mientras que los estadios IV de las formas ganglionares tienen un pronóstico nefasto. Actualmente, la estadificación TNM utilizada permite unificar criterios a la hora de comparar los linfomas B cutáneos primarios (y linfomas T distintos de micosis fungoide y síndrome

de Sézary)<sup>49</sup> (**Tabla 3**). Con el sistema TNM, en el diagnóstico inicial, cualquier LCCB debe de ser N0 y M0, ya que por definición no tienen afectación ganglionar ni visceral, siendo por tanto estos ítems útiles a la hora de predecir las recidivas y valorar la progresión de la enfermedad. En un estudio llevado a cabo por Senff y colaboradores<sup>49</sup>, se intentó validar dicho sistema de estadificación con 300 casos de LCCB (71 LZM, 171 LCF y 58 LCGP). En este estudio concluyeron que el sistema TNM era fácil de aplicar en la estadificación de los LCCB, pero no presentaba valor pronóstico en los casos de linfomas indolentes (LZM y LCF), aunque sí en los casos LCGP, ya que aquellos con T más elevado tenían peor pronóstico y menor supervivencia.

## ESTADIFICACIÓN LCCB

- T: extensión en piel
  - T1**: lesión única en piel
    - T1a**: lesión única <5 cm diámetro
    - T1b**: lesión única >5 cm diámetro
  - T2**: múltiples lesiones en una zona del cuerpo o 2 regiones contiguas.
    - T2a**: lesiones ocupan área <15 cm
    - T2b**: lesiones ocupan área 15-30 cm
    - T2c**: área >30 cm
  - T3**: lesiones generalizadas (más de 2 áreas no contiguas)
    - T3a**: 2 áreas no contiguas
    - T3b**: > o = 3 áreas
- N: ganglios
  - N0**: no evidencia clínica o anatomopatológica de afectación ganglionar
  - N1**: afectación de 1 cadena ganglionar cercana al área de drenaje a la/s lesión/es cutánea/s
  - N2**: afectación 2 o más cadenas ganglionares
  - N3**: afectación cadenas ganglionares centrales
- M: afectación extracutánea y extraganglionar
  - M0**: no evidencia de metástasis orgánicas
  - M1**: presencia de metástasis orgánicas

El pronóstico de los LCCB depende del subtipo histológico. Así, los LZM y LCF se consideran linfomas indolentes, con muy buen pronóstico y una supervivencia global a los 5 años del 95%, mientras que los linfomas LCGP son muy agresivos, con una supervivencia global de 50% a los 5 años<sup>49</sup>. Los linfomas indolentes, pese a su elevada supervivencia, suelen presentar una gran tasa de recidiva a lo largo de su evolución. Dicha recidiva suele ser cutánea, de alrededor del 20 al 60%<sup>20,26,49,51</sup> (23-33%<sup>20</sup> en LZM, 58%<sup>27</sup> en LCF), mientras que las recidivas extracutáneas se estiman entre el 8 al 10% (8.5% LZM, 10% LCF)<sup>49</sup>.

<sup>7</sup> **Tabla 3.- Estadificación LCCB.** Estadios TNM utilizado en linfomas cutáneos primarios no micosis fungoide ni síndrome de Sézary.

Las guías e índices pronósticos en LCCB son escasas y la mayoría determinan factores pronósticos para linfomas tipo piernas<sup>26,49,51</sup>. El sistema TNM fue desarrollado para estadificar los LCCB, y servir de herramienta pronóstica. Como se ha comentado en párrafos previos, dicha utilidad pronóstica, sólo es válida para los LCGP<sup>49</sup>. El número de lesiones se ha considerado clásicamente un factor pronóstico predictivo en los LCCB. Aún así, Kodama y colaboradores<sup>52</sup> no observaron diferencias estadísticamente significativas en la supervivencia entre casos con una única lesión y múltiples, mientras que Zinzani y colaboradores<sup>53</sup> objetivaron en una serie de 467 pacientes que los linfomas indolentes (LZM y LCF) con lesiones únicas tenían mayor supervivencia global que aquellos con múltiples.

A pesar de ello, la mayoría de artículos de la literatura se han basado en los linfomas B difusos de células grandes (según antiguas clasificaciones), para determinar diferentes factores pronósticos. El grupo de Smith en 2005<sup>54</sup> propuso un índice pronóstico que distinguía 4 grupos pronósticos (IA: formas indolentes histológicas con cualquier afectación cutánea; IB: formas difusas B de células grandes con afectación de zonas cutáneas favorables ( cabeza, cuello y brazos); II: formas difusas B de células grandes con afectación de zonas cutáneas no favorables (tronco, piernas y formas diseminadas); III: formas inmunoblásticas con afectación de zonas cutáneas no favorables)). Este índice pronóstico se basa en el tipo histológico y en la localización de las lesiones. Describieron que los grupos II y III presentaban una supervivencia a los 5 años menor que los grupos IA y IB (60% y 34% con respecto 94% y 86%, respectivamente). Aun así, con la aparición de la nueva clasificación OMS-EORTC, el uso del índice pronóstico de Smith y colaboradores no fue admitido.

Junto con los factores clínicos e histológicos, también se han propuesto otros factores pronósticos basados en la inmunohistoquímica. El grupo de Hallerman<sup>55</sup> concluyó que aquellos casos con tinción positiva para Bcl2, OCT2 y MUM1 presentaban peor pronóstico, mientras que los casos con tinción positiva para Bcl6, presentaban mejor pronóstico. En cierta manera, dicho patrón inmunohistoquímico también se corresponde con el tipo histológico LCGP, por lo que es lógico, que dicho patrón tenga peor pronóstico.

Recientemente se ha publicado un índice pronóstico (CLIPi) para linfomas B cutáneos indolentes (LZM y LCF) en el que se tienen en cuenta parámetros como los niveles de lactato deshidrogenasa (LDH), la morfología de las lesiones (nódulo versus otras lesiones) y el número de lesiones. El hecho de tener más de 2 lesiones es un factor pronóstico independiente de mal pronóstico en LCCB indolentes. Según este índice, los pacientes se agrupan en 3 grupos de riesgo: grupo de bajo riesgo, riesgo intermedio y riesgo alto, con tiempos libres de progresión de 91%, 64% y 48%, respectivamente. Este nuevo índice pronóstico predice pronóstico para tiempo libre hasta progresión (PFS), pero no es válido para supervivencia global<sup>56</sup>. Aún así, este nuevo índice pronóstico necesita estudios que lo validen.

Ante todos los datos reportados en la literatura, no existe hasta el momento ningún índice pronóstico perfecto que nos determine de forma fiable el riesgo de que un paciente con LCCB vaya a recaer ó tenga menor supervivencia, aun así, está claro a la vista de los datos previos, que el tipo histológico del linfoma es el principal factor a la hora de predecir el riesgo de recidiva y de progresión, siendo otro factor importante el número de lesiones al diagnóstico. A pesar de ello, se necesitan más estudios, y en un futuro los índices pronóstico se ampliarán con diferentes factores como la expresión proteica y genómica.

### **Tratamiento LCCB:**

El tratamiento de estos linfomas depende del número de lesiones y del tipo histológico. Según la guía de la EORTC<sup>44</sup> para el manejo de los LCCB, los tratamientos recomendados oscilan entre: cirugía, radioterapia, quimioterapia sistémica y rituximab (sistémica o intralesional). Se ha utilizado también con éxito el interferón y de forma anecdótica existen pocos casos publicados tratados con terapia fotodinámica<sup>57</sup>, cisplatino intralesional, antibióticos<sup>58,59</sup>, imiquimod tópico<sup>60</sup> y corticoterapia tópica e intralesional<sup>61</sup>.

En una amplia revisión de todos los tratamientos utilizados en LCCB realizada por Senff y colaboradores<sup>44</sup>, se concluye que el tratamiento con mejor respuesta y mayor tasa de remisión completa tanto en LZM, LCF como en LCGP es la *radioterapia* (99%, 99% y 88% de remisión completa, respectivamente), aunque la tasa de recidiva superó al 45% en los 3 subtipos histológicos<sup>44</sup>. Otro de los tratamientos con tasa de remisión completa próxima al 100% es la *cirugía excisional* en el caso de los LZM, con una tasa de recidiva del 43%, mientras que en los LCF la remisión completa se consigue en el 98%, con tasas de recidiva del 40%. La cirugía no se considera tratamiento de elección en los casos de LCGP, ya que suelen tratarse de casos con lesiones amplias, diseminadas y con mala respuesta a la cirugía.

El *interferón (IFN) alfa* es un tratamiento que se usa de forma intralesional a dosis de 3 millones de unidades (MU) 3 veces por semana, con una media de 8 semanas de tratamiento<sup>62</sup>. Existen 8 casos de LZM tratados con IFN con tasa de RC de 100% con recidiva del 25%<sup>62</sup>, 7 casos de LCF con tasas de respuesta también del 100% con recidiva del 29%<sup>44,63</sup>. No existen casos publicados de LCGP tratados con interferón<sup>44</sup>.

Otro tratamiento de gran utilidad y muy buenos resultados en LCCB es el *rituximab*, anticuerpo monoclonal murino antiCD20, tanto sistémico como subcutáneo, aunque por parte de dermatólogos es utilizado de forma intralesional, a pesar de no estar incluido en ficha técnica. Utilizado a dosis de 375 mg/m<sup>2</sup> i.v una vez a la semana, durante 4-8 semanas en el uso sistémico, mientras que la dosificación en el uso intralesional es más errática (10-30 mg 3 veces por semana 1 vez al mes)<sup>64</sup>, ya que no hay consenso firme

sobre la forma de utilización. De los casos publicados que se han tratado con rituximab intralesional, el 89% de los LZM respondieron con tasas de recidiva del 62%; en los LCF, el 83% respondió completamente, con recidivas del 40%. El uso intralesional no se ha utilizado en LCGP. El tratamiento intravenoso es ampliamente utilizado en linfomas sistémicos, mientras que en las formas cutáneas primarias, se han descrito 3 casos de LZM tratados con respuesta del 67%, con recidiva del 50%; 28 casos de LCF con respuesta del 75% y recidiva del 21%; y en el caso de los LCGP se ha utilizado en 13 casos con respuesta del 39%<sup>44</sup>. El uso de rituximab intralesional ha sido utilizado en una serie de 35 linfomas cutáneos primarios (17 LZM y 18 LCF) con una tasa de respuesta del 71%, con un tiempo medio de respuesta de 8 semanas. En 19 casos se presentaron reacciones adversas, siendo el dolor en el punto de inyección el más frecuentemente observado<sup>64</sup>.

El *clorambucil*, como quimioterápico sistémico, ha sido utilizado en LZM con respuesta del 64% y recidiva del 33%. Por otro lado, la quimioterapia combinada (CHOP, COP, R-CHOP) ha sido utilizada en los 3 tipos de LCCB, con respuestas variables desde 81% de los LCGP, hasta respuesta del 100% en LCF, con recidivas de más del 50% en las 3 variantes<sup>44</sup>.

Ante la diversidad de respuestas a los diferentes tratamientos en cada uno de los subtipos histológicos de LCCB, la EORTC publicó unas recomendaciones de tratamiento en estos tumores (**Tabla 4**). Así proponen utilizar en LZM con lesión única como primera línea radioterapia local, cirugía o antibióticos (siempre y cuando haya evidencia de *Borrelia*), dejando como segunda línea IFN, rituximab o esteroides intralesionales, mientras que cuando se trata de formas multifocales, recomiendan diferentes opciones: como esperar y ver, radioterapia local, clorambucil, rituximab sistémico, dejando el IFN, el rituximab intralesional o los corticoides como segunda línea.

En las formas de LCF con lesión única el tratamiento de elección sería la radioterapia local o la cirugía. En las formas localizadas se consideran como opciones: esperar y ver, radioterapia local o rituximab sistémico, dejando como segunda línea la quimioterapia. En cambio, en los LCGP, el tratamiento inicial tanto en formas localizadas como multifocales, es R-CHOP, dejando el rituximab sistémico como tratamiento secundario<sup>44</sup>.

TIPO LINFOMA	LINFOMA ZONA MARGINAL	LINFOMA CENTRO FOLICULAR	LINFOMA B DIFUSO CÉLULAS GRANDES, TIPO PIERNAS
Lesión única o múltiples localizadas	Cirugía Radioterapia local Antibióticos	Cirugía Radioterapia local	R-CHOP Rituximab IV
Multifocal	Esperar y ver Radioterapia local Clorambucilo <sup>a</sup> Rituximab IV o IL Antibióticos <sup>b</sup>	Esperar y ver Radioterapia local Rituximab IV	R-CHOP Rituximab IV

8

Son varios los ensayos multicéntricos y estudios experimentales que se han iniciado con nuevos medicamentos para tratar los LCCB: Yttrium-90 ibritumomab tiuxetan<sup>65</sup>, doxorubicina liposomal pegilado<sup>66</sup> o 131I-toximumab<sup>67</sup> en el tratamiento de LCGP o terapia génica con IFN- gamma mediado por adenovirus en LZM<sup>68,69</sup>.

<sup>8</sup> **Tabla 4.- Tabla resumen de tratamientos propuestos por EORTC para LCCB.** a) En caso de gran agresividad, b) En caso de evidencia de Borrelia. Modificada de 44. Senff NJ, Noordijk EM, Kim YH, et al. European Organization for Research and Treatment of Cancer and International Society for Cutaneous Lymphoma consensus recommendations for the management of cutaneous B-cell lymphomas. Blood. 2008;112:1600-1609.

### **ETIOPATOGENIA DE LOS LCCB**

La etiopatogenia de los LCCB está todavía por determinar aunque cada vez son más las referencias en la literatura que pretenden explicar el origen de este tipo de tumores. La etiología de estos linfomas se ha relacionado con alteraciones genéticas (pérdidas cromosómicas, mutaciones en genes oncogénicos o supresores de tumores), cambios epigenéticos como metilaciones y con factores medioambientales, sobre todo infecciosos. En este apartado se analizarán los factores etiopatogénicos relacionados con cada uno de los tres principales grupos (LZM, LCF y LCGP). Para ello es necesario conocer previamente el desarrollo de las células B normales.

### **DESARROLLO NORMAL DE LAS CÉLULAS B:**

Los linfocitos B y T son los efectores primarios de la respuesta inmune adaptativa. Su principal misión es reconocer los antígenos extraños, discriminar entre los antígenos propios y los ajenos y posteriormente producir células inmunológicas de memoria<sup>70,71</sup>.

El desarrollo de los linfocitos B se puede dividir en 3 pasos: una fase independiente de antígeno que ocurre principalmente en la médula ósea, una fase dependiente de antígeno que ocurre en los órganos linfoides periféricos y una tercera fase en la que los linfocitos B maduros se diferencian a células plasmáticas y de memoria. En todos estos pasos existen múltiples moléculas que controlan la evolución correcta de cada uno de los estadios. Uno de los elementos principales para dicho desarrollo es la expresión del receptor de células B (inmunoglobulinas de superficie) que varía a lo largo de la maduración de las células B.

Las inmunoglobulinas de superficie están formadas por dos cadenas pesadas idénticas y dos cadenas ligeras que se unen covalentemente por puentes disulfuro. La clase de un anticuerpo está definida por la estructura de su cadena pesada. Existen cinco clases de cadenas pesadas principales: inmunoglobulina (Ig) M, IgD, IgG, IgA e IgE. Sus propiedades funcionales distintivas son conferidas por el extremo carboxi terminal de la cadena pesada, donde no se une a la cadena ligera. Las cadenas están constituidas por secuencias de aminoácidos, unas son las secuencias carboxi terminales que son constantes tanto en las cadenas ligeras como en las pesadas (dominios C), y unas secuencias amino terminales que son variables y constituyen los dominios V. Los dominios V son los que otorgan la gran diversidad de reconocimiento para antígenos propios y extraños<sup>72</sup>. Casi cualquier sustancia puede provocar una respuesta inmunitaria por anticuerpos. La respuesta incluso a un solo antígeno es diversa y comprende numerosas moléculas de anticuerpos diferentes, cada uno con una afinidad única y una especificidad concreta. La colección completa de especificidad de anticuerpos disponibles en un individuo se conoce como repertorio de anticuerpos. La clonación de los genes que codifican las Ig demostró que el repertorio de anticuerpos se genera durante el

desarrollo de las células B por reordenamientos de ADN. Éstos combinan y ensamblan segmentos génicos diferentes de regiones V a partir de un grupo relativamente pequeño de secuencias de regiones V heredadas en cada locus. La diversidad se incrementa además por un proceso de hipermutación somática en células B maduras.

Las secuencias de ADN que codifican las regiones V y C de las cadenas de Ig están separadas por una distancia considerable en el genoma en todas las células excepto en los linfocitos del linaje B, en los que en un momento temprano de la ontogenia se producen reordenamientos (roturas y posteriores uniones) de la cadena del ADN, que los sitúan juntos. En la cadena ligera, cada dominio V se halla codificado por dos segmentos separados de ADN, son los denominados segmento génico V, y segmento génico de unión (segmento J). La unión de un segmento génico V a un segmento J crea un fragmento continuo de ADN que codifica la región V completa de la cadena ligera. Los segmentos génicos J están separados de los genes de la región C por ADN no codificante, y se unen a ellos por procesamiento del ARN después de la transcripción, y no por recombinación de ADN.

Las regiones V de la cadena pesada se hallan codificadas por tres segmentos génicos. Además de los segmentos génicos  $V_H$  y  $J_H$ , existe un tercer segmento, denominado segmento D (de diversidad), que está situado entre los segmentos  $V_H$  y  $J_H$ . Mediante recombinación se genera una región V completa de cadena pesada, en la que el segmento génico D se une a un segmento  $J_H$ . El segmento  $V_H$  se reordena con el fragmento previamente formado  $DJ_H$ , completando el exón de la región V de una cadena pesada. Posteriormente, como ocurre en la cadena ligera, toda la región V se ensambla por cambios postranslacionales con la región C.

Los segmentos génicos funcionales están organizados en tres grupos: kappa (cromosoma 2), lambda (cromosoma 22), segmentos de la cadena pesada (cromosoma 14).

Descrito el proceso de reordenamiento génico, cabe decir, que dicho proceso es secuencial, y permite a las células B desarrollarse independiente de antígeno. Este proceso inicial, como se ha comentado anteriormente, se lleva a cabo en la médula ósea. Las células más tempranas del linaje B se denominan, célula pro-B, en la que se produce el reordenamiento de los segmentos génicos de la cadena pesada. La célula pro-B pasa por un estadio pro-B temprano, donde  $D_H$  se une a  $J_H$ , y un pro-B tardío, en el que  $V_H$  se une a  $DJ_H$ . La recombinación  $VDJ_H$  se lleva a cabo en el ADN de doble cadena. Las enzimas encargadas de dicho proceso son las recombinasas (RAG1 y RAG2)<sup>73</sup>.

Con la unión  $VDJ_H$  se expresa la cadena  $\mu$  intacta (aunque se une a una pseudo cadena ligera, que permite la expresión en superficie de la misma, lo cual paraliza el proceso de reordenamiento génico de la cadena pesada. Todo este proceso se da en el estadio *pre-B*, que tiene totalmente reordenada la cadena

pesada de la inmunoglobulina, pero no la cadena ligera, es el receptor pre-B. La expresión del receptor pre-B permite poner en marcha el mecanismo de reordenamiento de la cadena ligera por activación de las recombinasas, que se inactivarán posteriormente tras el reordenamiento de la cadena ligera. Esto origina la expresión en superficie de un receptor de superficie (IgM) completo, originando una *célula B inmadura (naïve)*.

Las células B inmaduras sólo expresan en superficie IgM. La maduración de dichas células implica la migración desde la médula a tejidos linfoides secundarios y el procesamiento alternativo de transcritos para generar una célula B madura que coexpresa IgM e IgD. Es la fase dependiente de antígeno. Antes de ser liberada al torrente linfático, la célula B naïve pasa por la denominada *selección negativa*, donde es presentada a moléculas del propio cuerpo. Esto se lleva a cabo mediante dos mecanismos: la delección clonal, en la que los linfocitos inmaduros que se unen a antígenos multivalentes mueren en la médula antes de salir, y el fenómeno de anergia, en que los linfocitos expuestos a antígenos solubles, no muere pero se inactiva al retener la IgM intracelularmente, lo que bloquea la transducción de señales y no reaccionan ante dicho antígeno. Una vez pasada la fase de selección negativa, la célula B naïve sale al torrente linfático en dirección a los ganglios linfáticos, aunque una pequeña proporción migra al bazo (zona marginal de la pulpa blanca).

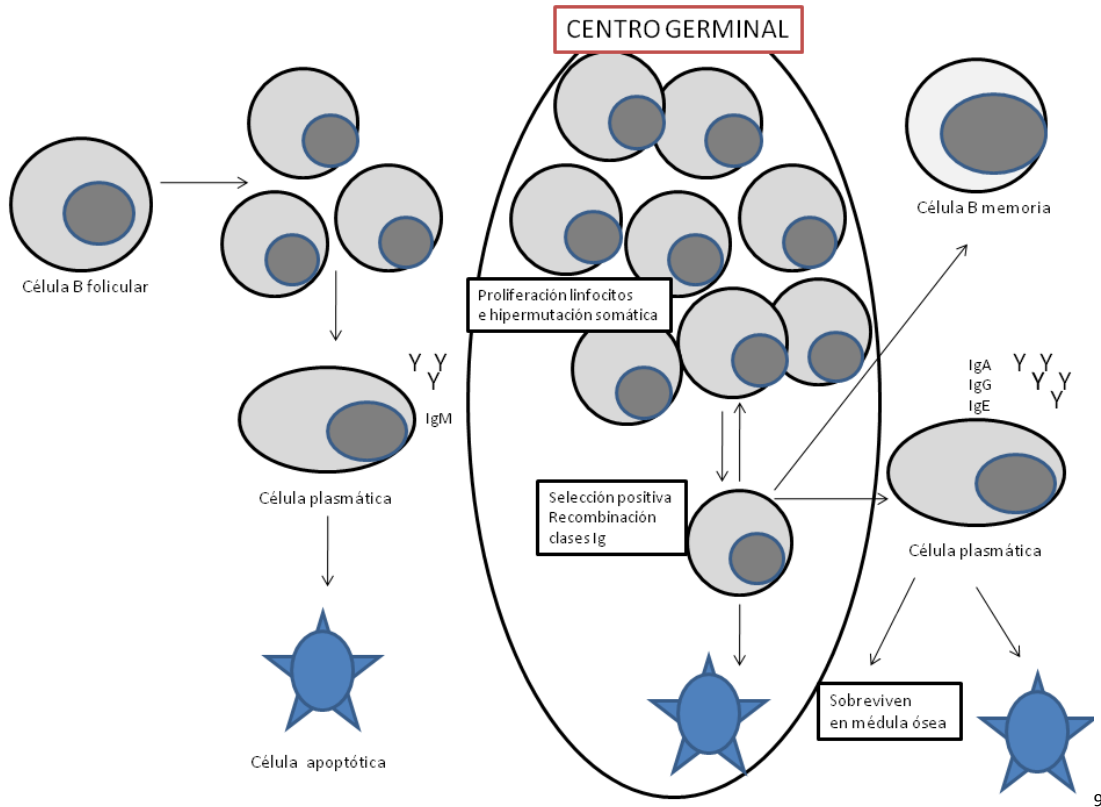
Ya en el ganglio linfático, la célula B naïve necesita a las células T y a las células dendríticas para activarse. Tras exponerse a las células T, las células B pueden transformarse en blastos o bien en células B que van a originar un centro germinal dentro del ganglio. Estas células B migran hacia el folículo primario del ganglio donde se desarrollan y forman las células denominadas *centroblastos*, que formarán un centro germinal. En el centro germinal, las células B proliferan intensamente y son sometidas a hipermutación somática en las regiones V reordenadas y se produce una selección de las células que llevan receptores con alta afinidad por el antígeno estimulador. Las células B que no se han expuesto a antígenos serán dirigidas a la zona del manto del folículo B secundario. Los centro germinales del ganglio están compuestos por una zona oscura que contiene centrocitos y una zona clara compuesta por centroblastos. Estas células se diferencian de las células maduras en su fenotipo y en su susceptibilidad a la apoptosis, ya que son CD10+ y bcl-6+, mientras que no presentan expresión de Ig en superficie y son bcl-2 negativas.

En el centro germinal se lleva a cabo la hipermutación somática<sup>74</sup>. La hipermutación somática es un mecanismo adicional que genera diversidad a través de la región V y que opera en células B en los órganos linfoides secundarios una vez los genes funcionales han sido ensamblados. Por este proceso se introducen mutaciones puntuales (inserciones y deleciones) en las regiones V de los genes reordenados de las cadenas pesada y ligera, con una tasa muy elevada, dando lugar a moléculas de Ig mutantes en la superficie de las células B. Algunas de estas moléculas mutantes unen el antígeno mejor que la Ig original, y las células que las

expresan son seleccionadas de forma preferencial para madurar a células plasmáticas. La hipermutación somática se produce cuando las células B responden a un antígeno. Los genes de la región C de las Ig no se ven afectados, mientras que todos los genes de región V experimentan mutaciones, incluso en aquellos casos de reordenamientos no productivos y que no se expresan.

En el centro germinal también se lleva a cabo la selección de antígenos (la selección positiva). Durante el proceso de selección positiva se produce en las regiones variables de las inmunoglobulinas una serie de mutaciones aleatorias, que se mantendrán según la afinidad de las inmunoglobulinas con los antígenos a los que se expongan. Las células B con selección positiva reciben una serie de señales químicas que originan la recombinación de los genes de Ig (hipermutación somática) y permite la diferenciación a células B memoria y finalmente la diferenciación a células plasmáticas<sup>75,76</sup>. Durante este proceso se produce la selección definitiva de inmunoglobulina de superficie (IgG, IgA, IgE). Se ha descrito que en esta fase se produce una disminución de expresión de bcl-6 y una mayor expresión de MUM1/IRF4 y de BLIMP-1<sup>76,77</sup>. Las células plasmáticas y las células B de memoria salen del centro germinal. Las células post germinales son células B de memoria con mínima expresión de IgD y con predominio de expresión de IgM, ó aquellas que han sufrido el cambio de clase y expresan IgG, IgA ó IgE. Estas son células que responden rápidamente proliferando y diferenciándose ante la exposición a un antígeno específico. Mientras las células plasmáticas migran a zonas de alta exposición de antígenos como son el sistema gastrointestinal y los pulmones, otras vuelven a la médula ósea.

Los tumores retienen muchas de las características de las células del que se originaron, siendo buen ejemplo de ello, los tumores de células B. En humanos se han encontrado tumores que corresponden prácticamente a todos los estadios del desarrollo B. Es destacable, que además, cada tipo de tumor suele mantener sus propiedades características de residencia. Por ejemplo, un tumor que este constituido por células parecidas a las células naïve maduras se localizará en folículos en los ganglios linfáticos y bazo, lo que origina un linfoma del centro folicular, mientras que un tumor de células plasmáticas tiene tendencia a dispersarse por la médula ósea, originando un mieloma múltiple. Lo que parece claro es que para una célula B normal, existe una contrapartida maligna, que puede explicar la expansión clonal de una célula B inicial<sup>78</sup>.



<sup>9</sup> **Figura 5.- Desarrollo de células B antígeno dependiente.** Las células B procedentes de médula ósea llegan por el torrente linfático al ganglio linfático donde constituyen el centro germinal. Estas células pasan por el proceso de hipermutación somática, selección positiva, y recombinación de clase de inmunoglobulina. Las células posteriormente desarrollaran células B de memoria, células plasmáticas, y otras sufrirán procesos de apoptosis si no pasan el proceso de selección positiva.

#### ALTERACIONES MOLECULARES Y GENÉTICAS:

La etiopatogenia de los linfomas de células B tanto sistémicos como cutáneos primarios no está claramente descrita, y existen muchos mecanismos que todavía son desconocidos. Uno de los mecanismos que se cree que participa en el desarrollo de los LCCB primarios es la alteración del proceso fisiológico normal que tienen las células B, que incluye cambios genéticos (recombinación génica VDJ, hipermutación somática y recombinación de clase de Ig). Esas alteraciones que se dan de forma natural pueden originar cambios genéticos (traslocaciones, deleciones, amplificaciones, mutaciones...) que son capaces de producir ventajas proliferativas en una determinada célula y su progenie, originando la creación de clones de células B.

En el genoma de las células cancerígenas se dan cambios que activan proto-oncogenes e inactivan genes supresores de tumores que llevan a la hiperestimulación celular con la consiguiente proliferación celular e inhibición de la apoptosis. Esto junto a otras alteraciones en la señalización celular permiten la diseminación tumoral.

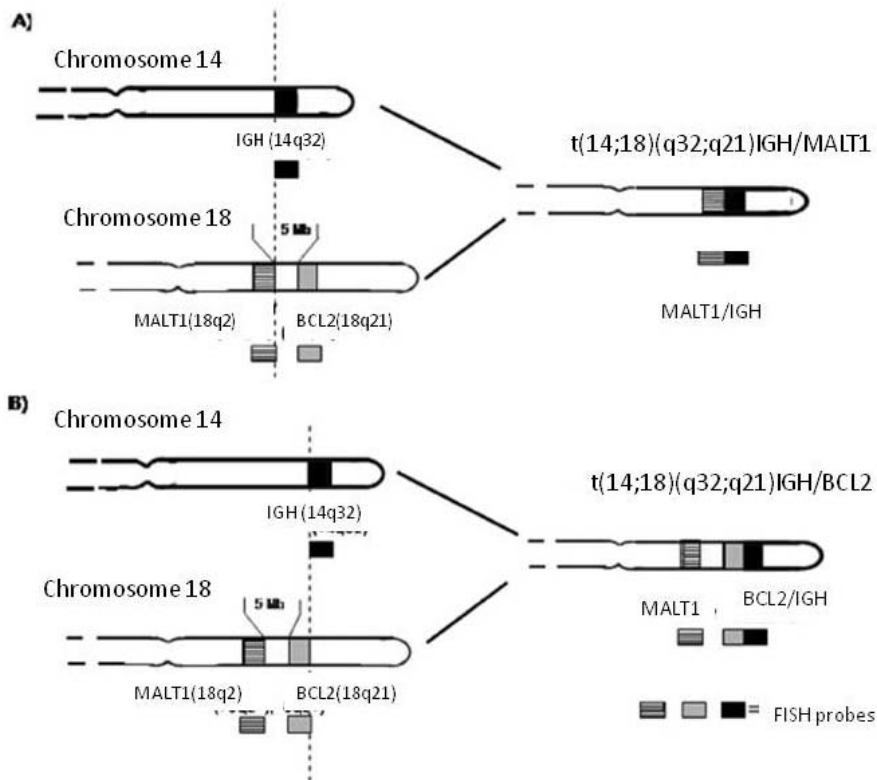
La activación de los oncogenes se puede deber a traslocaciones, amplificaciones o mutaciones. Los genes supresores de tumores se pueden inactivar por deleciones cromosómicas, mutaciones inactivantes o hipermetilación de promotores génicos<sup>79</sup>.

En los linfomas de células B el principal mecanismo de activación de oncogenes es la traslocación cromosómica. Una translocación cromosómica es el desplazamiento de un segmento de un cromosoma a un nuevo lugar en el genoma. En los linfomas sistémicos diversas traslocaciones se han relacionado con tipos específicos de linfomas: la traslocación t(11;14)(q13;q32) con los linfomas del manto<sup>16</sup>, t(14;18)(q32;q21) con los linfomas foliculares sistémicos y los linfomas B difusos de células grandes<sup>80</sup>, t(8;14)(q24;q32) con los linfomas de Burkitt<sup>16</sup>, entre otras. La producción de dichas traslocaciones está relacionada con la gran variedad que se produce en los genes de las inmunoglobulinas durante el desarrollo de las células B. Con la producción de estas traslocaciones, las células B desarrollan una ventaja adaptativa, por ejemplo, con la traslocación t(14;18) IGH/BCL2, lo que ocurre al colocarse el promotor del gen de la cadena pesada de la inmunoglobulina, es que cada vez que se necesita producir la cadena pesada de la inmunoglobulina, es la proteína bcl-2 que funciona de forma normal la que se genera, por lo que inactiva el proceso de apoptosis de esas células, favoreciendo la proliferación celular. Muchas de estas traslocaciones implican oncogenes conocidos, lo cual favorece el desarrollo celular y por tanto la tumorigénesis.

En los LCCB primarios también se han descrito diferentes alteraciones génicas según el subtipo histológico.

En los *LZM cutáneos primarios* son varias las alteraciones genéticas descritas; la trisomía del cromosoma 3 detectado en 2 casos de 12<sup>81</sup> y 10 de 51<sup>82</sup>, trisomías en el cromosoma 18 (2 de 51) o 12<sup>82-85</sup>, pero las traslocaciones son las alteraciones genéticas que mayor interés han despertado, pues aunque inicialmente no se detectaron traslocaciones previamente descritas en linfomas sistémicos<sup>81</sup>, cada vez son más los casos cutáneos donde se detectan. Rosebeck y colaboradores<sup>86</sup> demostraron que la traslocación t(11;18) (q21;q21) genera la proteína AP12/MALT1, descrita inicialmente en linfomas MALT de localización extracutánea, sobre todo en las formas gástricas. Esta traslocación produce una alteración que genera una resistencia a la degradación proteosómica, lo que a su vez otorga una resistencia a la apoptosis. Por tanto, según estos autores, esta traslocación genera una ganancia de función por el desarrollo de una oncoproteína que participa en el desarrollo de los procesos linfoproliferativos B. Además, esta traslocación se ha asociado con un peor pronóstico en los linfoma MALT<sup>87</sup>. Se ha descrito en las formas cutáneas por Streubel y colaboradores en 4 casos de 51<sup>82</sup> y Gallardo y colaboradores en 15 de un total de 42 LZM<sup>88</sup>.

La traslocación t(14;18) IgH/MALT1 es otra de las traslocaciones más características de los linfomas de zona marginal sistémicos<sup>23</sup>, siendo su hallazgo poco frecuente en las formas cutáneas. MALT1 es una paracaspasa que actúa sobre Bcl-10 para inducir la activación de NFκB, y es necesaria para el desarrollo normal de las células B. En el estudio previamente mencionado, de Streubel y colaboradores, en los 51 casos de LZM analizados, 7 de ellos presentaban dicha traslocación<sup>82</sup>. En un estudio posterior se detectó dicha traslocación en 3 de 12 LZM<sup>89</sup>. Palmedo y colaboradores<sup>90</sup> en un estudio de 30 biopsias de 13 pacientes con LZM intentaron detectar las traslocaciones relacionadas con t(14;18) tanto IGH/BCL2 como IGH/MALT1, observando que 10 de las 30 muestras presentaban la traslocación t(14;18)(q32;q21)IGH/MALT1, y 16 muestras de las 30 la traslocación t(14;18)(q32;q21)IGH/BCL2. Lo más destacable de este estudio es que de un mismo paciente se analizaron varias muestras de tejido de diferentes localizaciones cutáneas del linfoma, y no en todos se detectó la mutación, por lo que se demuestra la gran heterogeneidad genética dentro de un mismo linfoma y dentro de un mismo paciente. En total se han descrito en la literatura 23 casos con traslocaciones en IGH/MALT1 de 152 casos<sup>23,82,89-93</sup>, esto supone una sobreexpresión del gen MALT1, siendo el gen de la cadena pesada de la Ig el promotor de dicha sobreexpresión. Aún así, el significado de dichas traslocaciones no se conoce todavía, por lo que son necesarios más estudios. Otros autores no han hallado la t(14;18) IgH/MALT1 en los casos analizados<sup>91,92,94</sup>.



10

Hallerman y colaboradores no hallaron en ninguno de los 9 LZM cutáneos primarios traslocaciones ni en la banda 14q32 del locus IGH, ni en el locus de bcl-6 en la banda 3q27 o en la banda 8q24 del locus del gen MYC. Estos autores consideran que dichas alteraciones se dan durante la fase evolutiva en el centro germinal, durante la hipermutación somática o durante la recombinación de clases y por eso no se hallan en este tipo de linfomas. Estas traslocaciones inicialmente no se han relacionado con peor pronóstico salvo en los linfomas B de células grande, tipo piernas<sup>92</sup>. En LZM la frecuencia de las traslocaciones y mutaciones en el locus de bcl6 es mucho menor que la descrita en otras variantes de LCCB<sup>95</sup>. Así, por ejemplo en el estudio de Gianelli y colaboradores sólo detectaron mutaciones en el gen bcl-6 en 1/11 casos de LZM en comparación con la presencia de la mutación en 6 biopsias de las 31 muestras de LCF y en 1 de las 4 muestras de LCGP<sup>96</sup> (ver más adelante).

Otro cambio genético que influye a la hora de la transformación de una célula normal en tumoral, es el hecho de las ganancias o pérdidas de pequeños fragmentos génicos. La utilización de la hibridación genómica comparada (CGH) (se analizan el número de copias de un gen de un cromosoma de célula normal comparado con la célula patológica), ha permitido detectar aberrancias en zonas concretas del genoma. Así

<sup>10</sup> **Figura 6.-** Traslocaciones investigadas entre las regiones cromosómicas 14q32 y 18q21. Las regiones oscuras debajo de los cromosomas indican las bandas de unión mediante FISH. A) corresponde a IGH/MALT1 B) IGH/BCL2. Tomado de 90. Palmedo G, Hantschke M, Rutten A, et al. Primary cutaneous marginal zone B-cell lymphoma may exhibit both the t(14;18)(q32;q21) IGH/BCL2 and the t(14;18)(q32;q21) IGH/MALT1 translocation: an indicator for clonal transformation towards higher-grade B-cell lymphoma? Am J Dermatopathol. 2007;29:231-236.

pues, en el grupo de LZM se han descrito varias aberraciones génicas, (por ejemplo, ganancias en 7/7p (2/21 casos), 13/13q(4/21 casos), las cuales no se han relacionado con ningún gen relevante <sup>97</sup>.

En los linfomas cutáneos, al igual que en otras patologías tanto tumorales como inflamatorias, se ha dado importancia al microambiente celular como participante en el origen del desarrollo neoplásico, en el que se relacionarían no sólo las células del sistema inmune, sino toda las citocinas circundantes. En el estudio llevado a cabo por Van Maldegem y colaboradores<sup>98</sup> en una serie de 42 LZM frente a 87 casos de linfomas marginales extracutáneos, demostraron diferencias en la expresión no sólo de citocinas, sino de diferentes líneas celulares de expresión en el microambiente. Observaron que en los LZM cutáneos la respuesta inflamatoria la llevan a cabo los linfocitos Th2, mientras que en LZM extracutáneos son los linfocitos Th1<sup>11,99</sup>. La respuesta Th1 conlleva una mayor expresión de IFN gamma y de IL-2, que a su vez da lugar a una mayor expresión de citocinas CXCL9, CXCL10 que se expresan en las células epiteliales y endoteliales, lo que origina que las células Th1 expresen CXCR3<sup>100-102</sup>. En cambio, en los LZM cutáneos existe una pérdida de la expresión de CXCR3 (90%), lo que ha hecho pensar a Van Maldegem y colaboradores<sup>98</sup> que las células implicadas en LZM cutáneos reconocen antígenos diferentes a los que reconocen en los otros LZM extracutáneos. Este grupo propone la existencia de 2 subtipos de LZM cutáneos, que a su vez responderían de forma diferente al estímulo de *Borrelia Burgdoferi* (ver etiología infecciosa).

El grupo de los *linfomas centro foliculares* también ha sido estudiado pormenorizadamente. Al igual que ha ocurrido con los LZM, la traslocación que más interés ha despertado en los linfomas foliculares es la t(14;18), observada por Palmedo y colaboradores en 1 biopsia de un total de 3 muestras<sup>90</sup>.

Mediante CGH se han detectado aberraciones genéticas en varias zonas del genoma de LCF (por ejemplo en el estudio de Giménez y colaboradores 2 de 8 casos presentaron alguna alteración)<sup>103</sup>. Las ganancias localizadas en 3q, 4 y 7q fueron las más frecuentes. En otros estudios, en el grupo de LCF (6 casos) no hubo casi aberraciones cromosómicas, excepto en un caso en el que se observaron varias ganancias, pero ninguna de ellas de las frecuentes<sup>97</sup>. Dijkamn y colaboradores detectaron mediante CGH en 12 de 19 casos de LCF amplificación del ADN en 2p16.1 (63%), y deleciones en 14q32.33 (68%). La ganancia de 2p16.1 se correspondía con la ampliación del gen c-REL (que codifica la proteína c-Rel, que es un factor de transcripción de la familia Rel/NFKB, cuya principal función es controlar la unión del DNA, la dimerización, y la unión al inhibidor de NFKB durante la transcripción de NFKB), lo cual se comprobó mediante FISH<sup>104</sup>. Dicha amplificación es frecuente en los linfomas sistémicos, pero no había sido descrita previamente en linfomas cutáneos.

La deleción de 14q32.33, locus que contiene la cadena pesada de la inmunoglobulina, se halló en 13/19 LCF<sup>32</sup>, lo cual origina la pérdida de expresión de la misma.

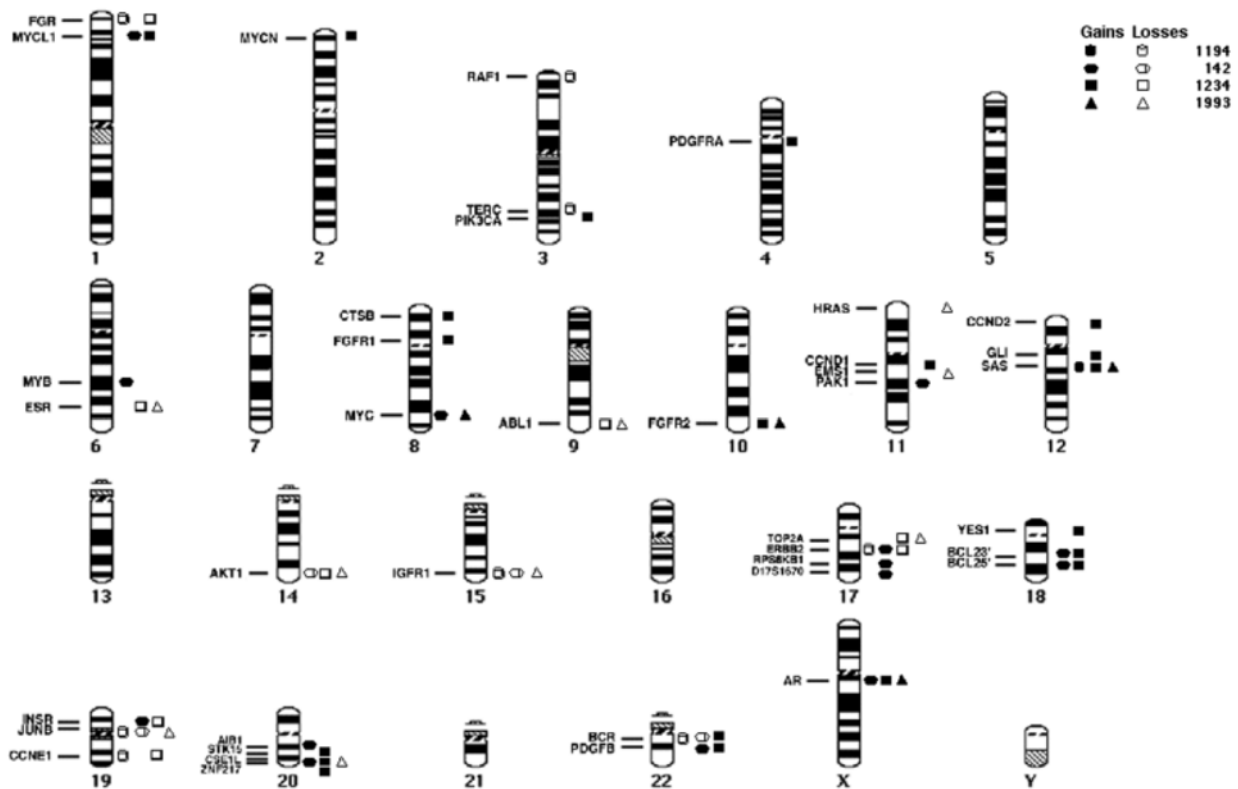
Dijkman y colaboradores objetivaron una hipermutación somática aberrante en BCL6 (37%) en LCF, de igual modo, encontraron alteraciones en PAX5, RhoH/TTF y en MYC (57%)<sup>105</sup>

Sin duda alguna, es el grupo de los *linfomas B difusos de células grandes, tipo piernas*, en los que más aberraciones genéticas se han hallado. La t(14;18) también se ha detectado en LCGP, así como la traslocación en el gen IGH en 4 de 14 casos<sup>93</sup>, 7 de 16 casos<sup>92</sup> y 6 de 25 casos<sup>106</sup>, según las series. En cambio, traslocaciones en IGH/MALT1 han sido detectadas más raramente<sup>92,107</sup>.

Las mutaciones del gen bcl-6 sólo se detectan en el 25% de los casos de los LCGP<sup>96</sup>, a diferencia de lo que hemos visto en los otros tipos de LCCB<sup>96</sup>. Esto se contradice con el estudio de Franco y colaboradores, en que la presencia de mutaciones en el gen bcl-6 fue mayor en el grupo de LCGP, que en el resto de linfomas cutáneos primarios<sup>95</sup>.

El grupo de Mao y colaboradores<sup>97</sup> analizó mediante CGH muestras de LCCB de 29 pacientes. De ellos, el 41% (12 casos) presentaron desbalances cromosómicos. Las ganancias génicas fueron más frecuentes que las pérdidas. Las regiones que más frecuentemente presentaron ganancias fueron: 18/18q (50%), 7/7p (42%), 3/3q (33%), 20(33%), 1p(25%), 12/12q(25%) y 13/13q(25%), mientras que la pérdida en 6q fue la más frecuente (42%). La pérdida de 6q y la ganancia 3/3q solo se dio en los LCGP (**Figura 7**).

De todas las alteraciones presentadas; mediante microarray se identificaron ganancias en varios oncogenes, sobre todo en el grupo de LCGP, siendo la más frecuente SAS/CDK4(12q13.3) (3 casos), seguida de MYCL (1p34.3), MYC (8q24), FGFR2(10q26), BCL2 (18q21.3) (20q13) y PDGFB (22112-13) en 2 casos, mientras que se objetivaron pérdidas de AKT1(14q32.3), IGFR1(15q25-26) y JUNB(19p13.2) en 3 casos. Con PCR se detectaron amplificación de BCL2 en 5 de los 29 casos.



11

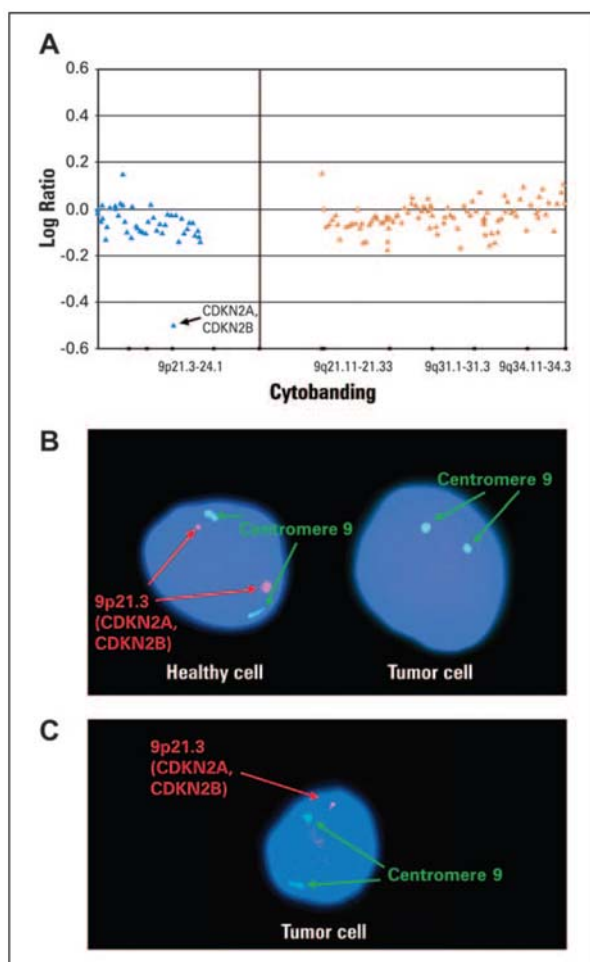
De igual manera, el grupo catalán de Giménez y colaboradores<sup>103</sup> realizó estudios parecidos en 18 pacientes, de los cuales 14 presentaron alteraciones cromosómicas (77.8%), entre ellos los 9 (100%) casos de LCGP que mostraron un patrón de desbalances ya descrito previamente. Las ganancias más frecuentes fueron en 2q, 5q, 3 y 7q, mientras que la pérdida más comúnmente encontrada fue en 17p. En este estudio también se analizaron alteraciones cromosómicas en un grupo de 5 pacientes con linfomas sistémicos y lesiones cutáneas, donde se demostraron alteraciones en 3 de ellos totalmente diferentes a las observadas en los LCCB primarios.

En un estudio realizado por Dijkman y colaboradores en el que se analizaron las amplificaciones de 2p16.1 y 14q32.33, se confirmó que los LCGP presentaban dichas aberraciones génicas en menor proporción que los LCF. En cambio, era más frecuente la amplificación de 18q21.31.q21.33 (67%), que contiene los genes BCL2 y MALT1, además de presentar la delección del fragmento 9p21.3 que contiene el gen de CDKN2A, CDKN2B y NSG-x en 5 de los 12 pacientes, hecho no observado en ningún caso de los LCF. Además, en este estudio se analizó la presencia de regiones metiladas, advirtiéndose que aquellos pacientes con

<sup>11</sup> **Figura 7.- CGH array en cuatro casos de LCGP.** Se aprecian ganancias de 3/3q, 7, 12, 13/13q, 18 y 20. La pérdida más frecuente fue 6q. Tomada de 97. Mao X, Lillington D, Child F, Russell-Jones R, Young B, Whittaker S. Comparative genomic hybridization analysis of primary cutaneous B-cell lymphomas: identification of common genomic alterations in disease pathogenesis. *Genes Chromosomes Cancer*. 2002;35:144-155.

metilación de la región correspondiente al gen CDKN2A presentaban peor pronóstico con muerte de todos ellos<sup>104</sup>.

Resultados similares fueron descritos por Belaud-Rotureau y colaboradores<sup>108</sup>, que describieron en el grupo de LCGP una alta frecuencia de la inactivación del gen  $p16^{\text{INK4a}}$ /CDKN2A en comparación con el resto de LCCB. Objetivaron en los 6 casos estudiados de LCGP que existía una deleción en 9p21 que se correspondía con el gen de  $p16^{\text{INK4a}}$ /CDKN2A, deleción no detectada en el grupo de LCF (**Figura 8**). Además detectaron varias ganancias que se han confirmado en otros estudios como 3p, 7p, 7q y 12q, y pérdidas en 6q<sup>94,97,103</sup>. En este estudio también se detectaron alteraciones en el gen de IGH(2/6) que fueron asociadas a alteraciones en el gen MYC. Esta pérdida de  $p16^{\text{INK4a}}$ /CDKN2A como se ha mencionado previamente se ha relacionado con peor pronóstico<sup>104,109</sup>.



<sup>12</sup> **Figura 8.**-Representación de un caso representativo de LCGP que murió por el linfoma, el cual presentaba alteraciones del ADN del cromosoma 9. A) Frecuencia de ganancias y pérdidas típicas del paciente con LCGP. B) FISH que muestra un caso homocigótico y C) caso heterocigótico de la deleción CDKN2A. Tomado de 104. Dijkman R, Tensen CP, Jordanova ES, et al. Array-based comparative genomic hybridization analysis reveals recurrent chromosomal alterations and prognostic parameters in primary cutaneous large B-cell lymphoma. J Clin Oncol. 2006;24:296-305.

Las dianas génicas de los marcadores más característicos de los LCGP han sido estudiados y han sido analizados según su expresión. Como se ha mencionado previamente, la hipermutación somática es un proceso fisiológico que se lleva a cabo en el centro germinal, para originar mayor variabilidad y así presentar más dianas para los múltiples antígenos a los que se enfrentan las células B. A veces, dicha hipermutación se produce de forma descontrolada y origina alteración en las proteínas que codifican, con hiper o hipofunción. Dijkman y colaboradores objetivaron una hipermutación somática aberrante en BCL6 (62%) en LCGP respecto a LCF (37%), de igual modo, encontraron alteraciones en PAX5, RhoH/TTF y en MYC, que variaban poco con respecto a las presentadas en LCF (54% en LCGP con respecto a 53% en LCF)<sup>105</sup>.

El fenómeno de metilación es un mecanismo que se lleva a cabo en el genoma de las células normales. Normalmente las células normales presentan una hipometilación de los promotores de genes, en cambio, en ciertos tumores, se produce hipermetilación. Al producirse la metilación se genera una inactivación de los promotores, si la metilación se lleva a cabo sobre un gen supresor de tumores, dicho gen no se expresa, dando paso libre a la replicación celular o inhibición de la apoptosis celular<sup>110,111</sup>. El grupo de Takino detectó la metilación en genes como DAPK y p16 en LCGP<sup>112</sup>.

Junto con las alteraciones genéticas, la expresión de proteínas específicas en las células B tumorales de los LCCB primarios ha sido elemento de estudio para encontrar más diferencias biológicas entre este tipo de linfoma y las otras variantes. Así pues, Espinet y colaboradores encontraron diferencias de expresión de la proteína FOXP1, que se expresaba en 13 de 15 LCGP y en cambio en ninguno de los 9 casos de LCF. Además, descartaron traslocaciones en el gen correspondiente a FOXP1. La amplificación de dicha proteína fue correlacionada con un peor pronóstico en los LCGP<sup>113</sup>. Otras proteínas como CCND1, también han presentado mayor expresión en células B de LCGP en comparación con los otros tipos de LCCB (67% respecto al 57% de LCF y 44% de LZM), al igual que ocurre con proteínas como alfaPAK (50% de LCGP, 22% LZM y 10% LCF). En cambio, AP-1 que es un factor de transcripción que contiene c-JUN, C-FOS y RAF1, entre otras proteínas, son proteínas que raramente se expresan en LCCB como se demuestra en el estudio de Mao y colaboradores<sup>114</sup>.

### ETIOLOGÍA INFECCIOSA:

En la etiopatogenia de los LCCB, como ocurre en otros tipos de tumores, los agentes infecciosos han sido centro de atención como posible causa patológica de estos fenómenos neoplásicos. De igual forma que en linfomas sistémicos se han relacionado con el agente *Helicobacter pylori* (linfomas MALT), *Chlamydia psittaci* (MALT anexiales oculares) ó el virus Epstein Barr (Burkitt), en el caso de los LCCB primarios, ha sido *Borrelia Burgdorferi* el agente que más interés ha despertado, sobre todo con el subtipo de linfoma de la zona marginal<sup>115</sup>, aunque se ha intentado relacionar con las tres variantes de LCCB primarios.

*Borrelia Burgdorferi* es una bacteria del género espiroqueta que fue identificada como el agente causal de la enfermedad de Lyme<sup>116</sup>. La probable relación entre este agente infeccioso y los linfomas fue inicialmente propuesta por Goos en 1971 ante la observación de que pacientes con acrodermatitis atrófica crónica solían complicarse durante su evolución con linfomas diversos<sup>117</sup>. Posteriormente, Garbe y colaboradores presentaron 4 casos con serologías positivas de *Borrelia*<sup>118</sup>. Tras estas primeras publicaciones, fueron varios los grupos que intentaron avalar dicha asociación.

Las técnicas para demostrar la presencia de *Borrelia* en pacientes con LCCB pasaron de las iniciales serologías positivas a la detección de ADN de *Borrelia* en tejido de LCCB mediante PCR. Cerroni y colaboradores<sup>119</sup> identificaron ADN de *Borrelia* en 9 casos de un total de 50 LCCB. Jelic y colaboradores detectaron 12 muestras positivas en 22 casos de linfomas de células B, siendo negativas en aquellos pacientes con linfomas de estirpe T<sup>120</sup>. Hoefnagel y colaboradores en una serie de 50 LZM, detectaron 5 casos con anticuerpos positivos para *Borrelia*<sup>24</sup>, y de todos ellos, 1 había desarrollado lesiones de LZM sobre lesiones previas de acrodermatitis crónica atrófica. Goodlad<sup>48</sup> también intentó demostrar la relación entre dicho agente y LCCB en un grupo de 20 pacientes escoceses, encontrando una relación estadísticamente significativa entre la presencia de ADN de *Borrelia* y la aparición de LCCB (7 positividad de 20 casos de linfomas, de ellos 5 LZM, 1 LCF y 1 LCGP). Aunque son varias las series que mostraban la presencia de ADN de *Borrelia* en muestras de tejido de LCCB, la controversia existía, ya que incluso alguno de esos mismos autores, seguían cuestionando si dicha asociación era fortuita, basándose principalmente en que dicha positividad se daba en casos de pacientes donde *Borrelia* era endémica. En 2003 se publicó una serie de 16 casos en los que se detectaron por PCR *Borrelia* en 3 casos en tejido de LCCB en pacientes de Francia provenientes de una zona no endémica de *Borrelia*. A pesar de ello, también existen series donde no demuestran significación estadística entre la presencia de ADN de *Borrelia* y el desarrollo de LCCB (pacientes de Estados Unidos<sup>50,121</sup> y europeos<sup>52,122</sup>).

Ante la evidente controversia del probable origen de los casos y la incidencia de *Borrelia*, el grupo de Takino y colaboradores<sup>112</sup> intentó comprobar en 3 grupos de pacientes provenientes de Asia, Alemania y Estados Unidos, si existía dicha asociación. En ninguno de los pacientes estudiados, a pesar de ser originariamente de diferentes lugares del mundo, se demostró positividad ni a nivel serológico ni se detectó presencia de ADN de *Borrelia* en las muestras, por lo que concluyen que este agente no estaría involucrado en el desarrollo de los linfomas cutáneos primarios.

El grupo de Van Maldegem y colaboradores<sup>98</sup> sigue proponiendo que *Borrelia* está implicada en el desarrollo de un subgrupo de LZM cutáneos. Refieren que los linfomas de la zona marginal extraganglionales se desarrollan en un medio de inflamación crónica, básicamente con predominio T helper 1 (Th1). Las células Th1 secretan citocinas como IFN gamma e IL-2, que a su vez, atraen más citocinas como CXCL9 y CXCL10, que se expresan en células del epitelio y el endotelio, las cuales atraen células Th1 que expresan CXCR3. Basándose en estudios previos de otros autores, afirman que los linfomas de la zona marginal no cutáneos se desarrollan en un medio con exceso de IFN gamma y de CXCR3<sup>100,102</sup>. Según sus estudios, ellos proponen que existen dos subtipos de LZM cutáneos que presentan diferente respuesta inflamatoria, una similar a los linfomas de la zona marginal extraganglionales, y otros con respuesta totalmente diferente. Un grupo principal de LZM cutáneos (90%) que presentan pérdida de expresión de CXCR3, dentro del cual se subdividirían en 2 nuevos grupos según la expresión de IgM. Esto apoya el estudio de Roggero y colaboradores,<sup>58</sup> en que describieron casos de LZM cutáneos que expresaban IgM. Tanto *Borrelia* como *H. pylori* en los MALT gástricos activan una respuesta Th1. En cambio, Maldegem y colaboradores refieren la existencia de un segundo grupo de LZM cutáneos que se desarrollan en un medio de citocinas que activan una respuesta Th2, siendo las Ig expresadas por este tipo de linfomas diferentes a IgM. Por tanto, hablan de la existencia de un grupo minoritario de LZM cutáneos con expresión de CXCR3 y expresión de IgM que se relaciona con *Borrelia* con tendencia a la activación de una respuesta inflamatoria Th1, y un grupo mayoritario de LZM cutáneos sin expresión de CXCR3, expresión de IgG o IgA o IgE, con respuesta inflamatoria Th2 y sin relación con *Borrelia*<sup>98</sup>.

Roggero y colaboradores<sup>58</sup> comparan la relación entre la infección con *Helicobacter pylori* y los linfomas MALT de mucosa con la que habría entre *Borrelia* y el desarrollo de los LZM cutáneos. Se trata de dos bacterias de localización extracelular, presentan una respuesta inflamatoria Th1 y ambas son infecciones resistentes a la respuesta inmune del huésped. *Borrelia* induce en su huésped una respuesta policlonal de células B, ya que de entrada en piel normal no existen linfocitos B circulantes. Además se ha descrito la asociación entre la existencia de ADN de *Borrelia* con varios procesos autoinmunes, lo que podría llevar a una respuesta inmune cruzada entre los epítomos de *Borrelia* y los propios autoanticuerpos<sup>115,123</sup>.

Goodlad y colaboradores relacionaron los cambios histológicos de lo que consideraron la erupción inicial de la enfermedad de Lyme con las características histológicas iniciales de un LZM, ya que 2 pacientes con enfermedad de Lyme, desarrollaron posteriormente unos nódulos que fueron diagnosticados de LZM. En ambos casos presentados, solo se halló un infiltrado linfocitario perivascular inespecífico, y en ninguno de ellos se detectó el ADN de *Borrelia* en las muestras de tejido del linfoma, aun así ellos concluyen que el infiltrado inicial podría corresponder al estadio temprano del linfoma, basándose en que la presencia de *Borrelia* sería el desencadenante de la estimulación crónica del tejido linfoide en la piel y por tanto, el probable causante del linfoma.

Un punto en el que suelen apoyarse para considerar el papel etiológico de *Borrelia* en el desarrollo de los LZM, es que son varios los casos publicados que han conseguido la remisión completa tras el tratamiento antibiótico. Senff y colaboradores en su revisión sobre los tratamientos utilizados en los LCCB, objetivaron 14 casos publicados de LZM tratados con antibioterapia. De ellos, sólo 6 casos consiguieron la remisión completa<sup>44</sup>. De los antibióticos empleados, cefalosporinas y tetraciclinas son los más utilizados, siendo los primeros más eficaces que los segundos. En una serie de 32 pacientes con LCCB, 3 de ellos fueron tratados con antibióticos y 2 de ellos consiguieron la remisión completa tras el tratamiento antibiótico<sup>11</sup>. Kütting publicó un caso de LZM que tras tratarlo con cefotaxima (y pulso de IFN), las lesiones cutáneas desaparecieron<sup>63</sup>. La mayoría de las publicaciones tratan de casos con lesiones solitarias o en número escaso, aunque también hay casos como el de Hofbauer en que la remisión completa se consigue con doxiciclina oral en un caso con lesiones multifocales<sup>59</sup>. A pesar de los buenos resultados con el tratamiento antibiótico, la tasa de recidiva publicada alcanza el 20%<sup>44</sup>.

En la etiopatogenia de los linfomas cutáneos se ha intentado relacionar con otros agentes infecciosos, como el virus de Epstein Barr y los virus herpes humanos 6 y 7 (VHH). Los resultados, al igual que ocurre con *Borrelia*, también son contradictorios con estos virus. Por un lado, existen artículos como el de Nagore y colaboradores, donde tras analizar 64 muestras de LCCB no hayaron ningún rastro de material genético de VHH-7, VHH-8 ni Epstein Barr<sup>124</sup>. Mientras que por otro lado, otros artículos como el de Zochling y colaboradores<sup>125</sup>, analizan muestras cutáneas de 50 LCCB, en los cuales detectan ADN específico de VHH-8 en 7 casos (LCF 3 casos, LZM 3 casos, LCGP 1 casos). La detección se realizó mediante PCR y posteriormente con hibridación por Southern Blot. Aún así, el mismo grupo de investigadores afirma que no existe relación entre la infección vírica y el origen de dichos tumores, ya que el genoma de VHH-8 se encuentra entre el 5-10% de la población general, según el área. Ellos mismos, en los casos control, detectaron un 3.6 % de positividades para VHH-8. Igualmente, el grupo de Peris y colaboradores<sup>126</sup> hallaron ADN de virus de Epstein Barr en muestras de diversos LCCB, en concreto en 1 caso de 6 LCF, en 3 de 8 pseudolinfomas, y en 2 casos de 22 pieles normales, por lo que a pesar de hallarse material genético de dicho virus, tampoco se puede

concluir que estén implicados en la etiopatogenia de los LCCB. Lo que sí está demostrado es la presencia tanto de VHH8 como de virus Epstein Barr en pacientes con síndrome de inmunodeficiencia adquirida que desarrollan LCCB<sup>127</sup>.

El virus de la hepatitis C también se ha relacionado con la etiopatogenia de los LCCB. Son varias las series en las que se han detectado anticuerpos anti-VHC o ARN del virus en muestras de tejido de linfoma. Por un lado, Prati y colaboradores<sup>128</sup>, en una serie de 34 pacientes con LCCB, detectaron en un paciente (3%) positividad de anticuerpos anti-VHC. Posteriormente, Michaelis en 2003<sup>129</sup>, tras examinar 23 biopsias de LCCB, hallaron 7 casos (30%) de secuencias de ARN del virus de la hepatitis C en el tejido. Esto apoya los resultados previos de Viguier y colaboradores que identificaron ARN del virus en muestras de tejido de LCCB<sup>130</sup> (1 caso de LCGP, 1 caso de LCF y 1 caso de LZM). Aun así, como ocurre con otros virus relacionados con el origen de los LCCB, tampoco se puede afirmar que el virus de la hepatitis C tenga relación con la etiopatogenia de estos linfomas.

Basándose también en la respuesta crónica inflamatoria como probable origen de los linfomas cutáneos, Pavlovic y colaboradores publicaron un paciente con LZM que tras las suspensión de un tratamiento crónico con antihistamínicos, presentó una remisión completa del linfoma<sup>131</sup>. Ellos achacan a los antihistamínicos el papel proinflamatorio en la respuesta proliferativa de los linfocitos. Aun así, no explican el mecanismo por el cual dicha asociación se llevaría a cabo.

Además de describirse la relación de fármacos como probables elementos proinflamatorios en el desarrollo de los LCCB, también se ha relacionado el tratamiento radioterápico como un probable inductor inflamatorio, ya que existen casos de linfomas cutáneos que han aparecido sobre zonas irradiadas previamente<sup>132,133</sup>.

A pesar de ello, siguen siendo necesarias series más largas y estudios más amplios para poder explicar de forma fehaciente el proceso que lleva a una célula B normal a desarrollar un tumor complejo como son los LCCB.

Por otra parte, y como se verá en la sección siguiente, una probable nueva vía en la etiopatogenia de este tipo de tumores puede ser la relacionada con los microARNs, fragmentos cortos de nucleótidos que se han relacionado con múltiples procesos biológicos, además de con el desarrollo de varios tumores.

## **MICROARNs**

El genoma humano se completó en la década de los noventa, y desde entonces se ha demostrado que sólo el 2% codifica genes conocidos. Recientes estudios sugieren que más del 50% del genoma está transcrito en ARN<sup>134,135</sup>. Dentro del ARN existen grupos de ARN codificante y no codificante, como ocurre con el ADN. Los microARNs forman parte de ese grupo de ARN no codificante.

Los microARNs son pequeños fragmentos de ARN de 22 nucleótidos<sup>136</sup> que modulan la propia transcripción del ARN. Los microARNs o miRNAs son moléculas de ARN transcritas a partir de genes de ADN, pero que no son traducidas a proteínas.

El primer microARN identificado fue el denominado lin-4, que se descifró en el gusano *Caenorhabditis elegans* 1993 por Lee y colaboradores<sup>137</sup>. Los microARNs se han descrito tanto en animales como en plantas. Son un elemento conservado a lo largo de la evolución. Se estima que regulan entre el 10 y el 30% de los genes. Actualmente se han verificado cerca de 700 microARNs en humanos y se estima que se podrán descifrar alrededor de 1000<sup>138</sup>

Los genes de los miRNAs pueden encontrarse localizados en varios loci<sup>139</sup>:

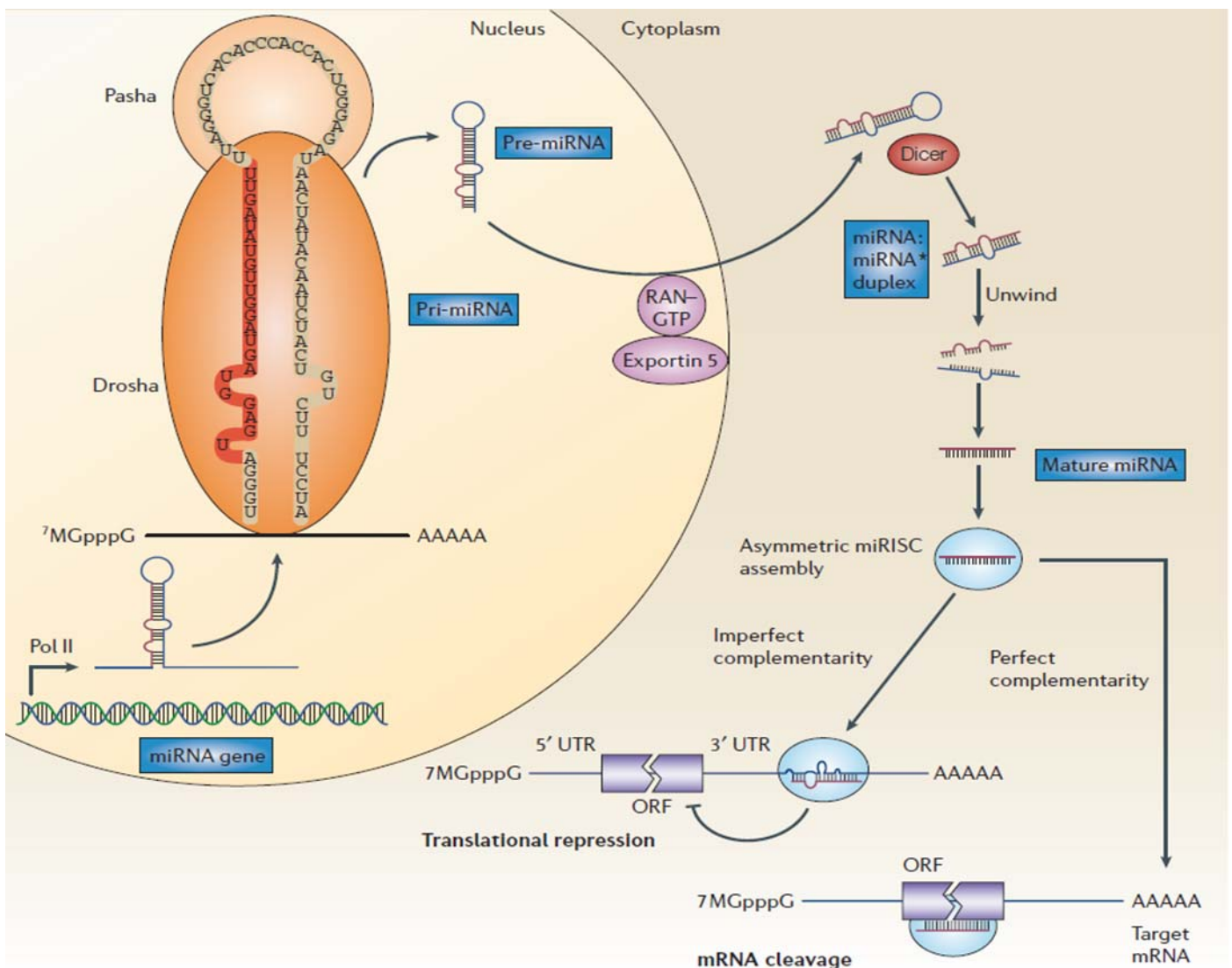
- en intrones (regiones de ADN no codificante), con una orientación antisense,
- en intrones donde tienen la misma orientación que el gen en el que se alojan y son inicialmente transcritos como parte de su ARN precursor,
- en exones, donde están integrados o se superponen con exones de transcritos conocidos, están siempre en la misma orientación, y la mayoría se encuentran en las regiones no-codificantes UTRs 5' o 3'.

Además, aproximadamente el 50% de los miRNAs están en clusters de miRNAs que están inicialmente codificados como un transcrito policistrónico (que incluye varios genes)<sup>140</sup>, que posteriormente se fragmenta en múltiples miRNAs. En la mayoría de los casos, los miRNAs policistrónicos comparten el mismo patrón de expresión.

El procesamiento de los microARNs se lleva a cabo inicialmente en el núcleo celular. Las secuencias que codifican para un gen de miRNA está dentro del ADN, y tiene una longitud que supera al tamaño del miRNA final. Esto conlleva que, durante la transcripción de esta secuencia de ADN por la ARN polimerasa II, se formen regiones que tienen la capacidad de formar una horquilla y generar un ARN bicatenario primario largo conocido como *pri-miRNA*. Los *pri-miRNAs* son procesados por una segunda enzima, *Drosha ribonucleasa III*, que produce un fragmento de 90-70 nucleótidos (*pre-miRNA*) al cortar la base de la horquilla. Posteriormente, estos *pre-miRNAs* de menos longitud son transportados al citoplasma por la

proteína exportin 5, donde son divididos por la enzima *Dicer ribonucleasa III* en fragmentos de 22 ribonucleótidos de doble cadena (microARNd maduro). Una de las cadenas de ese microARN doble es incorporado a los complejos RISC (RNA induced silencing complex). En los complejos RISC se lleva a cabo el apareamiento del microARN (la hebra antisense) con el ARNm al que regula, si este es completo, se produce la silenciación y por tanto no expresión del ARNm. A su vez, la enzima *Argonata endonucleasa* elimina el fragmento complementario del microARN <sup>136,137,141-144</sup> (**Figura 9**). Si el apareamiento no es completo, también se produce una represión traslacional con un corte en la producción proteica. Se han descrito en en el procesamiento de determinados miRNAS vías alternativas al llevado a cabo por la enzima Dicer, en el que se procesa el microARN por la enzima Argonata endonucleasa II (por ejemplo, miR-451)<sup>145</sup>.

13



<sup>13</sup> Figura 9.- Procesamiento de microARN.

Los miRNAs presentan una serie de características generales<sup>146</sup>:

- se asocian a la región 3' UTR de los ARNm diana.
- hacen falta muchos sitios de unión para activar la respuesta de los miRNAs ( la unión de uno solo no produce efectos significativos).
- un ARNm puede estar regulado por diferentes miRNAs.
- un único miRNA puede controlar la actividad de cientos de ARNm diferentes.
- la especificidad y la función de los miRNAs están determinados por los nucleótidos 2 a 7 de la parte 5' de los miRNAs maduros (dicha región debe ser obligatoriamente complementaria al ARNm diana)<sup>147</sup>.
- un miRNA puede ser funcional aunque no haya sido sintetizado en el núcleo: un miRNA introducido en la célula por transfección puede inhibir eficazmente la síntesis proteica, como demuestra el artículo de Shan y colaboradores en el que utilizando moléculas químicas pequeñas se puede potenciar la biogénesis de miRNAs endógenos<sup>148</sup>.
- el miRNA es el responsable de la especificidad de sustrato (el ARNm diana).

Los microARNs tienen una función reguladora en múltiples procesos biológicos: desarrollo y proliferación celular, apoptosis, metabolismo, hematopoyesis, resistencia al estrés, desarrollo neural y sobre todo función en la proliferación tumoral.

La función que más interés ha suscitado es la regulación de la proliferación tumoral. Se ha descrito que existen microARNs con función oncogénica y otros con función supresora de tumores. Aquellos miRNAs que actúan regulando oncogenes, funcionan como supresores de tumores, puesto que inhiben la transcripción del ARNm, e impiden que dicho oncogén se transcriba y origine una oncoproteína, disminuyendo la función del mismo. En cambio, aquellos microARNs que regulan a un gen supresor de tumores, actúan como si se tratasen de un oncogén, ya que al impedir su transcripción permiten que las células que deberían ser frenadas sigan replicándose, o aquellas que deberían entrar en apoptosis no lo hagan, puesto que el gen proapoptótico no está actuando.

El descubrimiento de estos elementos está permitiendo manipular el ARN y así silenciar la expresión de ARNm que codifica para determinadas proteínas. Actualmente se han verificado cerca de 700 microARNs en humanos y se estima que se podrán descifrar alrededor de 1000<sup>138</sup>. Hoy en día son varias las páginas web disponibles para determinar la secuencia de nucleótidos de un microARN concreto y posibles genes a los que regula ([www.Targetscan.org](http://www.Targetscan.org); [http://pictar.bio.nyu.edu/cgi-bin/PicTar vertebrate.cgi](http://pictar.bio.nyu.edu/cgi-bin/PicTar Vertebrate.cgi); <http://microrna.sanger.ac.uk/>; <http://cbio.mskcc.org/cgi-bin/mirnaviewer/mirnaviewer.pl>, entre otras herramientas informáticas disponibles en red).

La expresión de diferentes microARNs se ha descrito en vías de diferenciación celular de diferentes células, siendo de importancia la relacionada con la hematopoyesis y sobre todo con la diferenciación de las células del sistema inmune normal<sup>149</sup>.

Son varios los microARNs que se han descrito en tumores de diferentes líneas celulares. Existen microARNs que se expresan de forma diferencial según el tipo de tumor y otros microARNs cuya expresión no varía a pesar de que se trate de tumores de diferentes tejidos. Por ejemplo, miR-15 y miR-16 son microARNs que regulan el gen de BCL-2 (proteína que participa en la apoptosis celular). Estos dos miRNAs se han implicado en la etiopatogenia de varios tumores, siendo los linfomas B ganglionares, el primer grupo de neoplasias donde se describió su relación con BCL2<sup>150-152</sup>. Estos microRNAs están localizados en el cromosoma 13q14, fragmento delecionado en muchos casos de leucemia linfática crónica (LLC). Por tanto, ante dicha pérdida genética, se ha demostrado que ambos microARNs están disminuidos en pacientes con LLC<sup>153</sup>. Esta diferencia de expresión de miRNAs entre tejido sano y tejido tumoral se prevé que tenga utilidad diagnóstica, y permita a su vez, establecer los mecanismos que influyen en el desarrollo tumoral<sup>154</sup>.

En tumores sólidos como es el cáncer de pulmón, se ha observado la infraexpresión de determinados microARNs, como let-7, que se cree que tiene una función principal en el desarrollo y proliferación de dicho cáncer<sup>155</sup>. Los niveles de let-7 están reducidos en sangre en los pacientes con cáncer de pulmón. La reducción de let-7 se ha correlacionado con la disminución de la supervivencia de los pacientes con dicho cáncer. Por tanto, la determinación de éste microARN y otros, permitiría no sólo utilizarse como herramienta diagnóstica, sino también como factor pronóstico. Let-7 inhibe la expresión de RAS y MYC, disminuyendo la expresión de los mismos<sup>156</sup>. Ambas proteínas, RAS y MYC se han descrito como oncogenes que participan en varios cánceres, entre ellos el de cáncer de pulmón<sup>156</sup>. Los mismos autores describieron que niveles bajos de let-7 aumentan los niveles de RAS en el tejido tumoral en comparación con el tejido sano. Al igual que se describen miRNAs infraexpresados, también existen miRNAs sobreexpresados, como ocurre con miR-17 que se sobreexpresa en cáncer de pulmón de células pequeñas, y aunque actualmente se cree que los genes supresores de tumores, PTEN y RB2<sup>157</sup>, son unas de las probables dianas génicas a los que regularía, éstas no se han confirmado totalmente.

El cáncer de mama, al ser la neoplasia más frecuente en la población femenina, está siendo objeto intenso de estudio en el campo de los microARNs. Se han descrito diferencias en la expresión de varios microARNs entre tejido sano mamario y el tumoral, especialmente una reducción (en tejido tumoral) de la expresión de miR-125, miR145, miR21, miR155<sup>154</sup>. El mismo estudio demostró que la disminución de expresión de dichos microARNs se correlaciona con el estadio tumoral, la expresión de receptores de estrógeno y progesterona, además de con la capacidad invasiva del tumor<sup>154</sup>.

El cáncer colorectal fue uno de los primeros tumores en los que se comenzó a estudiar la expresión y el papel que desempeñan los microARNs. En 2003 Michael y colaboradores<sup>158</sup> identificaron 28 microARNs diferentes. Entre ellos hay que destacar miR-143 y miR-145, que están reducidos en el tejido tumoral, mientras que presentan niveles normales en tejido colónico sano.

Muchos otros microARNs se han descrito en otros tipos de tumores: miR-245 y miR-18 están reducidos en el glioblastoma multiforme<sup>159</sup>, mientras que miR-21 se sobreexpresa<sup>160</sup>; miR-221, miR-222 y miR-146 se sobreexpresan en carcinoma papilar de tiroides<sup>161</sup> y miR372 y miR373 se han relacionado con el desarrollo de cáncer germinal de testículo<sup>162</sup>.

En el campo de los linfomas, sobre todo de estirpe B, se han detectado varios microARNs que se encuentran tanto infra como sobreexpresados. MiR-155 se encuentra sobreexpresado en varios linfomas y leucemias<sup>163,164</sup>. En 2001 Tam y colaboradores<sup>165</sup> sugirieron que miR-155 regulaba el gen BIC, cuya sobreexpresión se encuentra relacionada con la patogénesis de linfomas Hodgkin, mientras que en tejido linfoide sano no se expresa<sup>164-167</sup>. En 2005 se detectó la sobreexpresión de miR-155 en el linfoma difuso B de células grandes, en el que se observan niveles hasta 60 veces superiores a otros linfomas menos agresivos<sup>163</sup>.

Por tanto, y en vista de lo previamente descrito, se puede decir que en un futuro los microARNs se podrán utilizar en la práctica diaria como herramienta de ayuda para establecer el diagnóstico y pronóstico de determinados tumores. Por un lado, como ya se ha comentado anteriormente, los microARNs se podrían utilizar como técnica diagnóstica, tanto para diferenciar tejido sano de tejido tumoral (miR 17, miR 20, miR 92 se expresan en cáncer colorrectal y no en tejido sano)<sup>168,169</sup>, como herramienta de detección precoz (ya que los microARNs son fragmentos muy estables que no se degradan enzimáticamente en sangre periférica<sup>136</sup>), o para diagnosticar tumores de origen desconocido, puesto que cada día se están detectando más microARNs que se expresan de forma diferencial y específica en tejidos de diferente estirpe celular<sup>136</sup>, permitiendo la elaboración de bibliotecas de miRNAs. Por otro lado, además de utilidad diagnóstica, también se podrán utilizar como marcadores pronósticos. Por ejemplo, miR-21 en linfomas B difusos de células grande<sup>170</sup>, miR-141 en cáncer de próstata<sup>171</sup>, miR-25 en cáncer de pulmón<sup>172</sup>, entre otros.

Así pues, los microARNs son biomarcadores que ofrecen grandes posibilidades tanto en tumores sólidos viscerales como en procesos linfoproliferativos. En el campo de los linfomas cutáneos primarios, existe poca literatura en relación a los microARNs hasta el momento. Recientemente Ballabio y colaboradores<sup>173</sup> han identificado varios microARNs expresados en Síndrome de Sézary, que además de utilidad diagnóstica, también tienen utilidad pronóstica. En relación a los linfomas B cutáneos primarios, no existe hasta el momento nada publicado en la literatura en que se describan microARNs relacionados con los mismos, aunque son varios los grupos que están investigando sobre este tema.

# **HIPÓTESIS Y OBJETIVOS**

## HIPÓTESIS:

En la literatura se ha descrito la diferencia de expresión de microARNs en diferentes tumores (por ejemplo: let-7 en cáncer de pulmón, miR125, miR145, miR21, miR155 en cáncer de mama, miR245, miR18 en glioblastoma multiforme, entre otros). Basándonos en estos datos, nos planteamos la posibilidad de que la expresión de miRNAs en los linfomas primarios cutáneos B indolentes fuera también diferente, lo que a su vez permitiese ayudar en el diagnóstico y pronóstico de los mismos.

## OBJETIVOS:

- **Objetivo principal:**
  - determinar la expresión diferencial de microARNs entre los 2 tipos de linfomas cutáneos de células B primarios indolentes (linfoma de la zona marginal y linfoma centro folicular).
- **Objetivos secundarios:**
  - determinar si la expresión de microARNs en ambos linfomas tiene valor pronóstico,
  - determinar si la expresión de microARNs dentro de la muestra tumoral proviene de los linfocitos tumorales ó de las células acompañantes del tumor.

## **MATERIAL Y MÉTODO**

## MATERIAL Y MÉTODO:

### 1.- Selección de pacientes

Los población de estudio seleccionada consiste en una serie de 68 casos de linfomas B cutáneos primarios (30 LZM, 38 LCF) recogidos de forma secuencial retrospectivamente con carácter multiinstitucional. 37 casos se obtuvieron de las bases de datos del servicio de Dermatología y Anatomía Patológica del Hospital Universitario 12 de Octubre (Madrid) y 31 provenían de los casos consulta recibidos en el Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas (CNIO). Se diseñó un formulario con las características clínicas relevantes (Anexo 1) que fueron enviados y completados en 57 casos. Los 57 casos con formulario clínico completo fueron los que se usaron posteriormente para los análisis estadísticos. A todos los pacientes se les remitió un consentimiento informado imprescindible para la realización del proyecto (Anexo 2).

### 2.- Histología e inmunohistoquímica.

Los 68 casos de los que disponíamos muestras histológicas en parafina fueron revisados por dos anatomopatólogos expertos en linfomas en el Hospital Universitario 12 de Octubre y CNIO (Drs. José Luis Rodríguez-Peralto y Santiago Montes). Las tinciones inmunohistoquímicas fueron realizadas de forma protocolizada utilizando anticuerpos contra CD3, CD5, CD43, CD20, CD79alfa, bcl2, bcl6, CD10, cadenas ligeras kappa y lambda. Todos los casos fueron clasificados según las directrices de la clasificación de la OMS-EORTC<sup>174</sup> (Tabla 5).

ANTICUERPO	CASA COMERCIAL	DILUCIÓN	CLON
CD3	Dako	1/50	policlonal
CD5	Novocastra	1/100	4C7
CD10	Novocastra	1/20	Clon 270
BCL2	Dako	1/80	124
BCL6	Dako	1/50	Pg-b6p
MUM1	Dako	1/50	Mum-1p
CD79alfa	Dako	1/200	JCB117
CD20	Dako	1/100	L26
CD43	Dako	1/300	DF-T1
kappa	Dako	1/3	policlonal

lambda	Dako	1/3	policlonal <sup>14</sup>
--------	------	-----	--------------------------

### 3.- Extracción de ARN de muestras de parafina

Siguiendo el protocolo del CNIO, la extracción de ARN se realizó de la siguiente manera:

1.- Inicialmente se realizó el lisado del tejido para lo cual se cortaron los bloques en secciones a partir de 10 micras. Posteriormente se añadió 1 ml de xilol a cada una de las muestras y se dejaron incubar 10 minutos a 65°C con agitación. Más tarde fueron centrifugadas durante 10 minutos a 10000 rpm. El sobrenadante se retiró y se repitieron los pasos previos. Una vez repetido 2 veces el proceso anterior se añadió 1 ml de etanol absoluto a cada una de las muestras y de nuevo se incubaron 10 minutos a 65°C con agitación, para posteriormente ser nuevamente centrifugados 10 minutos a 10000 rpm. Se retiró el sobrenadante y se repitieron los pasos previos con el etanol. Tras retirar el sobrenadante por segunda vez, dejamos los pellets secando a 65°C. Una vez secados, se añadieron 500 microlitros de buffer lisis (*5x lysis buffer: 50mM Tris ph8, 0.5mM EDTA ph8, 10% SDS*) a cada muestra y 4 microlitros de proteinasa K (Kit: 50ug/ul). Se incubaron a 65°C durante el tiempo necesario para su digestión (máx. 18h) en el termomixer con agitación a 600 rpms.

2.- Tras el lisado de las muestras se realizó el proceso de precipitación: se añadieron 500 microlitros de phenol/cloroformo/isoamylalcohol 25:24:1 (nevera 4°C) y se agitaron vigorosamente sin utilizar el vortex. Posteriormente centrifugamos 10 minutos a 10000 rpms y recogimos el sobrenadante en un tubo limpio, para añadir cloroformo/isoamylalcohol 24:1 y agitar vigorosamente. Se centrifugaron las muestras 10 minutos a 10000rpm. El sobrenadante se pasó a un eppendorf limpio, al que se añadió el doble de isopropanol del volumen obtenido del sobrenadante + 1microlitro de acrilamida lineal (carrier), posteriormente se invertieron las mezclas varias veces de forma no enérgica. Dependiendo del origen de la muestra (si la muestra era muy escasa) se dejó precipitando 1 hora a -80°C o -20 °C toda la noche. Tras la precipitación se centrifugó a 4°C durante 30 minutos. Tras retirar cuidadosamente el sobrenadante, se añadió etanol 70% frío (1ml) para lavar el pellet y a continuación centrifugar 5 minutos a 4°C y 10.000rpm.

Finalmente se dejaron secar los pellets y se resuspendieron en 1 microlitro de agua libre de ARNasa dependiendo del tamaño de cada pellet.

### 4.- Hibridación

#### A) Síntesis de ADNc desde ARN total:

Partimos de 250-500 nanogramos de ARN que se separaron en tubos de 0.5 ml. Se añadieron 0.8 microlitros T7 del primer promotor y se completaron hasta 5.8 microlitros con agua libre de

<sup>14</sup> **Tabla 5.- Resumen de anticuerpos utilizados en las tinciones inmunohistoquímicas.**

nucleasas. Se desnaturalizaron durante 10 minutos sumergiendo las muestras en agua a 65°C y posteriormente se pasaron a hielo durante 5 minutos. Se hizo el ADNc master mix (5 First Strand buffer 2 + 0.1 M DTT 1 + 10mM dNTP mix 0.5 + MMLV RT 0.6 + RNaseOUT 0.3) que se añadió mediante pipeta. Se precalentó con 5x FS buffer durante 3-4 minutos a 65°C. Para cada muestra se añadieron 4.4 microlitros de ADNc MM, mezclando bien para evitar la formación de burbujas. Se incubaron durante 2 horas a 40°C en agua, posteriormente se volvieron a incubar otros 15 minutos a 65°C para inactivar MMLV-RT y finalmente se incubaron 5 minutos en hielo.

#### B) Síntesis de ARNc fluorescente procedente de ADNc:

Precalentamos la solución 50% PEG a 40°C, para posteriormente añadir a cada muestra de referencia y de ADNc una muestra secante de 0.5 (Cy3-CTP) y 0.5 (Cy5-CTP), respectivamente. Se preparó el denominado “Transcription Master mix (TMM)” (Nuclease-free water 3.83 + 4x transcription Buffer 5 + 0.1 M DTT 1.5 + NTP Mix 2 + 50% PEG 1.6 + RNaseOUT 0.12 + Inorganic Pyrophosphatase 0.15 + T7 ARN Polymerasa 0.3). A cada preparación se le añadieron 14.50 microlitros de TMM, con la que se mezcló cuidadosamente para evitar la formación de burbujas. Todas las preparaciones se incubaron 2 horas a 40°C en agua.

#### C) Purificación del ARNc amplificado:

A las muestras previas se le añadieron 75 microlitros de agua libre de nucleasas hasta alcanzar un volumen de 100 microlitros. Posteriormente se añadieron 10l BME de 1 ml RLT, para luego añadir 350 microlitros de RLT buffer. Una vez bien mezclado, se añadieron 250 microlitros de etanol 100%. A la mezcla previa se transfirieron 700 microlitros de muestra de ARNc a unas minicolumnas en tubos de 2 ml. Se centrifugaron todas las columnas 30 segundos a 13000 rpm. Añadimos 500 microlitros de buffer RPE a la columna y volvimos a centrifugar 30 segundos a 13000 rpm. Se repitió el proceso, para decantar el ARNc en nuevo tubo usando 30 microlitros de agua libre de ARNasa. Se esperó 1 minuto y centrifugamos 30 segundos a 13000 rpm (2 veces seguidas).

#### D) Cuantificación de ARNc:

La concentración de ARNc se mide usando spec/nano drop, para el que se calcula la actividad específica de la muestra. Sólo se usaron aquellas con 7-15 pmole/microlitros antes de la hibridación.

#### E) Hibridación (se realiza en el horno hibridador a 60°C):

En un nuevo tubo se añaden 1.1 microlitros de Cy3 y Cy5 con ARNc amplificado, hasta llegar a 45 microlitros añadiéndole agua libre de nucleasa. Se añaden 4 microlitros x 10 de control targets. Posteriormente añadimos 1.8 microlitros x 25 de buffer fragmentador. Mezclar con el vortex e incubar 30

minutos a 60° sumergido en agua. Posteriormente, añadimos 45 microlitos x2 de buffer HRP de hibridación, el cual termina la reacción de fragmentación.

Se introducen 90 microlitros de la solución mix de hibridación en cada una de las ranuras del sistema Agilent de hibridación, para dejar hibridando las muestras a 65°C durante 107 horas a 10 rpm.

#### F) Lavados posthibridación:

Una vez realizada la hibridación se producen lavados de los microarrays con varias soluciones de lavado hasta conseguir la pureza máxima de las muestras que posteriormente se analizarán.

Se dejan todos los contenedores, cestillo y soportes con agua destilada y NaBH<sub>4</sub> toda la noche antes de usar. Colocamos una botella con 1L de WB2 a 37°C durante toda la noche. Lavamos los contenedores cestillo y soporte con agua destilada. Colocamos 1 vaso de 2L con 1L de WB1 en un agitador a RT. Colocamos otro vaso de 2L con 1L de WB2 en agitador a 37°C. El array se introduce en una caja ópaca con WB1, del cual se despega el cristal con una pinza. Se coloca el cristal en un cestillo y se incubó en el WB1 durante 7 min en agitación. Se pasa a WB2 (37°C) e incuba de nuevo durante 7 min en agitación. El array se pasa un minuto en acetónitrilo y posteriormente, se saca despacio para secarlo. Tras esto, las muestras quedan listas para el análisis informático.

### **5.- PCR en tiempo real (RT-PCR) para la cuantificación de miRNAs usando ARN de las muestras de tejido.**

La selección de los miRNAs a detectar se realizó mediante análisis de la literatura previa, eligiendo miRNAs presentes en linfomas sistémicos o en células linfoides B sanas (**Tabla 6**). Finalmente se seleccionaron 11 miRNAs que fueron cuantificados mediante RT-PCR, extrayendo el ARN de las células de los linfomas disponibles en parafina. Se utilizaron sondas comerciales (Taqman probes) contra miR150, miR155, miR331, miR221, miR222, miR223, miR15a, miR16, miR17, miR19a, miR93.

## MicroARNs como factor pronóstico en linfomas cutáneos de células B

15

miRNA	Secuencia madura (homo sapiens)	Proteína diana descrita más relacionada	Expresión en células B o tipos de linfomas descritos.
miR-150	UCUCCCAACCCUUGUACCAGUG	v-myb myeloblastosis viral oncogene homolog (avian) (MYB)	En ganglios y bazo durante el desarrollo de las células B maduras <sup>175</sup>
miR-155	UUAAUGCUAAUCGUGAUAGGGGU	Zinc finger protein 537 (ZNF537)	Células centro germinal <sup>176</sup>
miR-331	CUAGGUAUGGUCCAGGGAUCC	zinc finger protein 513 (ZNF513)	Célula naive <sup>177</sup> y Linfomas difusos células grandes (sobrexpresado) <sup>178</sup>
miR-221	AGCUACAUUGUCUGCGGGUUUC	regulating synaptic membrane exocytosis 3 (RIMS3)	Linfomas difusos células grandes (sobrexpresado en linfomas ABC) <sup>179</sup>
miR-222	AGCUACAUCUGGCUACUGGGU	regulating synaptic membrane exocytosis 3 (RIMS3)	Células plasmáticas <sup>138</sup> Linfomas difusos células grandes <sup>180</sup>
miR-223	UGUCAGUUUGUCAAAUACCCCA	glycoprotein M6B (GPM6B), transcript variant 4	C naive y memoria <sup>138, 181</sup>
miR-15a	UAGCAGCACAUAAUGGUUUGUG	ADP-ribosylation factor-like 2 (ARL2)	Células plasmáticas <sup>138</sup> Leucemia linfática crónica (LLC) <sup>182</sup>
miR-16	UAGCAGCACGUAUUUUGGCG	ADP-ribosylation factor-like 2 (ARL2)	LLC <sup>182</sup> , Linfomas difusos células grandes <sup>179</sup>
miR-17_5p	CAAAGUGCUUACAGUGCAGGUAG	KIAA1404 protein (KIAA1404)	Célula naive <sup>138</sup>
miR-19a	UGUGCAAUCUAUGCAAACUGA	ataxin 1 (ATXN1)	Células naive <sup>138</sup> , Linfomas difusos células grandes <sup>179</sup>
miR-93	CAAAGUGCUGUUCGUGCAGGUAG	hypothetical protein LOC168850 (LOC168850)	Negativo en células CG, presente en células naive, plasmáticas y memoria <sup>138</sup>

<sup>15</sup> **Tabla 6. MicroARNs.** En la tabla se muestra la secuencia génica ([www.Targetscan.com](http://www.Targetscan.com)), la probable diana proteica y la descripción de dicho mirna en relación a células B o linfomas/leucemias donde se han descrito.

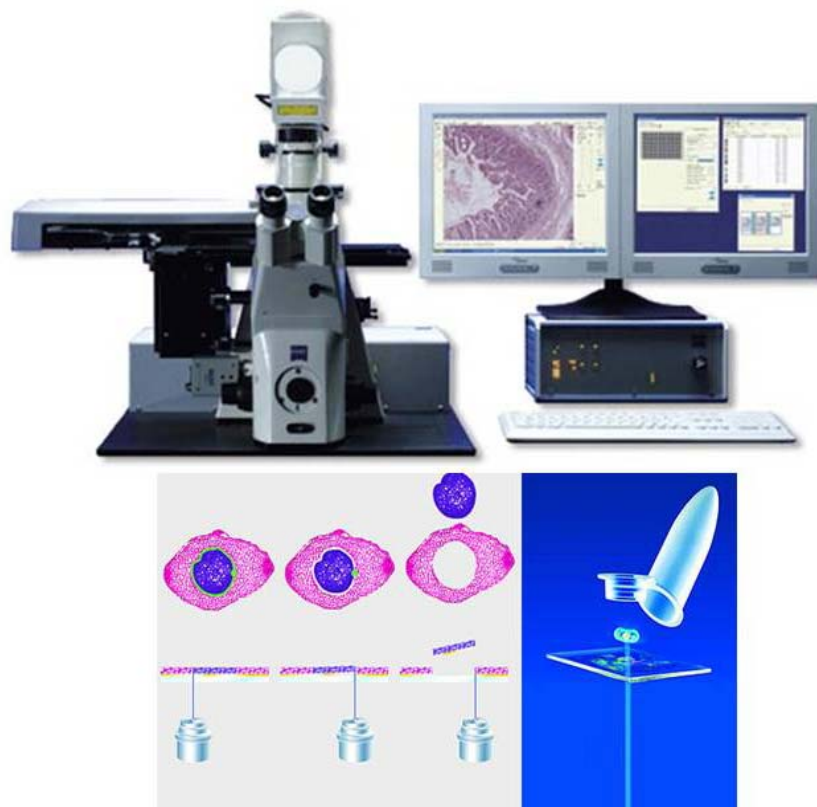
El análisis de expresión de los miRNA fue realizada mediante Applied Biosystems 384-well multiplexed real-time PCR assay con 250 ng del total de ARN. El ARN de cada caso se transcribe de forma inversa por triplicado usando un primer extraído del pool de miRNAs seleccionados además de utilizar 2 controles endógenos RNU44 y RNU6b. Cada reacción completada se carga en las placas comerciales 384-well plate y el RT-PCR se realiza con el sistema ABI 7900HT Prism 384. Dos ARNs no codificantes (RNU 44 y RNU6b), son utilizados como controles endógenos<sup>183</sup>, los valores Ct (valor medio) son exportados a los ordenadores donde se utilizó el software SDS (SDS2.3), posteriormente los datos se analizaron con Real-Time StatMiner software (INTEGROMICSTM; [www.Intergromics.com](http://www.Intergromics.com)). Se considera que un miRNA esta presente si Ct es menor de 26 en las 3 muestras biológicas replicadas; los valores  $-\Delta CT$  (valores Ct de cada miRNA de interés menos la media de expresión de los valores Ct de RNU 44 y RNU6b) son considerados para análisis estadísticos posteriores.

Siguiendo el mismo método, se realizó en un segundo paso, la amplificación de miR150, miR-155 y miR223 (puesto que fueron los miRNAs con significación estadística) en las muestras de ARN obtenidas de la microdissección (ver más adelante).

## 6.- Microdissección

Ante los resultados estadísticos de la expresión de miRNAs en las muestras tumorales, se realizó microdissección de dichas muestras para determinar el origen de la expresión de miRNAs (células tumorales o células acompañantes). Se realizó microdissección celular de las 4 muestras más significativas según la expresión de los miRNAs con implicación estadística. Para ello se utilizó el microscopio Axio Observer de Carl Zeiss y a través del software Palm-microbeam, donde se seleccionaron las zonas de interés. De las muestras de hematoxilina-eosina de los 4 casos se seleccionaron los epitelios, las zonas ricas en linfocitos no tumorales (centro germinal) y zonas de tejido intersticial (extracentro germinal). De los cristales de inmunohistoquímica se seleccionaron todas las células presentes con positividad para CD3 y CD20. Separándose por tanto 5 tubos eppendorf por cada muestra tumoral. Las muestras celulares se manipularon para extraer el ARN (ver sección 3) y poder amplificar los microRNAs mediante RT-PCR (sección 5), para posteriormente analizar estadísticamente los datos de expresión (**Figura 10**).

## Microdisector



16

### 7.- Estadística

Partimos de los conceptos clínicos de progresión como reaparición de un tumor que conlleva un aumento de estadio, mientras que recidiva sería aquel caso con aparición de nuevas lesiones pero sin cambio de estadio. Se utilizó el método t-test para la expresión diferencial de miRNAs en cada uno de los tipos de tumores. El tiempo libre hasta Progresión (PFS) fue calculado según define Cheson y colaboradores<sup>184</sup>. La distribución de supervivencia fue estimada usando el método de Kaplan-Meier<sup>185</sup> y comparada con el test log rank<sup>186</sup>. El análisis de regresión de Cox<sup>187</sup> fue utilizado para determinar el PFS con respecto a la expresión de cada uno de los datos de expresión de miRNAs. El análisis de datos fue realizado con el programa estadístico SPSS versión 15.0.0 (SPSS, Chicago, IL)..

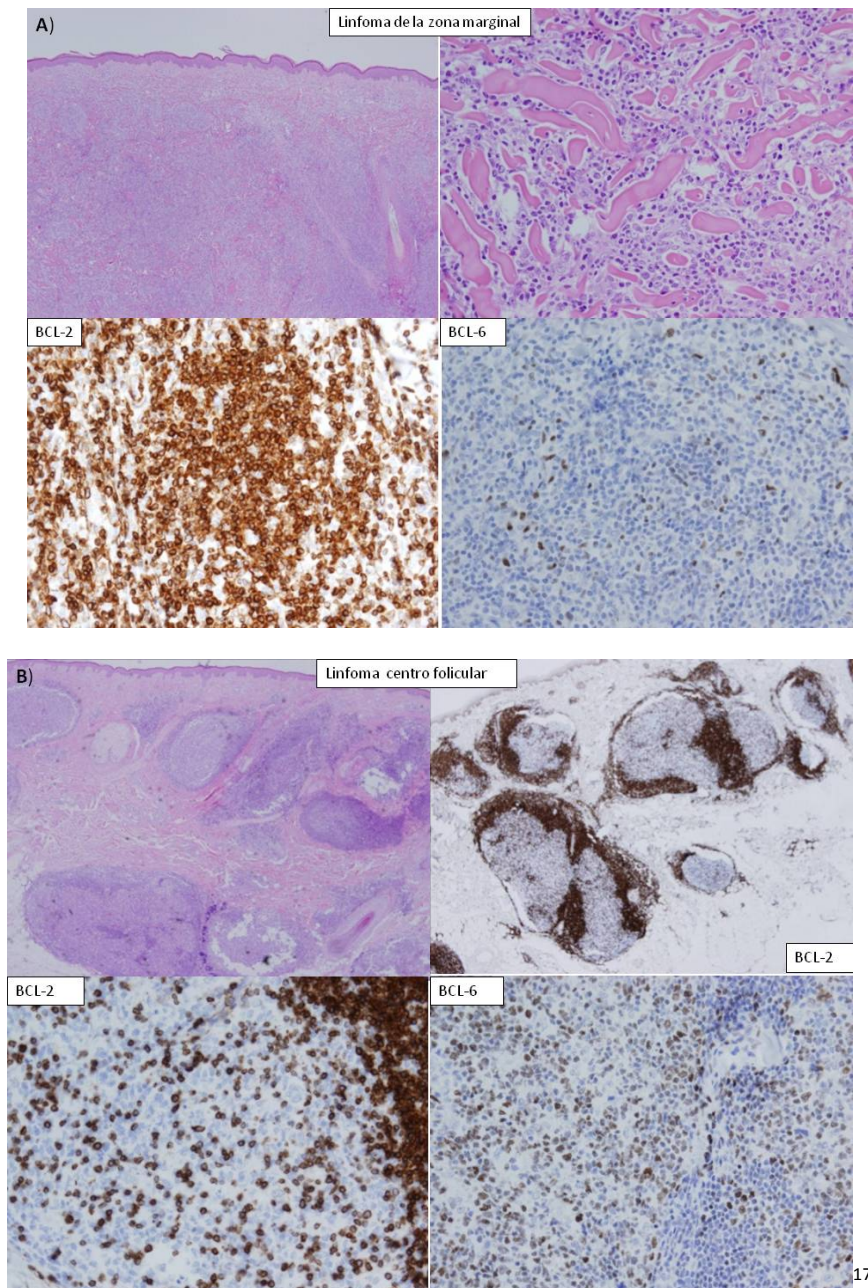
<sup>16</sup> **Figura 10.- Microdisector.** La muestra de la que se quieren separar células se coloca en la pletina motorizada del microscopio Axio Observer de Carl Zeiss, a través del software Palm-microbeam se selecciona la zona de interés. Una vez seleccionada la totalidad de la población requerida se procede a la microdisección propiamente dicha.

# RESULTADOS

## RESULTADOS:

### 1.- Características clínicas e histológicas:

Nuestra serie global consta de 68 muestras de pacientes que fueron revisadas histológica e inmunohistoquímicamente. De ellas 30 fueron diagnosticadas como LZM y 38 como LCF (**Figura 11**).



<sup>17</sup> **Figura 11.- Diferencias histológicas.** A) Hematoxilina y eosina de LZM donde se aprecia ocupación de dermis por células basófilas distribuidas de forma difusa en sábana, constituidas por una mezcla de células linfoides de diferentes

De los 68 casos en parafina, fueron completados los formularios clínicos de 57 pacientes (25 mujeres, 32 hombres) (Tabla 7). La edad media de todos los casos fue 54.65 años (rango 23-87 años). La media de seguimiento en meses fue de 46,23 (rango de 1 a 196.06 meses). Durante el seguimiento, 2 pacientes fallecieron, pero en ninguno de los casos debido al propio linfoma. La media de tiempo hasta recidiva fue de 18,78 meses, mientras que la media de tiempo hasta progresión fue de 11,68 meses (la diferencia de medias entre recidivas y progresión se debe a que el número de casos que progresaron fue menor que del número de recidivas, por lo que no coinciden). La tasa de recidiva fue de 22 casos (38.60%)(10 LZM (35,71%), 12 LCF (41,37%)) y la tasa de progresión de 11 casos (19,30%) ( 6 LZM (21,42%), 5 LCF (17,24%).

## CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS

A)

Características	TOTAL	LZM	LCF
<b>Histología</b>	57	28 (49,12%)	29(50,88%)
<b>Sexo</b>			
Mujer	25 (43,85%)	10(17,4%)	15 (26.13%)
Hombre	32 (56.14%)	18 (31.58%)	14 (24.56%)
<b>Edad al diagnóstico</b>	54,65	52,64	56,59
<b>Estadio al diagnóstico</b>			
Localizado (<T2cNOMO)	46 (80,71%)	23(82,14%)	23(79,31%)
Multifocal (>=T2cNOMO)	11 (19,29%)	5 (17,85%)	6 (20,69%)
<b>Máximo estadio alcanzado</b>			
Localizado (<T2cNOMO)	39 (68,42%)	19 (67,85%)	20 (68,96%)
Multifocal (>=T2cNOMO)	18 (31,58%)	9(32,14%)	9 (31,03%)
<b>Recidivas</b>	22 (38,60%)	10(35,71%)	12 (41,37%)
<b>Progresiones</b>	11(19,30%)	6(21,42%)	5(17,24%)

B)

LOCALIZACIÓN	TOTAL	LZM	LCF
<b>CABEZA</b>	19(28,78%)	10	9
<b>CUERO CABELLUDO</b>	6 (9,09%)	2	4
<b>TRONCO</b>	4 (6,06%)	3	1
<b>BRAZOS</b>	27 (40,90%)	13	14
<b>PIERNAS</b>	10 (15,15%)	7	3
<b>NÚMERO LESIONES</b>	<b>TOTAL</b>	<b>LZM</b>	<b>LCF</b>
<b>1</b>	32 (56,14%)	14	18
<b>2 A 4</b>	22 (38,60%)	14	8
<b>5 O MÁS</b>	3 (5,26%)	0	3

18

tamaños. Con técnicas de inmunohistoquímica se observa expresión difusa para BCL-2 y ausencia de expresión para BCL-6. B) LCF positivo para BCL-6 y negativo para BCL-2 en las células tumorales.

<sup>18</sup> **Tabla 7. Características clínicas.** Se recogen los datos clínicos más relevantes de la serie de pacientes y separado por subtipo histológico.

Se realizó un análisis de regresión de Cox univariante entre diferentes variables clínicas (edad, sexo, estadio al diagnóstico, estadio máximo alcanzado), pero no hubo diferencias estadísticamente significativas entre las variables clínicas y el pronóstico de los casos (**Tabla 8**).

## CORRELACIÓN VARIABLES CLÍNICAS CON PRONÓSTICO

	RR	95% IC de RR		VALOR p
		Mínimo	Máximo	
Sexo	,707	,207	2,417	,580
Edad al diagnóstico	1,734	,529	5,686	,363
Estadio al diagnóstico	,034	,000	16,201	,282
Estadio máximo	2,531	,772	8,298	,125

19

Los tratamientos recibidos por los pacientes fueron: cirugía (32 casos), radioterapia local (16 casos), rituximab intralesional (5 casos), corticoterapia tópica o sistémica (4 casos) y quimioterapia (3 casos). Dos casos no recibieron ningún tratamiento, solamente se les realizó seguimiento. En 4 casos no disponemos de los datos referentes al tratamiento realizado. En 9 casos, se necesitó más de 1 tratamiento para conseguir la remisión completa (**Tabla 9**), mientras que el resto lo consiguieron con el primer tratamiento realizado.

<sup>9</sup> **Tabla 8. Correlación variables clínicas con pronóstico.** No encontramos significación estadística entre las variables clínicas y el pronóstico de LCCB (consideramos el número de progresiones para calcular el pronóstico).

## TRATAMIENTOS Y TIEMPOS DE SEGUIMIENTOS

TRTAMIENTOS	TOTAL	LZM	RC	LCF	RC
Cirugía (QX)	32 (56,14%)	19	78,94%(15/19)	13	84,61% (11/13)
Radioterapia (RT)	16 (20,07%)	8	100%	8	87,5% (7/8)
Rituximab IL (RX)	6 (8,77%)	2	100%	4	100%
Quimioterapia (QT)	3 (5,26%)	1	100%	2	100%
Corticoterapia (ST)	4 (7,07%)	2	100%	2	50%(1/2)
No tratamientos(NT)	2 (3,51%)	1	100%	1	100%
>1 tto	9(15,79%)	5(55,5%)	100%	4((44,44%)	100%

	TOTAL	LZM	LCF
Tiempo hasta recidiva (media)	18,78	9,1619	25,51
Tiempo hasta progresión (media)	11,68	9,1619	14,62
Tiempo de seguimiento (meses)	46,23	52,62	40,71

20

### 2.- Diferencias de expresión de miRNAs entre ambos grupos de linfomas cutáneos primarios:

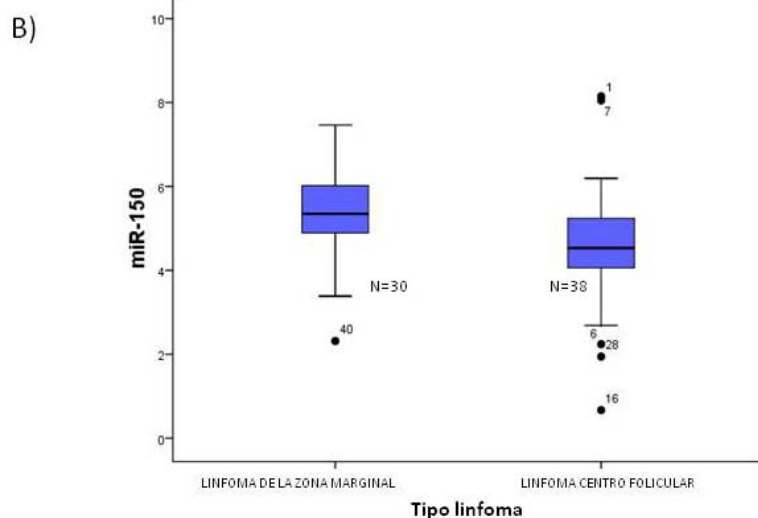
En la serie inicial de 68 casos de LCCB (30 LZM, 38 LCF) se calculó la expresión de 11 miRNAs. Tras el análisis de expresión diferencial mediante t-test entre ambos grupos histológicos, sólo miR-150 mostró una expresión diferencial estadísticamente significativa entre ambos grupos ( $p < 0.05$ ). MiR-150 se encontró sobreexpresado en el subtipo LZM en comparación con la media de expresión del subtipo LCF. MiR-223 no presentó valores estadísticamente significativos, pero sí una tendencia hacia la significación estadística (Figura12).

<sup>20</sup> **Tabla 9. Tratamientos y tiempos de seguimiento.** Se objetivan los diferentes tratamientos recibidos por los pacientes tanto en conjunto como por tipo histológico. En la parte inferior se muestran los tiempos de seguimiento y el tiempo hasta recidiva y progresión en el total de los 57 casos y por grupo histológico. LZM: linfoma de la zona marginal, LCF: linfoma centro folicular, RC: remisión completa.

### EXPRESIÓN DIFERENCIAL DE MIRNAS ENTRE LINFOMAS DE LA ZONA MARGINAL Y LINFOMAS CENTRO FOLICULARES

A)

miR	LZM(30)	LCF (38)	Unadj.p	FDR_indep
	Media de expresión	Media de expresión		
<b>mir150</b>	<b>5,2613</b>	<b>4,5477</b>	<b>0,0050143</b>	<b>0,0551576</b>
mir223	3,7152	3,2908	0,0244867	0,1346768
mir93	-,0308	,2376	0,2137411	0,6646265
mir155	2,7541	3,1038	0,2416824	0,6646265
mir16	4,7705	4,6505	0,4114395	0,7670731
mir17_5p	-2,2914	-2,0292	0,4184035	0,7670731
mir19a	-,0749	-,0287	0,5820414	0,9146365
mir15a	-3,1351	-3,0808	0,7298915	0,9367585
mi221	-2,9758	-2,9312	0,7681063	0,9367585
mir222	-1,3256	-1,5195	0,9157564	0,9367585
mir331	-,6681	-,6960	0,9367585	0,9367585



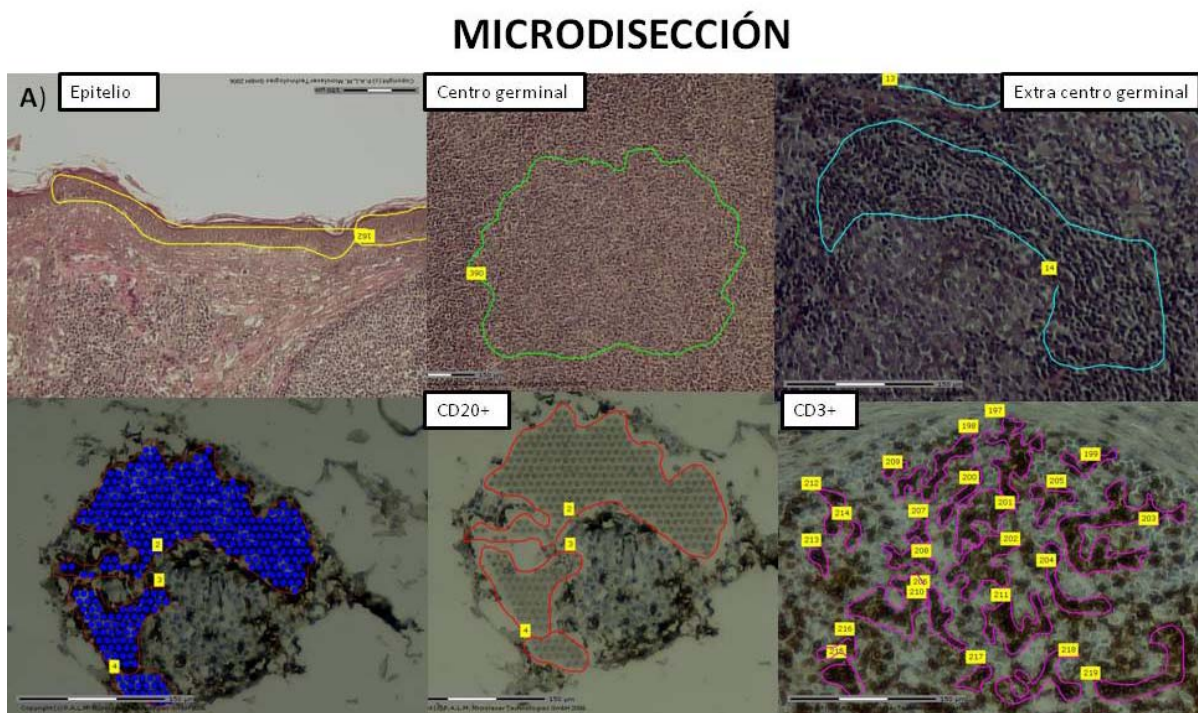
21

<sup>21</sup> **Figura 12. Expresión diferencial microARN en LCCB.** A) Mir-150 se encuentra sobreexpresado en LZM en comparación con muestras de LCF (T-test  $p < 0.05$  and FDR  $p < 0.1$ ). B) Bloxpot de la expresión de miR-150 por RT-RCP según el tipo histológico. MiR-150 se encuentra sobreexpresado en LZM comparado con LCF.

### 3.- Microdissección

Una vez obtenida la expresión diferencial de miRNAs entre ambos grupos histológicos, se realizó una determinación de microARNs tras la microdissección de 5 grupos celulares dentro de las muestras en parafina (hematoxilina e inmunohistoquímica con CD3 y CD20). Se extrajeron mediante microdissección grupos celulares procedentes del epitelio, centro germinal, células extracentro germinal, y células CD3+ y CD20+. Se extrajo ARN de cada uno de los grupos celulares y se cuantificaron para determinar la expresión de 3 miRNAs. Se seleccionaron miR-150 (expresión diferencial entre ambos grupos), miR-223 (por ser el más próximo a la significación estadística tras miR-150) y miR-155 (por presentar relevancia pronóstica, como se expone posteriormente).

Como se observa en la **Figura 13**, la expresión de los 3 miRNAs es mayoritaria en el grupo de células extragerminales. Igualmente es mayor la expresión de los 3 miRNAs en las células CD20+, siendo la expresión de miR-150 la más representativa, aunque dicho miRNA también se expresa en las células CD3+.



B)

CASO	ORIGEN CELULAR	NÚMERO DE CÉLULAS	miR150 (normalizado)	miR155 (normalizado)	miR223 (normalizado)
LZM	Epitelio	13568	0,29	0,23	0,20
LZM	Centro germinal	13290	0,26	0,19	0,15
LZM	Extra centro germinal	20574	<b>0,40</b>	0,19	0,13
LZM	CD20+	26788	<b>0,29</b>	<b>0,27</b>	<b>0,20</b>
LZM	CD3+	41457	0,15	0,05	0,03

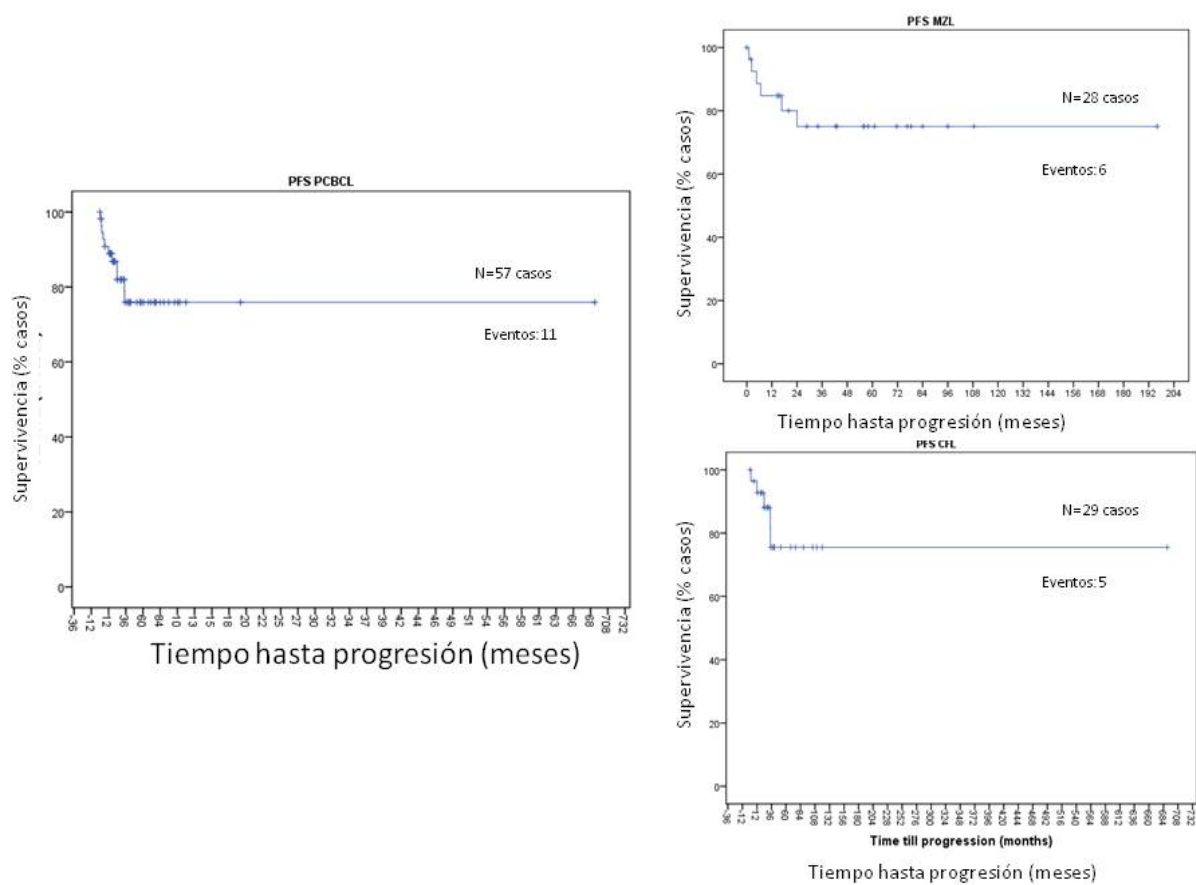
22

#### 4.- MiRNAS con valor pronóstico en LCCB.

Analizamos la correlación entre los valores de expresión de miRNAs y el valor pronóstico en los 57 casos de los que disponíamos seguimiento clínico. Ambos subtipos histológicos presentaban similar pronóstico en términos de tiempo libre hasta progresión (PFS) (**figura 14**) y tiempo libre hasta recidiva (RFS) (**figura 15**), como se puede observar en las curvas Kaplan Meier.

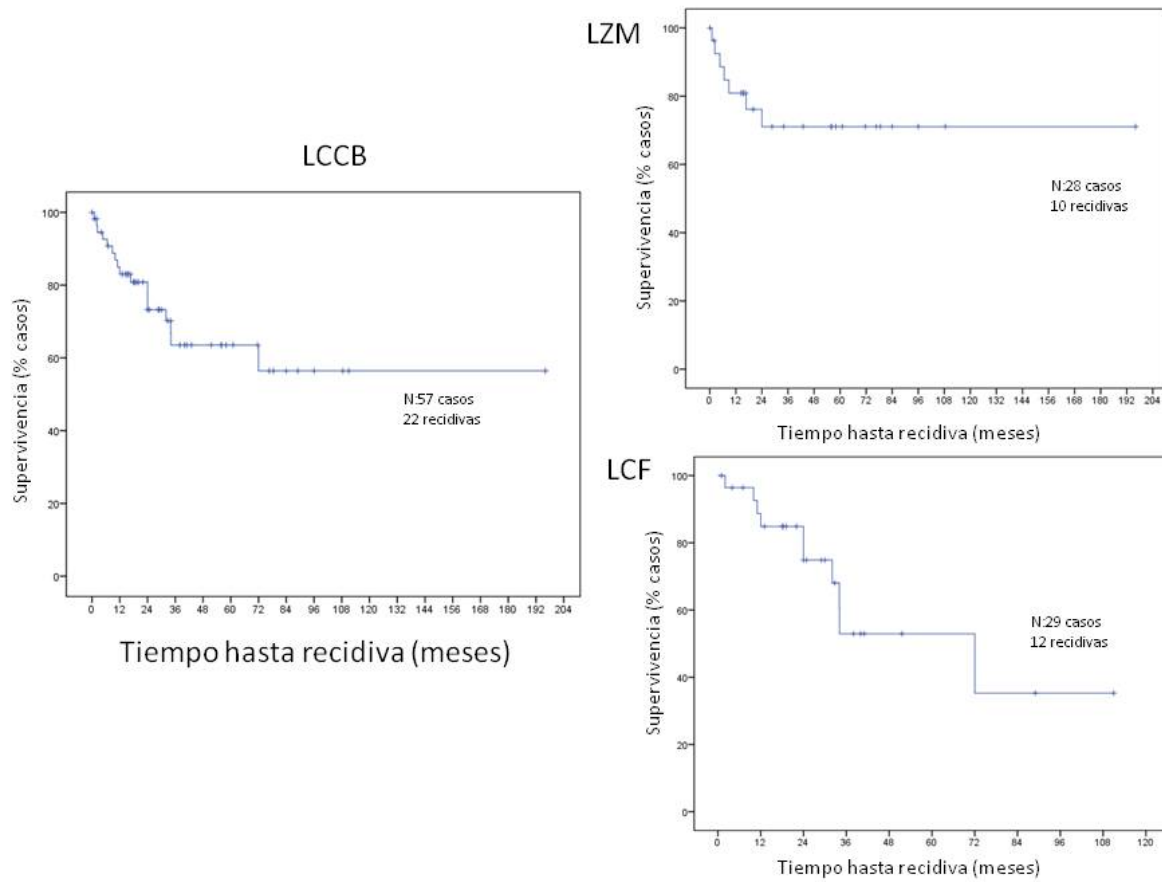
<sup>22</sup> **Figura 13. Microdissección.** A) Se objetivan las imágenes histológicas de la microdissección de los 5 compartimentos celulares. B) Resultados de expresión de miRNAs en cada compartimento.

## CURVAS DE TIEMPO HASTA PROGRESIÓN (PFS)



<sup>23</sup> **Figura 14.- Curvas Kaplan Meier de tiempo libre hasta progresión.** Como se puede observar tanto la curva de tiempo hasta la progresión global (A), como las de por subtipos histológicos (B: zona marginal) (C: centro folicular) son similares.

## CURVAS DE TIEMPO HASTA RECIDIVA (RFS).



La relación entre los valores de expresión de todos los miRNAs estudiados y el pronóstico clínico (PFS) fue analizado mediante regresión de Cox univariante. Sólo los valores de expresión de miR-155 y miR-150 presentaron una significación estadística con respecto a PFS ( $p < 0.1$ ). Los bajos niveles de expresión de miR-155 y miR-150 se asociaron con el aumento de riesgo de progresión (PFS más corto) en toda la serie (57 casos). Sin embargo, haciendo la regresión de Cox en cada uno de los grupos histológicos, encontramos que miR-155 y miR-150 sólo presentaba valor pronóstico en el subtipo histológico de LCM ( $p < 0.1$ ), mientras que en el grupo de LCF no presentaba significación estadística ( $p > 0.1$ ) (Figura 16).

<sup>14</sup> **Figura 15.- Curvas Kaplan Meier de tiempo libre hasta recidiva.** Como se puede observar, la curva de tiempo hasta la progresión global (izquierda), es similar a la curva de tiempo hasta recidiva del grupo histológico de linfomas de zona marginal (superior derecha), mientras que el subtipo de linfomas de centro folicular presenta menor tiempo hasta recidiva (inferior derecha).

## RIESGO RELATIVO DE PROGRESIÓN

A)

LINFOMAS CUTÁNEOS PRIMARIOS B (57 casos)

	Riesgo relativo	95,0% IC para RR		P
		Inferior	Superior	
mir155	,375	,156	,902	,029
mir150	,727	,503	1,052	,091
mir15a	,801	,437	1,467	,472
mir16	,651	,223	1,902	,432
mir17_5p	,662	,349	1,255	,206
mir19a	,554	,200	1,541	,258
mir93	,792	,386	1,626	,526
mir221	1,170	,752	1,819	,486
mir222	1,145	,684	1,918	,606
mir223	,690	,365	1,304	,253
mir331	,635	,297	1,357	,241

B)

LZM(28 casos)

	Riesgo Relativo	95,0% IC RR		P
		Inferior	Superior	
mir155	,357	,110	1,161	,087
mir150	,173	,057	,531	,002
mir15a	,700	,248	1,973	,500
mir16	,662	,155	2,825	,577
mir17_5p	,687	,295	1,598	,383
mir19a	,627	,130	3,009	,559
mir93	,783	,250	2,454	,675
mir221	1,229	,642	2,355	,534
mir222	1,079	,495	2,350	,848
mir223	,398	,125	1,267	,119
mir331	,364	,096	1,376	,136

C)

LCF (29 casos)

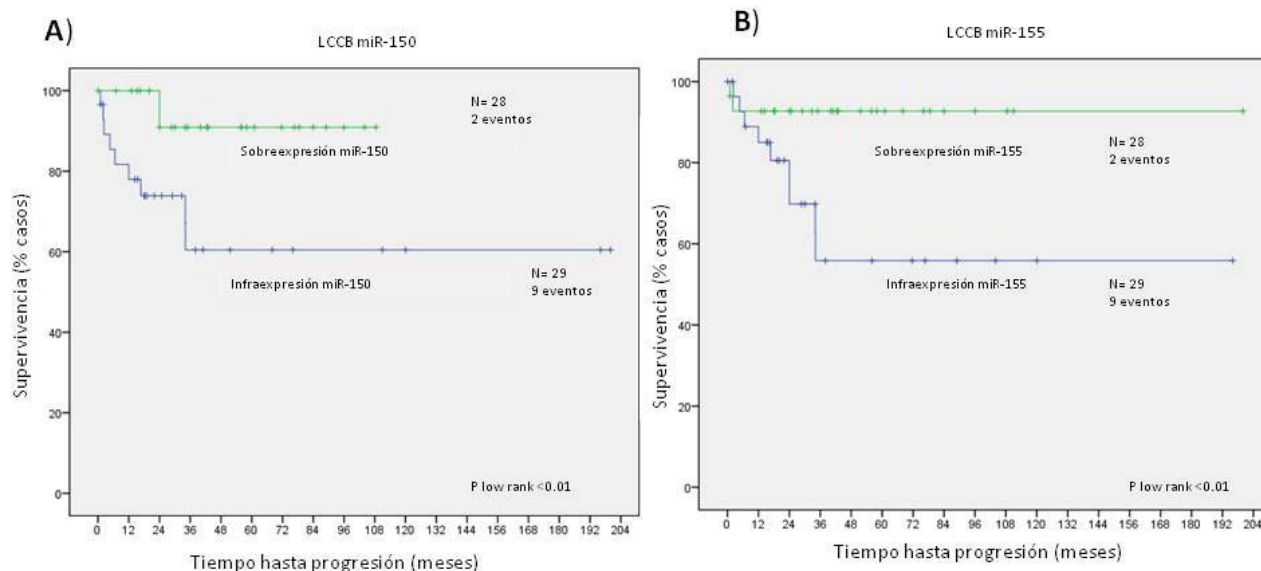
	Riesgo relativo	95,0% IC RR		P
		Inferior	Superior	
mir155	,477	,128	1,784	,271
mir150	,974	,553	1,715	,927
mir15a	,902	,409	1,990	,798
mir16	,639	,128	3,187	,585
mir17_5p	,676	,253	1,803	,434
mir19a	,476	,121	1,882	,290
mir93	,826	,324	2,108	,690
mir221	1,111	,598	2,064	,738
mir222	1,182	,599	2,334	,630
mir223	,776	,309	1,948	,589
mir331	,888	,296	2,540	,796

25

Posteriormente, se estratificaron los valores de expresión de miR-150 y miR-155 como variables continuas, cogiendo como punto de corte la mediana de expresión de cada uno. Así se clasificaron en 2 grupos: con expresión de miRNA bajo (por debajo de la mediana) y con expresión de miRNA alto (por encima de la mediana). La separación de los pacientes según la expresión de ambos, miR150 y miR155 se correlaciona con PFS (low rank test  $p < 0.05$ ) en toda la serie (**Figura 17**). En el grupo de LZM, la baja expresión de ambos, miR150 y miR155, también se correlaciona con una PFS más corta (**Figura 18**), mientras que en el grupo histológico de LCF no hemos encontrado una significación estadística que correlacione PFS con la baja expresión de miRNAs (**Figura 19**).

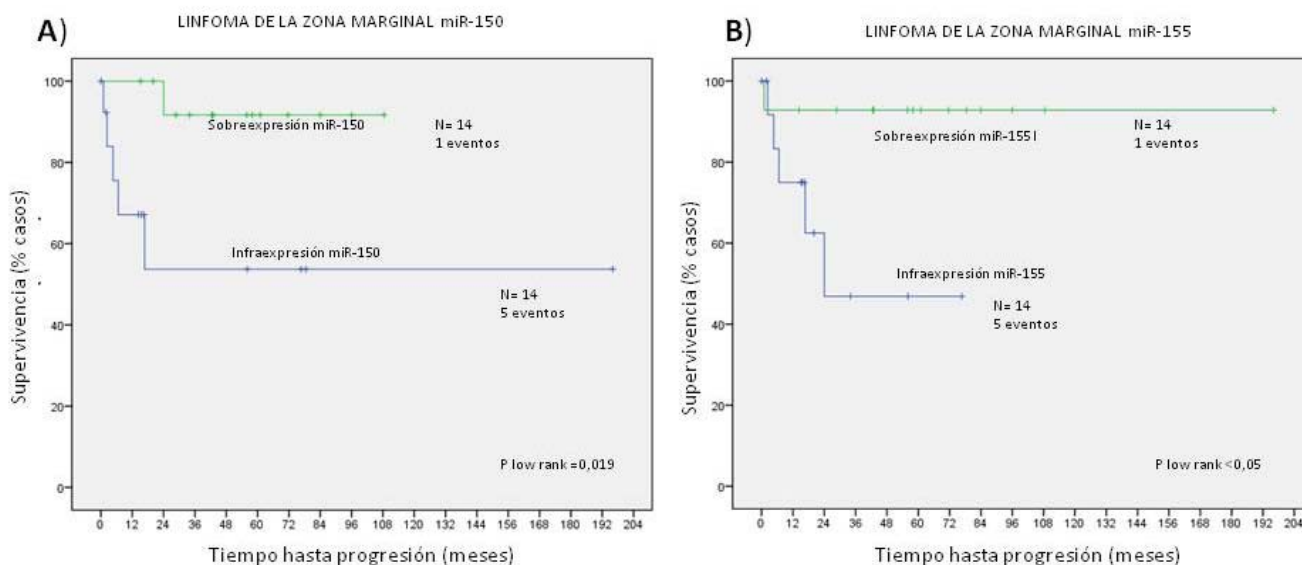
<sup>25</sup> **Figura 16. Riesgo relativo de progresión según expresión de miRNAs.** En esta figura se muestran los resultados del test univariante de Cox, en el se puede observar a la izquierda una tabla con los riesgos relativos (RR) de cada uno de los mirnas analizados con el pronóstico, siendo significativos miR155 y mir150, lo cual se reproduce en el grupo de LZM (b), mientras que no se repite en LCF(c).

**Figura 17. PFS según la expresión de miR-150 y miR155 en 57 casos**



26

**Figura 18. PFS según expresión miR-150 y miR-155 en LYM**

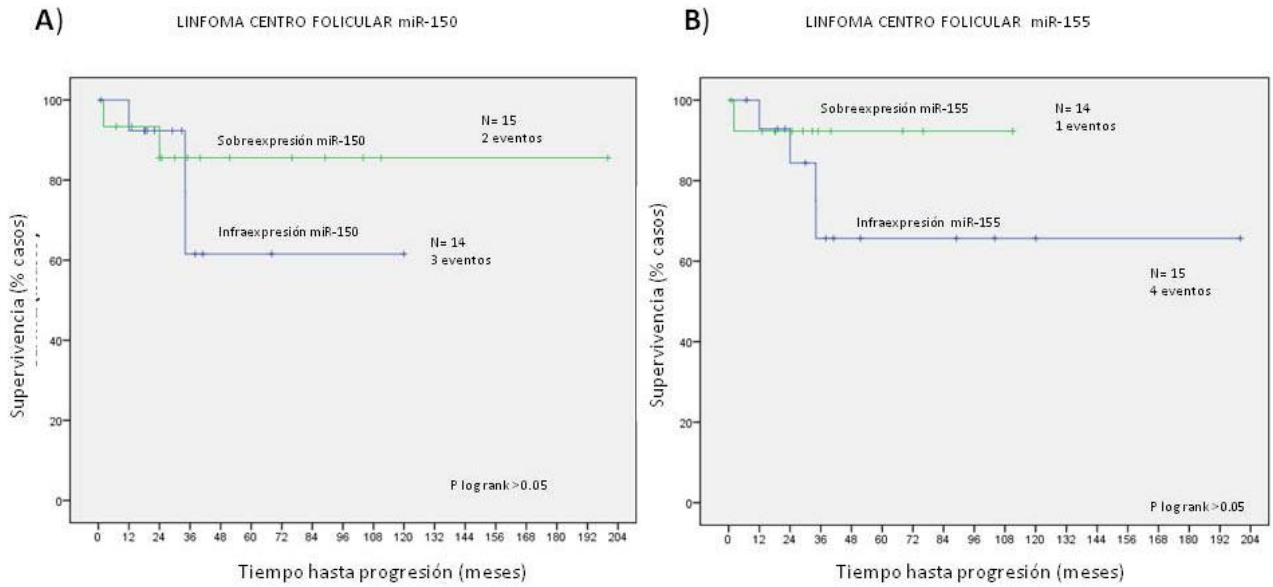


27

<sup>26</sup> Figura 17. PFS según expresión de miR-150 y miR155 en toda la serie tras dicotomizar según la mediana de expresión de ambos miRNAs. Aquellos pacientes con sobreexpresión de miR150 y miR155 presentan mejor pronóstico que aquellos con infraexpresión de los mismos.

<sup>27</sup> Figura 18. PFS según expresión de miR-150 y miR-155 en el grupo histológico de LYM tras dicotomizar según la expresión de la mediana. Se mantiene la tendencia de la serie global.

**Figura 19. PSF según expresión de miR-150 y miR-155 en LCF**

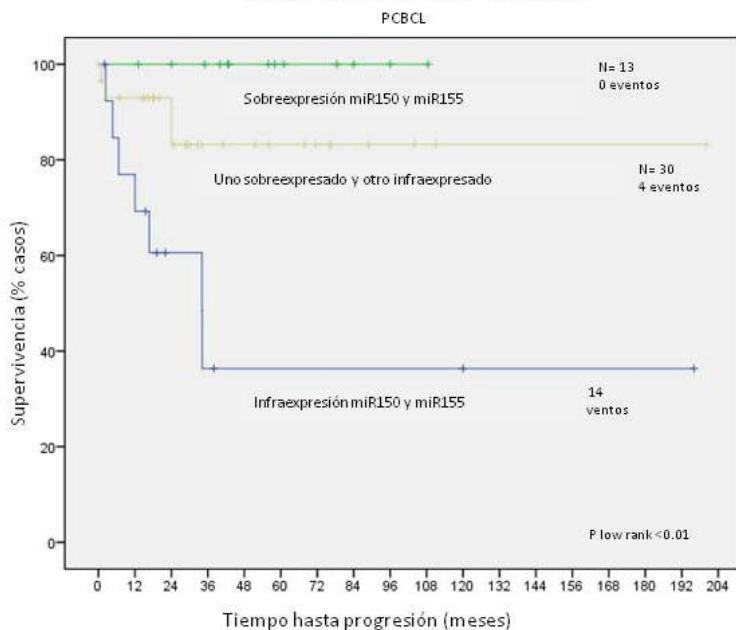


28

Además, se establecieron 3 grupos de pacientes según la expresión conjunta de miR150 y miR155. Grupo 1) aquellos con baja expresión de ambos miRNAs 150 y 155 (14 pacientes); grupo 2) pacientes con baja expresión de uno de ambos miRNAs (155 ó 150) (30 pacientes); grupo 3) pacientes con altos niveles de expresión de ambos miRNAs (13 pacientes). En concordancia con los resultados previos, aquellos pacientes con baja expresión de ambos miRNAs (Grupo 1: 14 casos con 7 progresiones) presentaron peor pronóstico que aquellos con expresión alta de ambos (0 progresiones de 13 casos) o de 1 de los miRNAs (4 progresiones de 30 casos) (**Figura 20**). Este efecto de miR150 y miR155 es dependiente del subtipo histológico. Después de estratificar a los pacientes según subtipo histológico, la pérdida de miR150 y miR155 identifica a pacientes con peor pronóstico en el grupo de LZM ( $p < 0.01$ ) (**Figura 21**), mientras que no lo hace en el grupo de LCF ( $p > 0.05$ ) (**Figura 22**).

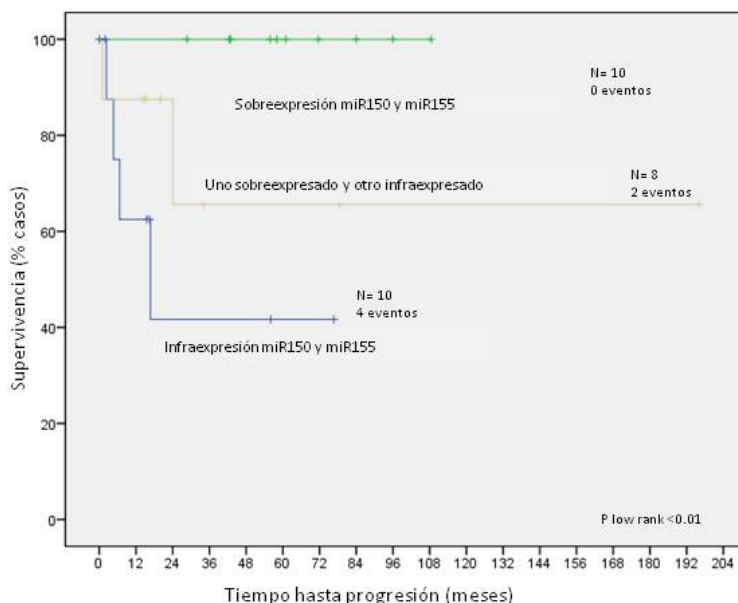
<sup>28</sup> **Figura 19. Curva Kaplan Meier de LCF tras dicotomizar según mediana de expresión de miR150 y miR155 por separado.** Como se puede observar no es significativa dicha expresión en relación con el pronóstico.

**Figura 20. PFS según la expresión conjunta de miR-150 y miR-155 en los 57 casos**



29

**Figura 21. PFS según la expresión conjunta de miR-150 y miR-155 en LZM**

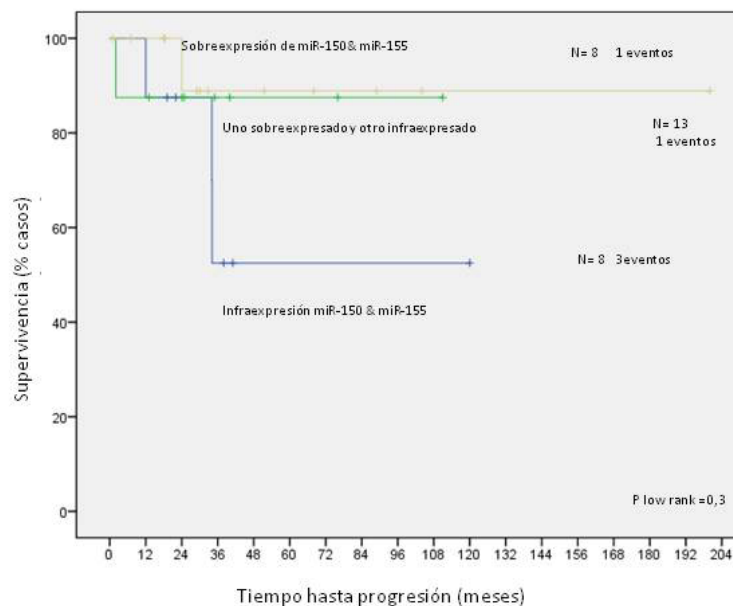


30

<sup>29</sup> **Figura 20. Curva Kaplan Meier de serie global según expresión conjunta de miR150 y miR155.** Tras dividir la expresión de miR150 y miR155 según si están sobreexpresados ambos, uno de ellos o ninguno.

<sup>29</sup> **Figura 21. Curva Kaplan Meire de grupo de linfomas zona marginal según expresión conjunta de miR150 y miR155.** Tras dividir la expresión de miR150 y miR155 según si están sobreexpresados ambos, uno de ellos o ninguno. Se observa que sigue la misma tendencia que en la serie global.

**Figura 22. PFS según la expresión conjunta de miR-150 y miR-155 en LCF**



31

El riesgo relativo de progresión (RR) para cada uno de los miRNAs se muestra en la **Figura 16** (ver más arriba). El RR de la expresión de miR-155 es 0,375 (IC 95% 0.156-0.902) y de miR-150 es 0,727 (IC 95% 0.503-1.052). Por tanto, la baja expresión de ambos se relaciona con peor pronóstico (PFS más cortas).

<sup>31</sup> **Figura 22. Curva Kaplan Meier del subtipo de linfomas centro folicular según expresión de miR150 y miR155 conjunta.** Tras dividir la expresión de miR150 y miR155 según si están sobreexpresados ambos, uno de ellos o ninguno, se observa que la expresión de miRNAs no tiene significación estadística.



## **DISCUSIÓN**

## DISCUSIÓN:

Los miRNAs son fragmentos de ARNs no codificantes, con una creciente utilidad como marcadores en diferentes neoplasias, tanto en sólidas viscerales como hematológicas<sup>136,154,161,188-191</sup>. Existe una evidencia mayor sobre su papel en la regulación del crecimiento celular, especialmente en tumores, con una expresión diferencial dependiente del estado patológico celular<sup>138</sup>. Además se ha descrito su asociación a determinados estadios evolutivos celulares. Esto es particularmente evidente en la diferenciación linfoide, en la que la expresión de miRNAs está muy relacionada con los diferentes estadios en la diferenciación de células B<sup>192</sup>. A día de hoy, existen muchos ejemplos sobre el valor diagnóstico y pronóstico de los miRNAs en diferentes tipos de cáncer<sup>138,154,168,169,183,193,194</sup>.

### *MiR-150 y miR-155 en neoplasias*

En diversas neoplasias de órganos sólidos se han descrito el papel que miR-150 y miR-155 representan en ellos.

El *cáncer pancreático* es uno de los tumores con peor pronóstico entre los cánceres, básicamente debido al diagnóstico tardío y a la falta de tratamientos eficaces. Recientemente se ha descrito una proteína llamada MUC4, que es una proteína transmembrana cuya función es promocionar el crecimiento, invasión y diseminación metastásica de las células pancreáticas en dichos cánceres. El ARN de MUC4 contiene una región que al unirse a miR-150 produce la infraexpresión de los niveles de la proteína MUC4. Esta infraexpresión está asociada a su vez con un descenso en los niveles del receptor del factor de crecimiento epidérmico humano, y de la fosforilación del mismo, con una reducción de la señalización celular pancreática. Los mismos autores han descrito que en el cáncer pancreático, la expresión de miR-150 está disminuida, lo que a su vez está asociado a la sobreexpresión de la proteína MUC4 en el tejido pancreático neoplásico. MiR-150 funciona en este tipo celular inhibiendo el crecimiento, migración y la facilidad de invasión de las células pancreáticas tumorales. Por tanto, en este tipo de tumores, miR-150 ha demostrado ser un regulador de MUC4 y un miRNA supresor de tumores<sup>195</sup>.

Los niveles de miR-150 también se encuentran alterados en el *cáncer gástrico*, como ha demostrado el grupo de Wu y colaboradores<sup>196</sup>. En el tejido normal gástrico miR-150 se encuentra infraexpresado, mientras que en las células de cáncer gástrico los niveles se encuentran sobreexpresados. Este grupo ha descrito como diana génica relacionadas con miR-150 la proteína EGR2 (una proteína supresora de

tumores<sup>196</sup>), cuyos niveles se encuentran inversamente relacionados con los de miR-150, ya que se encuentran bajos en el tejido del cáncer gástrico.

El receptor de la proteína P2X<sub>7</sub> regula el crecimiento celular activando la apoptosis. Se ha visto que los niveles de esta proteína son menores en las células de algunos carcinomas que en células epiteliales normales. MiR-150 regula la proteína P2X<sub>7</sub> inversamente, de manera que al inhibir la expresión de miR-150 aumenta la expresión de P2X<sub>7</sub>. Esto se ha demostrado en células de *cáncer de mama y de próstata*, donde la expresión de miR-150 se encuentra sobreexpresada, con la consiguiente disminución de P2X<sub>7</sub><sup>197</sup>.

La función reguladora de miR-150 se ha relacionado con varias dianas génicas, y es el estudio del desarrollo de las células inmunológicas, el campo que más datos relevantes está aportando, tanto a nivel del proceso de la inflamación como del desarrollo de tumores hematológicos y linfoproliferativos.

Una de las primeras dianas génicas descritas para miR-150 fue MYB (v-MYB mieloblastosis viral oncogene homolog), la cual se objetivó en un estudio realizado por Barroga y colaboradores, que demostraron que la trombopoyetina aumentaba la expresión de miR-150 con la consiguiente disminución de los niveles de MYB en los megacariocitos<sup>198</sup>.

En la *leucemia mieloide crónica* (LMC) se ha demostrado que miR-150 puede ser un marcador para valorar la respuesta terapéutica, como ha demostrado el estudio de Flamant y colaboradores<sup>199</sup>. Estos autores demostraron que en pacientes con LMC tratados con imatinib aumentaba la expresión de miR-150 y miR-146a en sangre periférica, siendo hasta 3 veces mayores los niveles que antes de comenzar el tratamiento. Esta diferencia en la expresión de miR-150 y miR146 también era diferente al compararlos con los niveles de pacientes controles sanos. También demostraron que en aquellos pacientes en fase crónica o con crisis blástica presentaban una caída de hasta 30 veces de los niveles de miR150 en sangre periférica en comparación con sangre sana. Otro grupo también demostró que en pacientes con LMC los niveles de miR-150 junto con otros miRNAs se encuentran disminuidos en las células mieloides también en médula ósea, en comparación con pacientes sanos<sup>200</sup>. C-Myb se encuentra sobreexpresado en pacientes con LMC. Flamant y colaboradores consideran que estos resultados, junto con la asociación entre miR-150 y c-Myb, participan en la transformación de BCR-ABL<sup>199</sup>. BCR-ABL es la proteína resultante de la transcripción de la traslocación de parte del cromosoma 9 y el 22. BCR-ABL es una tirosinquinasa que interactúa con el receptor de IL3, que a su vez permite la activación de otra serie de proteínas que mantienen continuamente activo el ciclo celular e inhibe la reparación del ADN.

El grupo de Ghisi y colaboradores<sup>201</sup> han estudiado la expresión de diferentes miRNAs en el desarrollo de las células inmune T en el timo y han demostrado que NOTCH3 es una de las dianas que es regulada por miR-150. La sobreexpresión de miR-150 genera una disminución de la traducción de la proteína

NOTCH3, lo que conlleva una disminución del desarrollo de las células T. Los receptores NOTCH controlan el ciclo celular y la fase de apoptosis en diversas células y en particular de las células T. En la fase tímica del desarrollo de las células T se encuentra altamente expresada la proteína NOTCH3, mientras que su expresión disminuye en la fase posttímica del desarrollo de las células T. Esta relación entre miR-150 y NOTCH3 parece ser un mecanismo de interés en la patogenia de la *leucemia linfática aguda (LLA)*<sup>202</sup>.

En los síndromes mielodisplásicos se ha descrito una sobreexpresión de miR-150, a diferencia de lo que hemos visto que ocurría en LMC que se encontraba infraexpresado. En este caso también se ha visto que una de las principales dianas génicas de miR-150 es *myb*, el cual se correlaciona de forma inversamente proporcional<sup>203</sup>.

MiR-155, como ocurre con miR-150, es uno de los microARNs más descrito en cánceres de diversos orígenes y cuya función reguladora se asocia con dianas génicas que participan en vías de control de desarrollo celular y vías apoptóticas.

La expresión de miR-155 se describió en el *cáncer nasofaríngeo* por Du y colaboradores<sup>204</sup>. Este miRNA se encuentra sobreexpresado en cánceres de nasofaringe relacionados con el virus de Epstein Barr. En este estudio, los genes JMJD1A y BACH1 se han identificado como dianas de miR-155, ya que la sobreexpresión de miR-155 disminuye la expresión de ambos genes. Los bajos niveles de JMJD1A se correlacionan con la diseminación ganglionar, con significación estadística, lo que a su vez se correlaciona con un peor pronóstico de los pacientes. El gen JMJD1A codifica un proteína con dominio de dedos de zinc<sup>205</sup>.

MiR-155 se ha descrito como factor pronóstico en diferentes subtipos de *cáncer de pulmón*. Así, tras analizar tres subtipos de cáncer de pulmón, se ha observado que sólo en los carcinomas epidermoides y con presencia de metástasis ganglionares, la sobreexpresión de miR-155 se correlaciona con buen pronóstico. PTEN es la diana con la que se ha correlacionado la función de miR-155 en estos tumores<sup>206</sup>, al igual que se ha descrito en linfomas NK como se verá más adelante<sup>207</sup>.

MiR-155 es uno de los miRNAs de más interés en las lesiones melanocíticas, tanto benignas, como malignas. Grignol y colaboradores han demostrado que miR-155 es uno de los miRNAs con mayor utilidad para diferenciar células de lesiones borderline melanocíticas y de células névicas normales<sup>208</sup>. De igual manera han demostrado que en *melanomas*, los niveles de miR-155 se asocian de forma estadísticamente significativa al espesor de Breslow (la pérdida de expresión se correlaciona con mayor Breslow). En el melanoma cutáneo se ha visto que miR-155 se encuentra regulado a la baja si se compara con los melanocitos normales. La proteína SKI, es un co-regulador transcripcional que se encuentra expresado en el melanoma<sup>209</sup>. La proteína SKI regula de forma negativa la vía TGF-Beta, y también actúa sobre la proteína del retinoblastoma (RB) suprimiendo la transcripción del gen de dicha proteína, con lo que activa dicha vía, lo

que conlleva a la progresión de las células del melanoma. Además se ha descrito que la proteína SKI interactúa con el receptor retinoico, interfiriendo en la vía de la diferenciación celular<sup>210,211</sup>. El grupo de Levati y colaboradores han publicado recientemente la relación entre miR-155 y la proteína SKI y su relación en el melanoma. MiR-155 disminuye la expresión de SKI. En las células de melanoma miR-155 se encuentra infraexpresado, lo que lleva a la transcripción masiva de la proteína SKI, y por tanto a la proliferación celular en el melanoma<sup>212</sup>. MiR-155 actúa como supresor de tumores en melanomas, ya que si se transfiere miR-155 a células de melanoma es posible generar apoptosis celular. De hecho, existe un estudio en que pacientes con niveles altos de miR-155 aumenta el tiempo hasta recidiva de los pacientes con melanoma metastásico<sup>213</sup>.

El *cáncer de mama* es uno de los tumores más frecuentes en la población general, y miR-155 también se ha descrito como un microARN alterado en este tumor. MiR-155 se encuentra sobreexpresado en el cáncer de mama, a diferencia de lo que ocurre en otros tumores, como hemos visto previamente. El grupo de Kong y colaboradores han descrito una probable diana génica ya que miR-155 controla la supervivencia celular y la sensibilidad al tratamiento, FOXO3a<sup>214</sup>. La sobreexpresión de miR-155 reprime la transcripción de FOXO3a. FOXO3a o FKHRL1 es el miembro más importante de un grupo de proteínas reguladoras de la transcripción. Esta proteína a su vez está regulada negativamente por la proteína AKT, SGK y IKK. La fosforilación de FOXO3a por esas 3 kinasas lleva a la migración de FOXO3a desde el núcleo al citoplasma, lo que genera la pérdida de su función proapoptótica. FOXO3a en su forma no fosforilada está ubicada en el núcleo e induce la muerte celular por la activación de las proteínas apoptóticas, BIM, p27, BNIP3, y reprime a las moléculas antiapoptóticas FLIP, BCL-XL<sup>215,216</sup>.

Otra diana que se le ha imputado a miR-155 en el cáncer de mama es SOCS1 (supresor of cytokine signaling 1). Jiang y colaboradores han demostrado que la expresión de miR-155 se correlaciona inversamente con la expresión de SOCS1 en células de cáncer de mama. A su vez, detectaron una mutación en el gen de miR-155 a nivel de 24A→G, que es el punto de unión de SOCS1, lo que lleva a una reducción de la represión de miR-155, y por tanto a la liberación de la función del mismo. En este caso, miR-155 actúa como un oncogén, ya que al reducir SOCS1 activa la proliferación celular. La sobreexpresión de miR-155 en el cáncer de mama, activa de forma constitutiva la vía STAT3 a través de la vía JAK, lo que estimula a las células del cáncer de mama por las citocinas IFN-gamma e IL-6, junto con liposacárido (LPS), los cuales regulan a su vez la expresión de miR-155, siendo por tanto miR-155 un puente entre la inflamación y el cáncer, como bien dicen estos autores.<sup>217</sup>

En la *leucemia linfática crónica* (LLC) miR-155 se ha relacionado con una diana de miR-150, el gen MYB, que se encuentra asociado al promotor de miR-155 al que a su vez también regula, estimulando su transcripción<sup>218</sup>. Por tanto, MYB no es diana de miR-155, sino que es el gen de miR-155 el que es punto de actuación de MYB.

La región promotora de miR-155 (miR-155HG) está siendo un elemento de estudio debido a que cada vez son más las evidencias del papel que representa en la actividad oncogénica de dicho miRNA. Por un lado, en el cáncer de mama, se ha demostrado que miR-155HG está regulado a la alza por TGF beta, el cual genera una alteración a nivel del nucleótido 454 activando la transcripción de miR-155<sup>219</sup>. Al activarse esta vía se bloquea la transcripción de varias proteínas incluidas RhoA, lo que disminuye la migración celular. Por otro lado, la región miR-155HG contiene una región de AP.1, que es crítica en la activación de las células B, lo que se ha demostrado en linfomas Burkitt<sup>220</sup>. Además como se ampliará más adelante, en linfomas tipo Burkitt también se ha demostrado que la proteína LMP1, relacionada con virus EBV, a través de NFkB estimula miR-155HG permitiendo la activación de miR-155<sup>221</sup>.

Los microARNs también se expresan en el genoma de determinados virus. Se ha descrito un microARN denominado miR-K12-11, homólogo del miR-155 en el genoma del virus herpes 8 del Sarcoma de Kaposi, el cual es homólogo de miR-155. Tal homología ha permitido determinar la función de ambos miRNAs, y su implicación en las vías proliferativas de células B<sup>222</sup>.

#### *MiR-150 y miR-155 en linfomas sistémicos*

En el campo de los linfomas sistémicos es donde más se está avanzando en cuanto a descripción de miRNAs y dianas génicas, ya que es sencilla la comparación entre células linfoides benignas extraídas de amígdala y células malignas procedentes de ganglios.

Dentro de los procesos malignos linfoides, se ha descrito un papel importante de miR-150 en los linfomas tipo natural killer (NK) cuyas células expresan Cd3- y CD56+. En las células NK normales la expresión de miR-150 es mayor que en los *linfomas NK*, donde miR-150 está muy infraexpresado. En los linfomas NK, al haber una infraexpresión de miR-150 se produce una sobreexpresión de DKC1 y AKT2 mientras que se inhibe la expresión de las proteínas supresoras de tumores BIM y p53, con la consecuente hiperproliferación celular según los estudios de Watanabe y colaboradores<sup>223</sup>. La sobreexpresión de AKT2, una proteína-quinasa tipo serina/treonina, activa la vía PI3K que es una vía proliferativa del cáncer<sup>224</sup>. La activación de la vía PI3K-AKT mediante la fosforilación de la serina 474 en la proteína AKT2 tiene un papel importante en diversos cánceres. La inhibición de esta vía reduce la activación de las telomerasas<sup>225</sup>. Por tanto, la pérdida de expresión de miR-150 y la consiguiente sobreexpresión de la vía AKT actúa activando las telomerasas e impidiendo la senescencia celular y la muerte de las mismas<sup>223</sup>.

MiR-155 se encuentra sobreexpresado en varios linfomas y leucemias<sup>163,164</sup>. Tam y colaboradores<sup>165</sup> sugirieron que miR-155 regulaba el gen BIC, cuya sobreexpresión se encuentra relacionada con la patogénesis de *linfomas Hodgkin*, mientras que en tejido linfoide sano no se expresa<sup>164-167</sup>. Los niveles de

miR-155 en el linfoma difuso B de células grandes se encuentran elevado hasta 60 veces por encima de otros linfomas menos agresivos, siendo un marcador de agresividad<sup>163</sup>

CD10 es una proteína de superficie de los linfocitos B, y un marcador pronóstico para *linfomas difusos de células grande B* (DLBCL). Es un marcador típico de las células B del centro germinal, mientras que no se expresa o muy débilmente en las células B activadas (típicas de linfomas ABC). Los pacientes con linfomas GC tienen mejor pronóstico que los del tipo ABC, además se ha descrito que los tumores del tipo ABC presentan una mayor actividad NFKB. Thompson y colaboradores en 2010 demostraron que la mayor expresión de NFKB regula la transcripción de miR-155, que a su vez se correlaciona con la reducción de expresión de PU.1 y la expresión de CD10 en las células de linfoma B. PU.1 sería un activador directo del promotor de CD10. En estudios llevado a cabo mediante inducción de miR-155 con lipopolisacáridos (LPS), se ha demostrado que al activar NFKB se activa la expresión de miR-155 lo que disminuye la proteína PU.1, que a su vez disminuye la transcripción del ARNm de CD10 y la traducción a proteína de la misma<sup>226</sup>.

La proteína **PU.1** es una diana de miR-155. En el gen de la proteína PU.1 existe una región complementaria a miR-155 en la región 3' UTR. Se ha descrito que en células B sin expresión de miR-155 disminuye la respuesta a nivel extrafolicular y del centro germinal y esto hace que las células B no generen inmunoglobulinas de alta afinidad IgG. En las células con déficit de miR-155, la proteína PU.1 está muy expresada, lo que origina una reducción de las células B que producen IgG, lo que demuestra que miR-155 juega un papel en la maduración de las células B.

PU.1 es una proteína cuya expresión inmunohistoquímica ha sido estudiada por Hoefnagel y colaboradores<sup>32</sup> en muestras de LCCB. Demostraron que aquellos pacientes con linfomas indolentes (LZM y LCF) presentan mayor expresión de dicha proteína al diagnóstico, mientras que el grupo de LCGP la expresan en menor medida. Este grupo no estudió el impacto de la expresión de PU1 en el pronóstico de cada uno de los tipos histológicos de LCCB. Este dato no está en contradicción con nuestros resultados. El hecho de que en los LZM la disminución de MIR155 (que supondría un aumento de PU1) indique peor pronóstico no es incompatible con el hecho de que los LCGP, que son linfomas agresivos, tengan una disminución de expresión de PU1. A la vista de estos resultados cabría pensar que en nuestros pacientes que tienen una pérdida de miR155, deberían de tener un aumento de PU.1, lo que tendría que darle mejor pronóstico a los mismos, pero contrasta con los resultados obtenidos en nuestro caso, donde aquellos con pérdida de miR155, el pronóstico es peor. Aún así los mecanismos intrínsecos de la relación entre miR-155 y PU.1 están todavía por determinarse.

Otra proteína relacionada con la vía NFKB y miR-155 es LMP1. LMP1 es una proteína transmembrana de señalización molecular que se activa durante la infección viral de EBV en las células que actúa de forma

homóloga al receptor de TNF. Esta proteína al activarse, genera la activación de 3 vías: NFκB, ATF-2 y AP-1 a través de la vía JNK. A través de estas tres vías LMP1 participa en la proliferación celular, apoptosis y migración, lo que contribuye a la inmortalización celular. En un estudio con células B (EBV positivas versus negativas) se demostró que las células EBV positivas presentaban niveles de miR-155 mayores. En las células donde se activaba LMP1 se inducía la transcripción de miR-155<sup>221</sup>. En este estudio a su vez se demostró que la activación de LMP1, produce una disminución de PU.1<sup>221</sup>.

A diferencia de lo que hemos visto con miR-150, otra de las vías que controla miR-155 es la vía antagonista de PI3K. PI3K cataliza la conversión del bifosfato (4,5) fosfatidilinositol a trifosfato (3,4,5) fosfatidilinositol (PIP3) que actúa como segundo mensajero para reclutar a varias proteínas, entre ellas AKT. Las señales de PI3K antagonizan con las de PTEN y SHIP. Recientemente se ha descubierto que a diferencia de lo que ocurre con las células T, las células B no presentan transformación maligna por deleciones aisladas en el gen PTEN o deleciones en SHIP, en cambio, las deleciones combinadas en PTEN y SHIP producen alteraciones letales en las células B de ratones, generando linfomas parecidos a los *DLBCL* humanos<sup>227</sup>. Pedersen y colaboradores demostraron que la elevación de miR-155 en *linfomas difusos de células grandes B* tipo ABC se correlacionaba con disminución de la proteína SHIP. El aumento de expresión de miR-155 a su vez es debido al aumento de TNFα junto con mutaciones en el genoma. La neutralización *in vitro* y *in vivo* de TNFα genera una disminución de miR-155 que evita la inhibición de SHIP, lo que evita la proliferación celular y el crecimiento tumoral<sup>228</sup>.

#### *MiR-150 y miR-155 en linfomas cutáneos primarios*

A pesar del incremento en el número de estudios sobre miRNAs en linfomas no Hodgkin ganglionares, pocos son los estudios que han examinado el patrón de expresión en linfomas cutáneos primarios, y dentro de estos, sólo existen datos publicados en con linfomas de células T primarios cutáneos, concretamente en micosis fungoide (MF) y síndrome de Sézary (SS)<sup>173,229,230</sup>.

El grupo de Ballabio y colaboradores fue el primero en describir el “miRnoma” de un linfoma cutáneo de células T (SS)<sup>173</sup>. Utilizaron un array con cientos de miRNAs, ya previamente empleado en linfomas B ganglionares<sup>192</sup>, para estudiar en sangre periférica a 21 pacientes con SS. Detectaron 114 miRNAs con expresión diferencial entre los casos de SS. De éstos, 10 miRNAs se encontraban sobreexpresados, mientras que el resto estaban infraexpresados. La expresión de miRNAs en SS varió poco con respecto a la expresión de los miRNAs observado en linfomas B ganglionares. De los miRNAs sobreexpresados, 7 de 10 eran similares a los sobreexpresados en linfomas B sistémicos, mientras que de los 20 infraexpresados 18 coincidían con el grupo de linfomas B sistémicos. Esto llevó a pensar a los autores que los miRNAs implicados en la patogenia de este tipo de tumores es similar. Dentro de este estudio, se intentó diseñar un modelo de

expresión predictivo que permitiese diagnosticar el SS. De esta forma se concluyó que la expresión individual de miR150, miR191, miR15a y miR16, en esta cohorte de casos estudiados, podría predecir con un 100% de seguridad un SS, mientras que la expresión de miR223 y miR17-5p, lo predeciría con una seguridad del 96%. Posteriormente, estos miRNAs fueron validados al compararlos con muestras de MF eritrodérmica, y sólo miR223 fue validado como marcador diagnóstico, con una sensibilidad del 96% y una especificidad del 87%. Mediante el análisis de los resultados del array estudiado por la técnica estadística ANOVA, se obtuvo que la infraexpresión de miR342 discrimina de forma muy satisfactoria el grupo de los SS, que a su vez se relaciona con la infraexpresión del gen EVL.

Un año después, el mismo grupo, liderado por Van Kester, publicó un perfil de miRNAs diferencial en linfomas cutáneos de células T, tipo MF<sup>229</sup>. En este caso compararon 19 muestras de MF en estadio tumoral con 12 muestras de dermatosis inflamatorias (liquen plano y eccema). Encontraron un perfil de 49 miRNAs diferencialmente expresados, de los cuales 39 se encontraban sobreexpresados y el resto infraexpresados. MiR155 fue uno de los que presentaba niveles de expresión mayor, junto con miR92a, aunque fue miR93 el que presentó tasas 5.8 veces mayor en las muestras de MF que en las dermatosis inflamatorias. De los 19 miRNAs infraexpresados, 2 de ellos (miR100 y miR133) también se infraexpresaban en SS, mientras que ninguno de los sobreexpresados lo hacía en SS. Los 3 miRNAs con mayor expresión en SS fueron analizados en nuestro estudio, siendo miR155 el único que presentó significación estadística como factor pronóstico en el grupo de LZM.

Recientemente, un grupo independiente al previo, ha publicado nuevos resultados de expresión de miRNAs en MF<sup>231</sup>. En este estudio se revisaron 43 muestras de MF (18 precoces y 25 tumorales). Se analizaron los siguiente miRNAs: miR-15a, miR16, miR155, let7a, let7d, let7f. De todos ellos, miR155 fue el único que se sobreexpresaba en las muestras de MF (sin llegar a conseguir la significación estadística), resultados que coinciden con los previos de Van Kester y colaboradores<sup>229</sup>. Al comparar entre ambos estadios de micosis fungoide, se objetivó que los niveles de miR155 eran mayores en estadios precoces que en estadios avanzados. En este estudio, mediante regresión de Cox se objetivó que la infraexpresión de let7a se correlacionaba con peor pronóstico en MF, ya que a menores niveles de let7a había mayor presencia de metástasis a distancia. En nuestro trabajo se han analizado 3 miRNAs de los utilizados en este estudio, miR15a, miR16 y miR155, pero ninguno de ellos mostró significación estadística diferencial entre los 2 grupos de linfomas cutáneos indolentes, a pesar de que la menor expresión de miR155 si se correlaciona con un peor pronóstico en el grupo de LZM .

A día de hoy, en la literatura médica no existe ningún trabajo publicado en relación al perfil de expresión de miRNAs en los linfomas cutáneos primarios de células B indolentes (LZM y LCF).

La aparente relación entre la expresión de miRNAs y el estadio de diferenciación celular<sup>138</sup>, nos llevó a la búsqueda de un patrón de expresión diferencial de miRNAs entre los dos grupos histológicos de linfomas primarios B indolentes. De la misma manera, que las características clínicas e histológicas tienen en la actualidad poco valor pronóstico en este grupo de pacientes (excepto en linfomas B cutáneos de células grandes tipo piernas), planteamos como hipótesis la posibilidad de utilizar microARNs como un posible marcador molecular que nos permitiera determinar qué grupo de pacientes tendrían mayor probabilidad de progresar clínicamente, con el consiguiente peor pronóstico.

En nuestra serie hemos demostrado que miR150 se encuentra sobreexpresado en el grupo histológico de linfomas de la zona marginal cutáneos. La microdissección llevada a cabo en las diferentes muestras de tejido ha revelado que la expresión de miR-150 deriva principalmente del compartimento de células extra centro germinal, con poca expresión en los centros germinales. Estos resultados sugieren que los niveles de expresión de miR-150 en linfomas de la zona marginal pueden estar, al menos, parcialmente relacionados con la presencia de dicho miRNA en el estadio diferencial post-centro germinal<sup>192</sup>. MiR-150 también se encontró expresado en células no neoplásicas de estirpe T en el microambiente (aunque en niveles menores que en las células neoplásicas B CD20+), también sugerimos que cambios en la expresión de miR-150, pueden ser debidos en cierta medida a cambios en el compartimento de células T del microambiente.

Mediante la cuantificación por RT-PCR del ARN extraído de las muestras en parafina, hemos objetivado que la baja expresión de determinados miRNAs al diagnóstico se asocia con el incremento de riesgo de progresión clínica cutánea. Los niveles bajos de expresión de miR-155 y miR-150 se correlacionan con una mayor tendencia a progresar (mayor tendencia a recidiva cutánea). Dicho efecto queda limitado al grupo de linfomas de la zona marginal, al menos en nuestra serie de casos.

En nuestro estudio también hemos encontrado que la infraexpresión de miR-150 se encuentra asociada con una PFS menor y por tanto con mayor riesgo de progresión cutánea. Además como ya se ha comentado previamente, dicho miRNA se encuentra expresado de forma diferencial entre ambos subtipos de LCCB indolentes, con menor expresión en linfomas centro foliculares que en linfomas de zona marginal.

#### *MiR-150 y miR-155 y sus dianas génicas*

A la vista de todo lo previamente expuesto, se puede decir que otros autores han validado diversas dianas génicas a las que regularía miR-150. Han demostrado que estas dianas génicas tienen un papel importante en la tumorigénesis, lo cual permitiría en un futuro buscar mecanismos que nos expliquen la etiopatogenia de los linfomas cutáneos primarios de células B.

MiR-150 se expresa en células B maduras y en células T de ganglio linfático y bazo<sup>190</sup>. En nuestro estudio tras realizar la disección celular y estudiar la expresión de miR-150, obtuvimos que la señal de expresión procedía principalmente de las células CD20+, y del compartimento formado por las células extra centro germinal.

Este miRNA es uno de los principales reguladores de la transición de células B del estadio pro-B al pre-B<sup>190</sup>, y junto a miR-181a y miR-142 regula el paso de estadio pre-B a células B maduras<sup>232</sup>. El grupo de Xiao encontró que miR-150 controla la expresión del factor de transcripción **C-Myb**<sup>175</sup>. Éste se encuentra regulado a la baja en linfomas de células B tanto en linfoma de Burkitt, en linfomas difusos de células grandes<sup>233,234</sup>. Esta observación fue confirmada por Lawrie y colaboradores<sup>191</sup> que demostraron que miR-150 se encuentra regulado a la baja en células de linfomas difusos de células grandes comparadas con células B normales<sup>235</sup>. Sin embargo, no encontraron relación entre la expresión de dicho miRNA y el pronóstico en pacientes con linfomas difusos de células grandes.

Los diferentes niveles de expresión de miR-150 encontrados entre linfomas de la zona marginal y linfomas de células del centro folicular pueden estar parcialmente relacionados con los distintos estadios de diferenciación encontrados en estos tumores y con el porcentaje de células T no tumorales del compartimento microambiental. Se necesitan más estudios para determinar si cambios en el microambiente no tumoral influyen en el pronóstico de dichos tumores.

**C-Myb** es sin duda, la diana relacionada con miR-150 que más interés ha demostrado, ya que como hemos visto previamente se ha relacionado con varios linfomas ganglionares y procesos mieloproliferativos<sup>175,199,200,203</sup> y su papel en el ciclo celular está más que demostrado. Myb se encuentra localizado en 6q22-q23<sup>236</sup>. Tras analizar los artículos sobre CGH en LCCB, cabe destacar que el grupo de Gimenez y colaboradores<sup>103</sup>, encuentran pérdidas génicas en ese locus en LCGP, pero no en linfomas cutáneos indolentes, mientras que otros autores no hallan pérdidas en ninguno de los 3 grupos<sup>97,104</sup>. A pesar de no haberse descrito hasta el momento pérdidas en este locus mediante CGH, sí que podría ser otra vía de investigación para poder explicar la etiopatogenia de estos linfomas.

MiR-150 regula la transcripción de proteínas transmembrana, como **MUC4**, descrito en cáncer pancreático, que no sabemos hasta el momento si tiene alguna función en células B, aunque sí que dicha proteína tiene un papel en el crecimiento, invasión y diseminación metastásica en células pancreáticas<sup>195</sup>. En este caso queda patente la función de miR-150 como supresor de tumores. Otra diana validada es **EGR2**, descrita en cáncer gástrico, cuya función también se ha demostrado que es supresor de tumores, y aunque EGR2 no se ha descrito hasta el momento como una vía que participe en el desarrollo de células B o en

linfomas, si que se ha visto que **EGR1**, proteína de la misma familia, tiene un papel en el desarrollo de las células linfoides B<sup>237</sup>.

MiR-150 también se ha asociado con la proteína **P2X**, que participa en la apoptosis celular<sup>197</sup>. Recientes estudios han demostrado el papel de esta proteína en el desarrollo de diseminación en linfomas ganglionares de ratones<sup>238</sup>, por tanto dicha diana podría tener un papel también en la etiopatogenia de los linfomas humanos en general y en los LCCB en particular, aunque es necesario estudios que lo puedan demostrar.

**NOTCH3**<sup>201</sup> es otra diana génica relacionada con miR-150 que puede que en el futuro tenga gran implicación a la hora de permitir comprender mejor la etiopatogenia de los linfomas tanto sistémicos como cutáneos, debido a su implicación en el desarrollo de las células inmunes T en el timo y su papel en el ciclo celular y la apoptosis de células T. Por tanto, es un gran candidato para estudios posteriores en diversos linfomas y en linfomas cutáneos en particular.

El papel de miR-150 en la vía **PI3K-AKT**, es otro de los puntos de interés para entender la etiopatogenia de los linfomas y su relación con las telomerasas<sup>223, 224, 225</sup>. Otras dianas que también se han descrito relacionadas con miR-150 como ya hemos comentado son **p53, DKC1 y BIM**<sup>223</sup>. La función de p53 como gen supresor de tumores es bien conocida y su disregulación como mecanismo que influye en diversas neoplasias y procesos linfoides malignos también<sup>239</sup>. Su papel en la etiopatogenia de los linfomas cutáneos primarios y su relación con miR-150 en los mismos puede hipotetizarse ante las evidencias en otros procesos, aunque necesita estudios que lo avalen. **DKC1** es la proteína denominada disquerina, que se ha descrito relacionada con el crecimiento celular y cuyo gen se encuentra mutado en la disqueratosis congénita<sup>240</sup>. Esta proteína actúa a nivel de los telómeros acortándolos y produciendo un envejecimiento celular. Además hay evidencias de su relación con p53<sup>241</sup>, lo que puede explicar el control de ambas por parte de miR-150. **BIM** es otra proteína implicada en la vía PI3K, y su función como proteína proapoptótica se ha descrito en varios linfomas sistémicos, como el linfoma de Burkitt<sup>242,243</sup>. Su papel como diana de miR-150, al igual que el de otros genes que codifican para proteínas que participan en el ciclo celular, necesitan ser más estudiados en LCCB, aunque puede ser otra de las proteínas que participen en el complejo mecanismo del desarrollo de estos linfomas.

La proteína **PTPTRR** es una proteína de la familia proteínas tirosin fosfatasa (PTP). Las PTPs es una familia de moléculas que regulan un conjunto amplio de procesos celulares como crecimiento celular, diferenciación, mitosis y también se ha descrito relacionado con procesos oncogénicos. El bloqueo de la producción de esta proteína se ha relacionado con cáncer colorrectal<sup>244</sup> y policitemia vera<sup>245</sup>. El gen de esta

proteína se ha relacionado con miR-150 en policitemia vera, el cual se encuentra infraexpresado. PTPTRR se ha validado como diana génica de miR-150 mediante microarrays de expresión de miRNAs<sup>245,246</sup>.

Las proteínas **AGA** y **MS4A3**, son proteínas que al igual que PTPTRR han sido descritas como dianas de miR-150 en policitemia vera. Esta relación ha sido validada mediante microarrays de expresión de miRNAs<sup>245,246</sup>. AGA es una glucosaminidasa que participa en el catabolismo de las glicoproteínas, cuyo déficit origina la aspartoglicosaminuria. MS4A3 es una proteína que se expresa en las células hematopoyéticas y participa en la transducción de señales.

**VEGF2** es otra proteína que mediante microarrays se ha demostrado que puede ser una diana génica de miR-150<sup>246</sup>. Miembro de la familia de los factores de crecimiento PDGF/VEGF, que actúa en las células endoteliales, con funciones variadas, destacando su papel en la angiogénesis y su función como proapoptótico. Su expresión se ha relacionado con cancer colorectal.

Las herramientas de bioinformática para recabar información sobre dianas génicas para determinados miRNAs ([www.Targetscan.com](http://www.Targetscan.com); [www.mirbase.org](http://www.mirbase.org), [www.microrna.org](http://www.microrna.org)), proponen dianas para miR-150 no comentadas previamente como son: **ZFP91** (Homo sapiens zinc finger protein 91 homolog), **C6orf134** (Homo sapiens chromosome 6 open reading frame 134), **CALCR** (Homo sapiens calcitonin receptor), **SMARCD1** (Homo sapiens SWI/SNF related, matrix associated, actin dependent regulator of chromatin, subfamily d, member 1, variantes 1 y 2), **COL1A1** (Homo sapiens collagen, type I, alpha 1). De todos ellos ninguno se han relacionado claramente con la función de los linfocitos B o con su implicación en el desarrollo de linfomas B cutáneos primarios, aunque dianas con menor afinidad pero con probable relación como **ELK1** (homo sapiens ELK1, member of ETS oncogene family) podrían tener implicación en la etiopatogenia de estos tumores, ya que es un oncogén implicado en otros tumores, entre ellos leucemias<sup>247</sup>. Aún así son pocas las dianas génicas que han sido validadas para miR-150 como se aprecia en la **tabla 11**.

## DIANAS MIR-150

Gen	Neoplasia	Método validación	Función
C-Myb	Leucemia linfática crónica	R, W, O	Oncogénica
P2X7	Próstata Mama	O	Proapoptótica
PTPRR	Colon Policitemia vera	M	Oncogénica
EGR2	Estómago	O	Supresor de tumores (proapoptótica)
MUC4	Páncreas	ND	Crecimiento, invasión y diseminación metastásica de las células pancreáticas
NOTCH3	Leucemia linfática aguda	ND	Control ciclo celular y la fase de apoptosis
DKC1	Linfoma NK	ND	Oncogénica. Activación telomerasa
AKT2	Linfoma NK	ND	Oncogénica. Activación telomerasa
BIM	Linfoma Burkitt	ND	Proapoptótica
VEGFA	Cancer colorrectal	O	Proapoptotico
AGA	Policitemia Vera	M	Oncogénica
MS4A3	Policitemia vera	M	Oncogénica

32

MiR-155 es uno de los microARNs relacionado con el proceso de la carcinogénesis. MiR-155 se ha relacionado con más de 800 dianas génicas en humanos<sup>249</sup>, aunque la mayoría de ellas están por validarse. Destacamos aquellas dianas que han sido validadas y relacionadas con procesos neoplásicos que puedan permitir entender mejor la etiopatogenia de los LCCB.

MiR-155 está implicado en la regulación del sistema inmune, específicamente en el control de la diferenciación de células T<sup>149,220</sup> y maduración de células B<sup>149,176,250</sup>. MiR-155 está sobreexpresado en células B y T activadas, células B del centro germinal y en monocitos activados<sup>165,192,251</sup>. En nuestro estudio al realizar la microdissección de los diferentes compartimentos celulares, sólo obtuvimos mayor expresión de miR155 en las células CD20+, lo que también apoya el origen de la expresión de dicho miRNA de las células B, aunque no hubo diferencias en la señal de expresión de miR-155 procedente de células del centro germinal y de la zona fuera del centro germinal.

La pérdida de expresión de miR-155 dirige la diferenciación celular T hacia una respuesta Th2<sup>176</sup>. MiR-155 se requiere para la regulación de la respuesta de células B tanto para antígenos timo dependiente

<sup>32</sup> **Tabla 11.- Dianas genéticas miR-150.** Abreviaturas: R: reporter gene assay; W: Western blot; R: PCR; P: Proteomica; M: Microarray O: Otras técnicas; ND: no disponible<sup>248</sup>. <http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=MIR150>.

como independientes. Parte de su efecto es debido a la regulación directa de los niveles de la proteína **PU.1**<sup>220</sup>, ya que como se ha descrito en la leucemia mieloide aguda, existe una relación directa entre miR155 y el gen PU.1<sup>252</sup>.

MiR-155 también tiene una función supresora de tumores por la cual se reduce la traslocación oncogénica generada por **AID** (activation-induced cytidine deaminase)<sup>189,253,254</sup>. La función principal del gen AID es iniciar la hipermutación somática en células B del centro germinal, lo que permite la recombinación de las regiones variables de las cadenas de las inmunoglobulinas, sobre todo en la cadena pesada. Esto se produce mediante la desaminación de una citosina por un uracilo lo que activa la enzima uracil ADN glicosidasa y la APE endonucleasa. MiR-155 controla la expresión del gen AID, cuya transcripción genera la proteína AIDCA<sup>254</sup>, que se encarga de poner en marcha la hipermutación somática. La proteína AID no sólo genera mutaciones en oncogenes, sino que también origina traslocaciones<sup>255</sup>. El grupo de Teng<sup>254</sup> demostró que en ratones con niveles de miR-155 altos (con el uso de LPS e IL-4) expresaban menos proteína AICDA, al impedir la transcripción del ARNm del gen AID. Si aumenta el producto del gen AID (AICDA), se produce una sobrerregulación de la recombinación de clases de inmunoglobulinas, con una mayor tasa de mutaciones. En otro estudio llevado a cabo por Ramiro y colaboradores<sup>256</sup> se demostró también en ratones, que aquellos con supresión de miR-155, presentaban de 3 a 6 veces más traslocaciones en Myc-IgH que los ratones normales, lo que apoya la idea de que miR-155 es un represor del gen AID. Por tanto, miR-155 actúa como supresor de traslocaciones en Myc-IgH. Dicha traslocación se ha descrito en linfomas tipo Burkitt<sup>257</sup>, y el grupo de Hallerman y colaboradores<sup>92</sup> hallaron alteraciones génicas en los loci de ambos genes en el grupo de LCGP, pero hasta el momento no se han hallado alteraciones en el grupo de LCCB indolentes. Al igual que ocurre en este tipo de linfomas, se podría hipotetizar que traslocaciones en Myc-IgH podría ser uno de los mecanismos implicados en la etiopatogenia de los linfomas cutáneos de células B tipo zona marginal (que es el grupo donde la pérdida de expresión de miR-155 se correlaciona estadísticamente con el pronóstico). Como hemos visto en la introducción Dijkman y colaboradores<sup>105</sup> demostraron una expresión aberrante de la proteína AID en el grupo de LCGP (80%) respecto a los LCF (10%). Actualmente no existen datos en la literatura sobre expresión de la proteína AID en LZM.

El gen AID está localizado en el locus 12p13. En los estudios de CGH del grupo de Dijkman y colaboradores encontraron ampliaciones en el genoma en dicho locus en LCF (7/37)<sup>104</sup>, además de en el grupo de LCGP, como confirmó el grupo de Mao y colaboradores, aunque estos últimos no hallaron dicha alteración en LCF<sup>97</sup>. La ampliación en dicho gen puede llevar al aumento de la proteína AICDA, lo que lleve a mayor tasa de mutaciones. A pesar de ello, sólo se ha encontrado la ampliación en LCF, por lo que la relación del producto de ese gen y miR155 con el pronóstico de los LCCB es difícil de explicar hasta el momento, ya que en nuestro estudio hemos encontrado que la pérdida de dicho miRNA se relaciona con peor pronóstico

sólo en el grupo de LZM, grupo de linfomas donde no se ha estudiado la amplificación del gen AID. Por ello, esta vía de investigación puede ser que permita en un futuro entender mejor la etiopatogenia de los LCCB.

MiR-155 está sobreexpresado en MF<sup>229</sup>, mientras que en nuestra serie los valores de expresión no presentan diferencias estadísticamente significativas entre ninguno de los grupos de linfomas cutáneos primarios de células B. Hasta el momento, este miRNA no se ha relacionado con el pronóstico de linfomas cutáneos primario de células T, a diferencia de lo que ocurre en nuestra serie, cuya infraexpresión se correlaciona con peor pronóstico en linfomas cutáneos de células B tipo zona marginal.

La información publicada sobre el impacto de la expresión de miR-155 en el pronóstico de otros linfomas es limitada. Existe controversia entre su expresión y el pronóstico y la supervivencia en linfomas difusos de células B grandes ganglionares<sup>194,258</sup>. Parece claro que dicho miRNA se encuentra principalmente sobreexpresado en pacientes con linfoma sistémico tipo ABC de linfomas difusos de células grandes, donde está asociado con peor pronóstico<sup>258</sup>. Dichos resultados contrastan con los resultados que identifican miR-155 como un marcador de mejor pronóstico (mayor PFS) en LCCB (tipo zona marginal). La causa de dicha asociación no está clara, pero puede estar asociada al papel regulador de miR-155 en vías oncogénicas como son NFκB (IκBκ), PI3KCA, o elementos mutagénicos como AID<sup>222,257</sup>.

Como hemos visto en secciones previas, son varias las dianas que se han validado para miR-155 aparte de AID y PU.1. Los genes **JMJD1A** y **BACH1** han sido identificados como dianas de miR-155 en cáncer nasofaríngeo, además de correlacionarse con peor pronóstico en aquellos con afectación ganglionar<sup>204</sup>. JMJD1A se encontrará localizado en la región 2p11.2<sup>205</sup> del genoma, y como al contrario de cómo ocurría con MYB, en uno de los estudio sobre CGH en LCCB<sup>104</sup>, esta región sólo se encuentra amplificada en LCGP, mientras que no se han detectado aberraciones génicas en el genoma de LCCB indolente.

**PTEN** se ha descrito como diana en cáncer de pulmón, y también se correlacionó con pronóstico en carcinoma epidermoide con metástasis ganglionares<sup>206</sup>, además también tiene implicación dicha diana en linfomas NK<sup>207</sup>.

En melanoma se ha asociado con la proteína **SKI**, correlacionándose de forma inversa, siendo su papel en la proliferación de este tumor importante<sup>212</sup>. Aunque no podemos determinar si puede tener relevancia en el desarrollo de los linfomas, en este caso de los LCCB.

Otra diana de interés es **FOXO3a**, que como hemos visto participa en la supervivencia celular y la sensibilidad del tratamiento<sup>214</sup>, además abre un campo para el estudio de otras probables dianas como son los genes AKT, SGK y IKK. Aunque hasta el momento no se ha relacionado con la etiopatogenia de los linfomas.

**SOCS1** es una diana regulada por miR-155 en cáncer de mama. Además esta proteína se relaciona con la vía STAT3 que tiene un papel crucial en la tumorigénesis.<sup>217</sup> Probablemente, en un futuro, dicha

proteína será estudiada para ver su implicación en linfomas cutáneos de células B, ya que tiene relación con la vía STAT3.

MiR-155 participa en la migración celular y en la invasión de diferentes extirpes celulares, y todo ello mediante la proteína **RhoA**<sup>219</sup>. También es bien conocido el papel de miR-155 en la respuesta inmune y en la inflamación, así pues PU1 y SHIP1 han sido dianas que se han validado claramente para miR-155<sup>250,252</sup>. De igual manera los genes **BACH1** y **ZIP2** son genes que participan en la infección viral, y que han sido validadas como dianas para dicho miRNA<sup>259,260</sup>.

Otra diana relacionada con miR-155 es **MAP3K7IP2** o **TAB2**, proteína que regula TGF beta y participa en la vía de NFKB. Relacionado con cáncer de mama. Actualmente no se sabe como es la relación de TAB2 con miR155, pero los buscadores principales de dianas génicas los relacionan con un elevado índice de predicción<sup>249</sup>. Existe un trabajo en que se ha relacionado TAB2 con el virus HTLV-1<sup>261</sup>, por lo que podría ser de interés su estudio en aquellos linfomas relacionados con este virus, siendo otra vía para comprender la etiopatogenia de los linfomas en general y los cutáneos en particular.

## DIANAS MIR-155

Gen	Neoplasia	Método validación	Función
JMJD1A	C. Nasofaríngeo	R,O	Proapoptótica,diseminación ganglionar
BACH1	C Nasofaringeo	R, O	Proapoptótica,diseminación ganglionar
PTEN	Pulmón, Linfoma NK, LDCBG	R	Proapoptótica
SKI	Melanoma	W	Crecimiento celular
FOXO3a	Mama	P	Proapoptótica
SOCS1	Mama	ND	Proapoptótica
BIC	LINFOMA HODGKIN	ND	Crecimiento celular
PU.1	LDCBG	M	Producción de IgG, Oncogen y gen supresor de tumores
LMP1	Linfomas EBV+	M	Proapoptótica
SHIP	LDCBG	R, W, Q, O	Proapoptótica
MAP3K7IP2 o TAB2	Leucemias, cancer de mama	R,O	Activa TFGbeta

33

<sup>33</sup> **Tabla 11.- Dianas genéticas miR-155.** *Abreviaturas:* R: reporter gene assay; W: Western blot; R: PCR; P: Proteomica; M: Microarray O: Otras técnicas; ND: no disponible; LDCBG: linfoma difuso de células B grande.

A pesar de las diversas dianas descritas para otros tumores viscerales y procesos linfoproliferativos, hasta el momento no tenemos datos que avalen dianas genéticas de miR-150 y miR-155 en LCCB indolentes, siendo necesarios más estudios.

Aún así, como hemos mencionado anteriormente, la relación entre miR-150 y miR-155 cada vez es más evidente, la diana de miR-150, MYB regula la región promotora de miR-155 (miR-155HG). Además son varios los autores que han objetivado que MYB a su vez inhibe el factor de transcripción PU.1, diana de miR-155<sup>262,263</sup>. Los niveles de PU.1 están disminuidos en varios procesos linfoproliferativos, además la reconstitución de dichos niveles disminuye la proliferación celular y activa la muerte celular<sup>264</sup>. El grupo de Vargova y colaboradores han demostrado que en células normales la elevación de MYB no afecta a la activación de miR-155 pero en células neoplásicas de LLC, MYB se encuentra elevado y a su vez los niveles de miR-155, siendo por tanto miR-155HG una diana para MYB. Este grupo propone como mecanismo de activación de miR-155HG por parte de MYB, a través de la acetilación de la histona H3K9, ya que los niveles de miR-155 aumentan al acetilar dicha histona. De manera, que la alteración de ambas vías (miR-150 regula Myc que a su vez regula la región promotora de miR-155) puede ser uno de los mecanismos que pueda explicar la etiopatogenia de los linfomas cutáneos indolentes, aunque son necesarios estudios que avalen dicha relación en los LCCB.

MiR150 está localizado en el locus 19q13.33<sup>248</sup> y miR155 en 21q21.3<sup>249</sup> del genoma, tras revisar la literatura existente sobre CGH en LCCB, ninguno de las zonas ampliadas o perdidas descritas hasta el momento se relacionan con ambos loci<sup>97,103,104</sup>.

En resumen podemos decir que, hemos encontrado que ciertos miRNAs, en particular miR-155 y miR-150, tienen valor pronóstico en pacientes con linfomas cutáneos B primarios indolentes, tipo zona marginal. La expresión de estos miRNAs puede ser medido fácilmente usando ARN extraído de muestras de tejido en parafina. La pérdida de la expresión de dichos miRNAs está asociada con el peor pronóstico de dichos pacientes. El mecanismo por el cual se produce este peor pronóstico permanece oscuro y necesita más estudios para ser aclarado, al igual que hasta el momento no tenemos dianas genéticas que puedan implicarse en este tipo de linfomas, que nos permita entender mejor la etiopatogenia de los mismos.



## **CONCLUSIONES**

## CONCLUSIONES:

1. Los linfomas B primarios cutáneos tipo zona marginal presentan un nivel de expresión de miR-150 significativamente superior a los linfomas del centro folicular.
2. La pérdida de expresión de miR-150 y miR-155 confiere peor pronóstico a los linfomas B de la zona marginal.
3. La diferencia significativa de expresión de miR-150 entre los linfocitos tumorales de los linfomas B cutáneos primarios y las células acompañantes del tumor, demuestra que la expresión de miR-150 proviene básicamente del componente linfoide tumoral.

# ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS

**INDICE DE TABLAS Y FIGURAS:**

<b>Tabla 1.-</b> Clasificación linfomas cutáneos primarios OMS-EORTC.	pag.23
<b>Tabla 2.-</b> Correlación diferentes clasificaciones linfomas cutáneos primarios B.	pag.29
<b>Tabla 3.-</b> Estadificación TNM LCCB.	pag.38
<b>Tabla 4.-</b> Tabla resumen de tratamientos propuestos por EORTC para LCCB.	pag.40
<b>Tabla 5.-</b> Resumen de anticuerpos utilizados para tinciones inmunohistoquímicas.	pag.66
<b>Tabla 6.-</b> MicroARNs.	pag.70
<b>Tabla 7.-</b> Características clínicas.	pag.75
<b>Tabla 8.-</b> Correlación variables clínicas con pronóstico.	pag.76
<b>Tabla 9.-</b> Tratamientos y tiempos de seguimiento.	pag.77
<b>Tabla 10.-</b> Dianas genéticas miR-150.	pag.102
<b>Tabla 11.-</b> Dianas genéticas miR-155.	pag.108
<b>Figura 1.-</b> Linfoma B de la zona marginal.	pag.31
<b>Figura 2.-</b> Linfoma centro folicular.	pag.32
<b>Figura 3.-</b> Linfoma de células grandes, tipo piernas (LCGP).	pag.33
<b>Figura 4.-</b> Características clínicas de LCCB.	pag.33
<b>Figura 5.-</b> Desarrollo de células B antígeno dependiente.	pag.45
<b>Figura 6.-</b> Traslocaciones investigadas entre las regiones cromosómicas 14q32 y 18q21.	pag.48
<b>Figura 7.-</b> CGH array en cuatro casos de LCGP.	pag.51
<b>Figura 8.-</b> Representación de un caso representativo de LCGP que murió por el linfoma.	pag.52
<b>Figura 9.-</b> Procesamiento de microARN.	pag.59

<b>Figura 10.-</b> Microdisector.	pag.72
<b>Figura 11.-</b> Diferencias histológicas.	pag.74
<b>Figura 12.-</b> Expresión diferencial microARN en LCCB.	pag.78
<b>Figura 13.-</b> Microdisección.	pag.79
<b>Figura 14.-</b> Curvas Kaplan Meire de tiempo libre hasta progresión.	pag.81
<b>Figura 15.-</b> Curvas Kaplan Meire de tiempo libre hasta recidiva.	pag.82
<b>Figura 16.-</b> Riesgo relativo de progresión según expresión de miRNAs.	pag.83
<b>Figura 17.-</b> PFS según expresión de miR-150 y miR-155 en toda la serie tras dicotomizar según la mediana de expresión de ambos miRNAs.	pag.84
<b>Figura 18.-</b> PFS según expresión de miR-150 y miR-155 en el grupo histológico de LZM tras dicotomizar según la mediana de expresión de ambos miRNAs.	pag.84
<b>Figura 19.-</b> PFS según expresión de miR-150 y miR-155 en el grupo histológico de LCF tras dicotomizar según la mediana de expresión de ambos miRNAs.	pag.85
<b>Figura 20.-</b> Curva Kaplan Meire de serie global según expresión conjunta de miR-150 y miR-155.	pag.86
<b>Figura 21.-</b> Curva Kaplan Meire de grupo de linfoma de la zona marginal según expresión conjunta de miR-150 y miR-155.	pag.86
<b>Figura 22.-</b> Curva Kaplan Meire de grupo de linfoma centro folicular según expresión conjunta de miR-150 y miR-155	pag.87



## **BIBLIOGRAFÍA**

## BIBLIOGRAFÍA:

1. Swerdlow SH CE, Harris NL, Jaffe ES, Pileri SA, Stein H, Thiele J, Vardiman JW. Introduction and overview of the classification of the lymphoid neoplasms. In: Swerdlow SH CE, Harris NL, Jaffe ES, Pileri SA, Stein H, Thiele J, Vardiman JW, ed. *Who classification of tumors of haematopoietic and lymphoid tissues (ed 4th)*. Lion; 2008:158-166
2. Hellman S. MPM. Hodgkin's disease. Chapter 1. 1999;1999 ed.:Lippincott Williams and Wilkins.
3. Evans HL, Winkelmann RK, Banks PM. Differential diagnosis of malignant and benign cutaneous lymphoid infiltrates: a study of 57 cases in which malignant lymphoma had been diagnosed or suspected in the skin. *Cancer*. 1979;44:699-717.
4. Knowles DM, 2nd, Halper JP, Jakobiec FA. The immunologic characterization of 40 extranodal lymphoid infiltrates: usefulness in distinguishing between benign pseudolymphoma and malignant lymphoma. *Cancer*. 1982;49:2321-2335.
5. Burke JS. Malignant lymphomas of the skin: their differentiation from lymphoid and nonlymphoid cutaneous infiltrates that simulate lymphoma. *Semin Diagn Pathol*. 1985;2:169-182.
6. Rijlaarsdam JU, Willemze R. Cutaneous pseudolymphomas: classification and differential diagnosis. *Semin Dermatol*. 1994;13:187-196.
7. Rijlaarsdam JU, van der Putte SC, Berti E, et al. Cutaneous immunocytomas: a clinicopathologic study of 26 cases. *Histopathology*. 1993;23:117-125.
8. Pimpinelli N, Santucci M, Mori M, Vallecchi C, Giannotti B. Primary cutaneous B-cell lymphoma: a clinically homogeneous entity? *J Am Acad Dermatol*. 1997;37:1012-1016.
9. Santucci M, Pimpinelli N, Arganini L. Primary cutaneous B-cell lymphoma: a unique type of low-grade lymphoma. Clinicopathologic and immunologic study of 83 cases. *Cancer*. 1991;67:2311-2326.
10. Willemze R, Kerl H, Sterry W, et al. EORTC classification for primary cutaneous lymphomas: a proposal from the Cutaneous Lymphoma Study Group of the European Organization for Research and Treatment of Cancer. *Blood*. 1997;90:354-371.
11. Cerroni L, Signoretti S, Hofler G, et al. Primary cutaneous marginal zone B-cell lymphoma: a recently described entity of low-grade malignant cutaneous B-cell lymphoma. *Am J Surg Pathol*. 1997;21:1307-1315.
12. Harris NL, Jaffe ES, Stein H, et al. A revised European-American classification of lymphoid neoplasms: a proposal from the International Lymphoma Study Group. *Blood*. 1994;84:1361-1392.
13. Cerroni L, Volkenandt M, Rieger E, Soyer HP, Kerl H. bcl-2 protein expression and correlation with the interchromosomal 14;18 translocation in cutaneous lymphomas and pseudolymphomas. *J Invest Dermatol*. 1994;102:231-235.
14. Child FJ, Russell-Jones R, Woolford AJ, et al. Absence of the t(14;18) chromosomal translocation in primary cutaneous B-cell lymphoma. *Br J Dermatol*. 2001;144:735-744.
15. Kim BK, Surti U, Pandya AG, Swerdlow SH. Primary and secondary cutaneous diffuse large B-cell lymphomas: a multiparameter analysis of 25 cases including fluorescence in situ hybridization for t(14;18) translocation. *Am J Surg Pathol*. 2003;27:356-364.
16. Willemze R, Jaffe ES, Burg G, et al. WHO-EORTC classification for cutaneous lymphomas. *Blood*. 2005;105:3768-3785.
17. Willemze R, Beljaards RC, Meijer CJ, Rijlaarsdam JR. Classification of primary cutaneous lymphomas. Historical overview and perspectives. *Dermatology*. 1994;189 Suppl 2:8-15.
18. Senff NJ, Hoefnagel JJ, Jansen PM, et al. Reclassification of 300 primary cutaneous B-Cell lymphomas according to the new WHO-EORTC classification for cutaneous lymphomas: comparison with previous classifications and identification of prognostic markers. *J Clin Oncol*. 2007;25:1581-1587.
19. Fink-Puches R, Zenahlik P, Back B, Smolle J, Kerl H, Cerroni L. Primary cutaneous lymphomas: applicability of current classification schemes (European Organization for Research and Treatment of Cancer,

World Health Organization) based on clinicopathologic features observed in a large group of patients. *Blood*. 2002;99:800-805.

20. Servitje O, Gallardo F, Estrach T, et al. Primary cutaneous marginal zone B-cell lymphoma: a clinical, histopathological, immunophenotypic and molecular genetic study of 22 cases. *Br J Dermatol*. 2002;147:1147-1158.
21. Gronbaek K, Moller PH, Nedergaard T, et al. Primary cutaneous B-cell lymphoma: a clinical, histological, phenotypic and genotypic study of 21 cases. *Br J Dermatol*. 2000;142:913-923.
22. Bailey EM, Ferry JA, Harris NL, Mihm MC, Jr., Jacobson JO, Duncan LM. Marginal zone lymphoma (low-grade B-cell lymphoma of mucosa-associated lymphoid tissue type) of skin and subcutaneous tissue: a study of 15 patients. *Am J Surg Pathol*. 1996;20:1011-1023.
23. Streubel B, Lamprecht A, Dierlamm J, et al. T(14;18)(q32;q21) involving IGH and MALT1 is a frequent chromosomal aberration in MALT lymphoma. *Blood*. 2003;101:2335-2339.
24. Hoefnagel JJ, Vermeer MH, Jansen PM, et al. Primary cutaneous marginal zone B-cell lymphoma: clinical and therapeutic features in 50 cases. *Arch Dermatol*. 2005;141:1139-1145.
25. Li C, Inagaki H, Kuo TT, Hu S, Okabe M, Eimoto T. Primary cutaneous marginal zone B-cell lymphoma: a molecular and clinicopathologic study of 24 asian cases. *Am J Surg Pathol*. 2003;27:1061-1069.
26. Grange F, Bekkenk MW, Wechsler J, et al. Prognostic factors in primary cutaneous large B-cell lymphomas: a European multicenter study. *J Clin Oncol*. 2001;19:3602-3610.
27. Bergman R, Kurtin PJ, Gibson LE, Hull PR, Kimlinger TK, Schroeter AL. Clinicopathologic, immunophenotypic, and molecular characterization of primary cutaneous follicular B-cell lymphoma. *Arch Dermatol*. 2001;137:432-439.
28. Cerroni L, Arzberger E, Putz B, et al. Primary cutaneous follicle center cell lymphoma with follicular growth pattern. *Blood*. 2000;95:3922-3928.
29. Goodlad JR, Krajewski AS, Batstone PJ, et al. Primary cutaneous follicular lymphoma: a clinicopathologic and molecular study of 16 cases in support of a distinct entity. *Am J Surg Pathol*. 2002;26:733-741.
30. de Leval L, Harris NL, Longtine J, Ferry JA, Duncan LM. Cutaneous b-cell lymphomas of follicular and marginal zone types: use of Bcl-6, CD10, Bcl-2, and CD21 in differential diagnosis and classification. *Am J Surg Pathol*. 2001;25:732-741.
31. Hoefnagel JJ, Vermeer MH, Jansen PM, Fleuren GJ, Meijer CJ, Willemze R. Bcl-2, Bcl-6 and CD10 expression in cutaneous B-cell lymphoma: further support for a follicle centre cell origin and differential diagnostic significance. *Br J Dermatol*. 2003;149:1183-1191.
32. Hoefnagel JJ, Dijkman R, Basso K, et al. Distinct types of primary cutaneous large B-cell lymphoma identified by gene expression profiling. *Blood*. 2005;105:3671-3678.
33. Alizadeh AA, Eisen MB, Davis RE, et al. Distinct types of diffuse large B-cell lymphoma identified by gene expression profiling. *Nature*. 2000;403:503-511.
34. Geelen FA, Vermeer MH, Meijer CJ, et al. bcl-2 protein expression in primary cutaneous large B-cell lymphoma is site-related. *J Clin Oncol*. 1998;16:2080-2085.
35. Bekkenk MW, Vermeer MH, Geerts ML, et al. Treatment of multifocal primary cutaneous B-cell lymphoma: a clinical follow-up study of 29 patients. *J Clin Oncol*. 1999;17:2471-2478.
36. Rijlaarsdam JU, Toonstra J, Meijer OW, Noordijk EM, Willemze R. Treatment of primary cutaneous B-cell lymphomas of follicle center cell origin: a clinical follow-up study of 55 patients treated with radiotherapy or polychemotherapy. *J Clin Oncol*. 1996;14:549-555.
37. Goodlad JR, Krajewski AS, Batstone PJ, et al. Primary cutaneous diffuse large B-cell lymphoma: prognostic significance of clinicopathological subtypes. *Am J Surg Pathol*. 2003;27:1538-1545.
38. Berti E, Alessi E, Caputo R, Gianotti R, Delia D, Vezzoni P. Reticulohistiocytoma of the dorsum. *J Am Acad Dermatol*. 1988;19:259-272.
39. Willemze R, Meijer CJ, Sentis HJ, et al. Primary cutaneous large cell lymphomas of follicular center cell origin. A clinical follow-up study of nineteen patients. *J Am Acad Dermatol*. 1987;16:518-526.
40. Grange F, Petrella T, Beylot-Barry M, et al. Bcl-2 protein expression is the strongest independent prognostic factor of survival in primary cutaneous large B-cell lymphomas. *Blood*. 2004;103:3662-3668.

41. Paulli M, Viglio A, Vivenza D, et al. Primary cutaneous large B-cell lymphoma of the leg: histogenetic analysis of a controversial clinicopathologic entity. *Hum Pathol.* 2002;33:937-943.
42. Vermeer MH, Geelen FA, van Haselen CW, et al. Primary cutaneous large B-cell lymphomas of the legs. A distinct type of cutaneous B-cell lymphoma with an intermediate prognosis. Dutch Cutaneous Lymphoma Working Group. *Arch Dermatol.* 1996;132:1304-1308.
43. Grange F, Beylot-Barry M, Courville P, et al. Primary cutaneous diffuse large B-cell lymphoma, leg type: clinicopathologic features and prognostic analysis in 60 cases. *Arch Dermatol.* 2007;143:1144-1150.
44. Senff NJ, Noordijk EM, Kim YH, et al. European Organization for Research and Treatment of Cancer and International Society for Cutaneous Lymphoma consensus recommendations for the management of cutaneous B-cell lymphomas. *Blood.* 2008;112:1600-1609.
45. Senff NJ, Kluin-Nelemans HC, Willemze R. Results of bone marrow examination in 275 patients with histological features that suggest an indolent type of cutaneous B-cell lymphoma. *Br J Haematol.* 2008;142:52-56.
46. Quereux G, Frot AS, Brocard A, Leux C, Renaut JJ, Dreno B. Routine bone marrow biopsy in the initial evaluation of primary cutaneous B-cell lymphoma does not appear justified. *Eur J Dermatol.* 2009;19:216-220.
47. Kim YH, Willemze R, Pimpinelli N, et al. TNM classification system for primary cutaneous lymphomas other than 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;110:479-484.
48. Goodlad JR, Davidson MM, Hollowood K, et al. Primary cutaneous B-cell lymphoma and *Borrelia burgdorferi* infection in patients from the Highlands of Scotland. *Am J Surg Pathol.* 2000;24:1279-1285.
49. Senff NJ, Willemze R. The applicability and prognostic value of the new TNM classification system for primary cutaneous lymphomas other than mycosis fungoides and Sezary syndrome: results on a large cohort of primary cutaneous B-cell lymphomas and comparison with the system used by the Dutch Cutaneous Lymphoma Group. *Br J Dermatol.* 2007;157:1205-1211.
50. Wood GS, Kamath NV, Guitart J, et al. Absence of *Borrelia burgdorferi* DNA in cutaneous B-cell lymphomas from the United States. *J Cutan Pathol.* 2001;28:502-507.
51. Grange F, Hedelin G, Joly P, et al. Prognostic factors in primary cutaneous lymphomas other than mycosis fungoides and the Sezary syndrome. The French Study Group on Cutaneous Lymphomas. *Blood.* 1999;93:3637-3642.
52. Kodama K, Massone C, Chott A, Metze D, Kerl H, Cerroni L. Primary cutaneous large B-cell lymphomas: clinicopathologic features, classification, and prognostic factors in a large series of patients. *Blood.* 2005;106:2491-2497.
53. Zinzani PL, Quaglino P, Pimpinelli N, et al. Prognostic factors in primary cutaneous B-cell lymphoma: the Italian Study Group for Cutaneous Lymphomas. *J Clin Oncol.* 2006;24:1376-1382.
54. Smith BD, Smith GL, Cooper DL, Wilson LD. The cutaneous B-cell lymphoma prognostic index: a novel prognostic index derived from a population-based registry. *J Clin Oncol.* 2005;23:3390-3395.
55. Hallermann C, Niermann C, Fischer RJ, Schulze HJ. New prognostic relevant factors in primary cutaneous diffuse large B-cell lymphomas. *J Am Acad Dermatol.* 2007;56:588-597.
56. Mian M, Marcheselli L, Luminari S, et al. CLIP1: a new prognostic index for indolent cutaneous B cell lymphoma proposed by the International Extranodal Lymphoma Study Group (IELSG 11). *Ann Hematol.* 2010;90:401-408.
57. Mori M, Campolmi P, Mavilia L, Rossi R, Cappugi P, Pimpinelli N. Topical photodynamic therapy for primary cutaneous B-cell lymphoma: a pilot study. *J Am Acad Dermatol.* 2006;54:524-526.
58. Roggero E, Zucca E, Mainetti C, et al. Eradication of *Borrelia burgdorferi* infection in primary marginal zone B-cell lymphoma of the skin. *Hum Pathol.* 2000;31:263-268.
59. Hofbauer GF, Kessler B, Kempf W, Nestle FO, Burg G, Dummer R. Multilesional primary cutaneous diffuse large B-cell lymphoma responsive to antibiotic treatment. *Dermatology.* 2001;203:168-170.
60. Coors EA, Schuler G, Von Den Driesch P. Topical imiquimod as treatment for different kinds of cutaneous lymphoma. *Eur J Dermatol.* 2006;16:391-393.

61. Perry A, Vincent BJ, Parker SR. Intralesional corticosteroid therapy for primary cutaneous B-cell lymphoma. *Br J Dermatol*;163:223-225.
62. Cozzio A, Kempf W, Schmid-Meyer R, et al. Intra-lesional low-dose interferon alpha2a therapy for primary cutaneous marginal zone B-cell lymphoma. *Leuk Lymphoma*. 2006;47:865-869.
63. Kutting B, Bonsmann G, Metze D, Luger TA, Cerroni L. *Borrelia burgdorferi*-associated primary cutaneous B cell lymphoma: complete clearing of skin lesions after antibiotic pulse therapy or intralesional injection of interferon alfa-2a. *J Am Acad Dermatol*. 1997;36:311-314.
64. Penate Y, Hernandez-Machin B, Perez-Mendez LI, et al. Intralesional Rituximab in the Treatment of Indolent Primary Cutaneous B-Cell Lymphomas. An Epidemiologic Observational Multicentre Study: the Spanish Working Group on Cutaneous Lymphoma. *Br J Dermatol*.
65. Maza S, Gellrich S, Assaf C, et al. Yttrium-90 ibritumomab tiuxetan radioimmunotherapy in primary cutaneous B-cell lymphomas: first results of a prospective, monocentre study. *Leuk Lymphoma*. 2008;49:1702-1709.
66. Di Bella NJ, Khan MM, Dakhil SR, et al. Pegylated liposomal doxorubicin as single-agent treatment of low-grade non-Hodgkin's lymphoma: a phase II multicenter study. *Clin Lymphoma*. 2003;3:235-240.
67. Park SI, Press OW. Radioimmunotherapy for treatment of B-cell lymphomas and other hematologic malignancies. *Curr Opin Hematol*. 2007;14:632-638.
68. Urosevic M, Fujii K, Calmels B, et al. Type I IFN innate immune response to adenovirus-mediated IFN-gamma gene transfer contributes to the regression of cutaneous lymphomas. *J Clin Invest*. 2007;117:2834-2846.
69. Urosevic M. Drug evaluation: TG-1042, an adenovirus-mediated IFN-gamma gene delivery for the intratumoral therapy of primary cutaneous lymphomas. *Curr Opin Investig Drugs*. 2007;8:493-498.
70. Rolink AG, Schaniel C, Andersson J, Melchers F. Selection events operating at various stages in B cell development. *Curr Opin Immunol*. 2001;13:202-207.
71. Rudin CM, Thompson CB. B-cell development and maturation. *Semin Oncol*. 1998;25:435-446.
72. DeFranco AL, Blum JH, Stevens TL, et al. Structure and function of the B-cell antigen receptor. *Chem Immunol*. 1994;59:156-172.
73. Shaffer AL, Rosenwald A, Staudt LM. Lymphoid malignancies: the dark side of B-cell differentiation. *Nat Rev Immunol*. 2002;2:920-932.
74. Wilson PC, de Bouteiller O, Liu YJ, et al. Somatic hypermutation introduces insertions and deletions into immunoglobulin V genes. *J Exp Med*. 1998;187:59-70.
75. Shapiro-Shelef M, Calame K. Regulation of plasma-cell development. *Nat Rev Immunol*. 2005;5:230-242.
76. Johnson K, Shapiro-Shelef M, Tunyaplin C, Calame K. Regulatory events in early and late B-cell differentiation. *Mol Immunol*. 2005;42:749-761.
77. Matthias P, Rolink AG. Transcriptional networks in developing and mature B cells. *Nat Rev Immunol*. 2005;5:497-508.
78. Cotran RS KV, Robbins SL. Pathologic basis of disease. In: Saunders W, ed. *Pathologic basis of disease* (ed 5th); 1994:629-672.
79. Vogelstein B, Kinzler KW. Cancer genes and the pathways they control. *Nat Med*. 2004;10:789-799.
80. de Jong D. Molecular pathogenesis of follicular lymphoma: a cross talk of genetic and immunologic factors. *J Clin Oncol*. 2005;23:6358-6363.
81. de la Fouchardiere A, Gazzo S, Balme B, et al. Cytogenetic and molecular analysis of 12 cases of primary cutaneous marginal zone lymphomas. *Am J Dermatopathol*. 2006;28:287-292.
82. Streubel B, Simonitsch-Klupp I, Mullauer L, et al. Variable frequencies of MALT lymphoma-associated genetic aberrations in MALT lymphomas of different sites. *Leukemia*. 2004;18:1722-1726.
83. Brynes RK, Almaguer PD, Leathery KE, et al. Numerical cytogenetic abnormalities of chromosomes 3, 7, and 12 in marginal zone B-cell lymphomas. *Mod Pathol*. 1996;9:995-1000.
84. Dierlamm J, Rosenberg C, Stul M, et al. Characteristic pattern of chromosomal gains and losses in marginal zone B cell lymphoma detected by comparative genomic hybridization. *Leukemia*. 1997;11:747-758.

85. Ott G, Kalla J, Steinhoff A, et al. Trisomy 3 is not a common feature in malignant lymphomas of mucosa-associated lymphoid tissue type. *Am J Pathol.* 1998;153:689-694.
86. Rosebeck S, Madden L, Jin X, et al. Cleavage of NIK by the API2-MALT1 fusion oncoprotein leads to noncanonical NF-kappaB activation. *Science*;331:468-472.
87. Liu H, Ye H, Dogan A, et al. T(11;18)(q21;q21) is associated with advanced mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma that expresses nuclear BCL10. *Blood.* 2001;98:1182-1187.
88. Gallardo F, Bellosillo B, Espinet B, et al. Aberrant nuclear BCL10 expression and lack of t(11;18)(q21;q21) in primary cutaneous marginal zone B-cell lymphoma. *Hum Pathol.* 2006;37:867-873.
89. Schreuder MI, Hoefnagel JJ, Jansen PM, van Krieken JH, Willemze R, Hebeda KM. FISH analysis of MALT lymphoma-specific translocations and aneuploidy in primary cutaneous marginal zone lymphoma. *J Pathol.* 2005;205:302-310.
90. Palmedo G, Hantschke M, Rutten A, et al. Primary cutaneous marginal zone B-cell lymphoma may exhibit both the t(14;18)(q32;q21) IGH/BCL2 and the t(14;18)(q32;q21) IGH/MALT1 translocation: an indicator for clonal transformation towards higher-grade B-cell lymphoma? *Am J Dermatopathol.* 2007;29:231-236.
91. Espinet B, Gallardo F, Pujol RM, Estrach T, Servitje O, Sole F. Absence of MALT1 translocations in primary cutaneous marginal zone B-cell lymphoma. *Haematologica.* 2004;89:ELT14.
92. Hallermann C, Kaune KM, Gesk S, et al. Molecular cytogenetic analysis of chromosomal breakpoints in the IGH, MYC, BCL6, and MALT1 gene loci in primary cutaneous B-cell lymphomas. *J Invest Dermatol.* 2004;123:213-219.
93. Wongchaowart NT, Kim B, Hsi ED, Swerdlow SH, Tubbs RR, Cook JR. t(14;18)(q32;q21) involving IGH and MALT1 is uncommon in cutaneous MALT lymphomas and primary cutaneous diffuse large B-cell lymphomas. *J Cutan Pathol.* 2006;33:286-292.
94. Hallermann C, Kaune KM, Siebert R, et al. Chromosomal aberration patterns differ in subtypes of primary cutaneous B cell lymphomas. *J Invest Dermatol.* 2004;122:1495-1502.
95. Franco R, Camacho FI, Fernandez-Vazquez A, et al. IgV(H) and bcl6 somatic mutation analysis reveals the heterogeneity of cutaneous B-cell lymphoma, and indicates the presence of undisclosed local antigens. *Mod Pathol.* 2004;17:623-630.
96. Gianelli U, Cerri A, Cassani B, et al. Bcl-6 gene mutations in primary cutaneous B-cell lymphomas. *Haematologica.* 2004;89:624-626.
97. Mao X, Lillington D, Child F, Russell-Jones R, Young B, Whittaker S. Comparative genomic hybridization analysis of primary cutaneous B-cell lymphomas: identification of common genomic alterations in disease pathogenesis. *Genes Chromosomes Cancer.* 2002;35:144-155.
98. van Maldegem F, van Dijk R, Wormhoudt TA, et al. The majority of cutaneous marginal zone B-cell lymphomas expresses class-switched immunoglobulins and develops in a T-helper type 2 inflammatory environment. *Blood.* 2008;112:3355-3361.
99. van der Putte SC, de Kreek EJ, Go DM, van Unnik JA. Primary cutaneous lymphoplasmacytoid lymphoma (immunocytoma). *Am J Dermatopathol.* 1984;6:15-24.
100. Ogawa N, Ping L, Zhenjun L, Takada Y, Sugai S. Involvement of the interferon-gamma-induced T cell-attracting chemokines, interferon-gamma-inducible 10-kd protein (CXCL10) and monokine induced by interferon-gamma (CXCL9), in the salivary gland lesions of patients with Sjogren's syndrome. *Arthritis Rheum.* 2002;46:2730-2741.
101. Kraft M, Riedel S, Maaser C, et al. IFN-gamma synergizes with TNF-alpha but not with viable *H. pylori* in up-regulating CXC chemokine secretion in gastric epithelial cells. *Clin Exp Immunol.* 2001;126:474-481.
102. Qin S, Rottman JB, Myers P, et al. The chemokine receptors CXCR3 and CCR5 mark subsets of T cells associated with certain inflammatory reactions. *J Clin Invest.* 1998;101:746-754.
103. Gimenez S, Costa C, Espinet B, et al. Comparative genomic hybridization analysis of cutaneous large B-cell lymphomas. *Exp Dermatol.* 2005;14:883-890.
104. Dijkman R, Tensen CP, Jordanova ES, et al. Array-based comparative genomic hybridization analysis reveals recurrent chromosomal alterations and prognostic parameters in primary cutaneous large B-cell lymphoma. *J Clin Oncol.* 2006;24:296-305.

105. Dijkman R, Tensen CP, Buettner M, Niedobitek G, Willemze R, Vermeer MH. Primary cutaneous follicle center lymphoma and primary cutaneous large B-cell lymphoma, leg type, are both targeted by aberrant somatic hypermutation but demonstrate differential expression of AID. *Blood*. 2006;107:4926-4929.
106. Wiesner T, Streubel B, Huber D, Kerl H, Chott A, Cerroni L. Genetic aberrations in primary cutaneous large B-cell lymphoma: a fluorescence in situ hybridization study of 25 cases. *Am J Surg Pathol*. 2005;29:666-673.
107. Cook JR, Sherer M, Craig FE, Shekhter-Levin S, Swerdlow SH. T(14;18)(q32;q21) involving MALT1 and IGH genes in an extranodal diffuse large B-cell lymphoma. *Hum Pathol*. 2003;34:1212-1215.
108. Belaud-Rotureau MA, Marietta V, Vergier B, et al. Inactivation of p16INK4a/CDKN2A gene may be a diagnostic feature of large B cell lymphoma leg type among cutaneous B cell lymphomas. *Virchows Arch*. 2008;452:607-620.
109. Senff NJ, Zoutman WH, Vermeer MH, et al. Fine-mapping chromosomal loss at 9p21: correlation with prognosis in primary cutaneous diffuse large B-cell lymphoma, leg type. *J Invest Dermatol*. 2009;129:1149-1155.
110. Tyler LN, Ai L, Zuo C, Fan CY, Smoller BR. Analysis of promoter hypermethylation of death-associated protein kinase and p16 tumor suppressor genes in actinic keratoses and squamous cell carcinomas of the skin. *Mod Pathol*. 2003;16:660-664.
111. Katzenellenbogen RA, Baylin SB, Herman JG. Hypermethylation of the DAP-kinase CpG island is a common alteration in B-cell malignancies. *Blood*. 1999;93:4347-4353.
112. Takino H, Li C, Hu S, et al. Primary cutaneous marginal zone B-cell lymphoma: a molecular and clinicopathological study of cases from Asia, Germany, and the United States. *Mod Pathol*. 2008;21:1517-1526.
113. Espinet B, Garcia-Herrera A, Gallardo F, et al. FOXP1 molecular cytogenetics and protein expression analyses in primary cutaneous large B cell lymphoma, leg-type. *Histol Histopathol*;26:213-221.
114. Mao X, Orchard G. Abnormal AP-1 protein expression in primary cutaneous B-cell lymphomas. *Br J Dermatol*. 2008;159:145-151.
115. Ferreri AJ, Ernberg I, Copie-Bergman C. Infectious agents and lymphoma development: molecular and clinical aspects. *J Intern Med*. 2009;265:421-438.
116. Burgdorfer W, Barbour AG, Hayes SF, Benach JL, Grunwaldt E, Davis JP. Lyme disease-a tick-borne spirochetosis? *Science*. 1982;216:1317-1319.
117. Goos M. Acrodermatitis chronica atrophicans and malignant lymphoma. *Acta Derm Venereol*. 1971;51:457-459.
118. Garbe C, Stein H, Dienemann D, Orfanos CE. *Borrelia burgdorferi*-associated cutaneous B cell lymphoma: clinical and immunohistologic characterization of four cases. *J Am Acad Dermatol*. 1991;24:584-590.
119. Cerroni L, Zochling N, Putz B, Kerl H. Infection by *Borrelia burgdorferi* and cutaneous B-cell lymphoma. *J Cutan Pathol*. 1997;24:457-461.
120. Jelic S, Filipovic-Ljeskovic I. Positive serology for Lyme disease borrelias in primary cutaneous B-cell lymphoma: a study in 22 patients; is it a fortuitous finding? *Hematol Oncol*. 1999;17:107-116.
121. Munksgaard L, Frisch M, Melbye M, Hjalgrim H. Incidence patterns of lyme disease and cutaneous B-cell non-Hodgkin's lymphoma in the United States. *Dermatology*. 2000;201:351-352.
122. Goteri G, Ranaldi R, Simonetti O, et al. Clinicopathological features of primary cutaneous B-cell lymphomas from an academic regional hospital in central Italy: no evidence of *Borrelia burgdorferi* association. *Leuk Lymphoma*. 2007;48:2184-2188.
123. Seiler KP, Weis JJ. Immunity to Lyme disease: protection, pathology and persistence. *Curr Opin Immunol*. 1996;8:503-509.
124. Nagore E, Ledesma E, Collado C, Oliver V, Perez-Perez A, Aliaga A. Detection of Epstein-Barr virus and human herpesvirus 7 and 8 genomes in primary cutaneous T- and B-cell lymphomas. *Br J Dermatol*. 2000;143:320-323.

125. Zochling N, Putz B, Wolf P, Kerl H, Cerroni L. Human herpesvirus 8-specific DNA sequences in primary cutaneous B-cell lymphomas. *Arch Dermatol*. 1998;134:246-247.
126. Peris K, Niedermeyer H, Cerroni L, Radaskiewicz T, Chimenti S, Hofler H. Detection of Epstein-Barr virus genome in primary cutaneous T and B cell lymphomas and pseudolymphomas. *Arch Dermatol Res*. 1994;286:364-368.
127. Morand P, Buisson M, Collandre H, et al. Human herpesvirus 8 and Epstein Barr-virus in a cutaneous B-cell lymphoma and a malignant cell line established from the blood of an AIDS patient. *Leuk Lymphoma*. 1999;35:379-387.
128. Prati D, Zanella A, De Mattei C, et al. Chronic hepatitis c virus infection and primary cutaneous B-cell lymphoma. *Br J Haematol*. 1999;105:841.
129. Michaelis S, Kazakov DV, Schmid M, Dummer R, Burg G, Kempf W. Hepatitis C and G viruses in B-cell lymphomas of the skin. *J Cutan Pathol*. 2003;30:369-372.
130. Viguier M, Rivet J, Agbalika F, et al. B-cell lymphomas involving the skin associated with hepatitis C virus infection. *Int J Dermatol*. 2002;41:577-582.
131. Pavlovic MD, Kamarachev J, Adamic M. Primary cutaneous epidermotropic marginal zone B-cell lymphoma: a role for antihistamines in maintaining lymphoma cell growth? *J Eur Acad Dermatol Venereol*. 2008;22:1012-1014.
132. Breton AL, Poulalhon N, Balme B, Thomas L, Dalle S. Primary cutaneous marginal zone lymphoma as a complication of radiation therapy: Case report and review. *Dermatol Online J*;16:6.
133. Bachmeyer C, Khosrotehrani K, Moguelet P, Aractingi S. Primary cutaneous follicular B-cell lymphoma arising at the site of radiotherapy for breast cancer. *Br J Dermatol*. 2007;156:198-199.
134. Carninci P, Kasukawa T, Katayama S, et al. The transcriptional landscape of the mammalian genome. *Science*. 2005;309:1559-1563.
135. Cheng J, Kapranov P, Drenkow J, et al. Transcriptional maps of 10 human chromosomes at 5-nucleotide resolution. *Science*. 2005;308:1149-1154.
136. Paranjape T, Slack FJ, Weidhaas JB. MicroRNAs: tools for cancer diagnostics. *Gut*. 2009;58:1546-1554.
137. Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell*. 1993;75:843-854.
138. Jima DD, Zhang J, Jacobs C, et al. Deep sequencing of the small RNA transcriptome of normal and malignant human B cells identifies hundreds of novel microRNAs. *Blood*;116:e118-127.
139. Zhao Y, Srivastava D. A developmental view of microRNA function. *Trends Biochem Sci*. 2007;32:189-197.
140. O'Donnell KA, Wentzel EA, Zeller KI, Dang CV, Mendell JT. c-Myc-regulated microRNAs modulate E2F1 expression. *Nature*. 2005;435:839-843.
141. Bartel DP. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell*. 2004;116:281-297.
142. Lee Y, Kim M, Han J, et al. MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II. *EMBO J*. 2004;23:4051-4060.
143. Lee Y, Jeon K, Lee JT, Kim S, Kim VN. MicroRNA maturation: stepwise processing and subcellular localization. *EMBO J*. 2002;21:4663-4670.
144. Lee Y, Ahn C, Han J, et al. The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing. *Nature*. 2003;425:415-419.
145. Cifuentes D, Xue H, Taylor DW, et al. A novel miRNA processing pathway independent of Dicer requires Argonaute2 catalytic activity. *Science*;328:1694-1698.
146. Eulalio A, Huntzinger E, Izaurralde E. Getting to the root of miRNA-mediated gene silencing. *Cell*. 2008;132:9-14.
147. Lewis BP, Burge CB, Bartel DP. Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets. *Cell*. 2005;120:15-20.
148. Shan G, Li Y, Zhang J, et al. A small molecule enhances RNA interference and promotes microRNA processing. *Nat Biotechnol*. 2008;26:933-940.

149. Fabbri M, Croce CM, Calin GA. MicroRNAs in the ontogeny of leukemias and lymphomas. *Leuk Lymphoma*. 2009;50:160-170.
150. Cheng AM, Byrom MW, Shelton J, Ford LP. Antisense inhibition of human miRNAs and indications for an involvement of miRNA in cell growth and apoptosis. *Nucleic Acids Res*. 2005;33:1290-1297.
151. Cimmino A, Calin GA, Fabbri M, et al. miR-15 and miR-16 induce apoptosis by targeting BCL2. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005;102:13944-13949.
152. Sanchez-Beato M, Sanchez-Aguilera A, Piris MA. Cell cycle deregulation in B-cell lymphomas. *Blood*. 2003;101:1220-1235.
153. Calin GA, Dumitru CD, Shimizu M, et al. Frequent deletions and down-regulation of micro- RNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002;99:15524-15529.
154. Iorio MV, Ferracin M, Liu CG, et al. MicroRNA gene expression deregulation in human breast cancer. *Cancer Res*. 2005;65:7065-7070.
155. Takamizawa J KH, Yanagisawa K, Tomida S, Osada H, Endoh H, Harano T, Yatabe Y, Nagino M, Nimura Y, Mitsudomi T, Takahashi T. Reduced expression of the let-7 microRNAs in human lung cancers in association with shortened postoperative survival. *Cancer Res*. 2003;64:3753-3756.
156. Johnson SM, Grosshans H, Shingara J, et al. RAS is regulated by the let-7 microRNA family. *Cell*. 2005;120:635-647.
157. Lewis BP, Shih IH, Jones-Rhoades MW, Bartel DP, Burge CB. Prediction of mammalian microRNA targets. *Cell*. 2003;115:787-798.
158. Michael MZ, SM OC, van Holst Pellekaan NG, Young GP, James RJ. Reduced accumulation of specific microRNAs in colorectal neoplasia. *Mol Cancer Res*. 2003;1:882-891.
159. Ciafre SA, Galardi S, Mangiola A, et al. Extensive modulation of a set of microRNAs in primary glioblastoma. *Biochem Biophys Res Commun*. 2005;334:1351-1358.
160. Chan JA, Krichevsky AM, Kosik KS. MicroRNA-21 is an antiapoptotic factor in human glioblastoma cells. *Cancer Res*. 2005;65:6029-6033.
161. He L, Thomson JM, Hemann MT, et al. A microRNA polycistron as a potential human oncogene. *Nature*. 2005;435:828-833.
162. Kolfschoten IG, van Leeuwen B, Berns K, et al. A genetic screen identifies PITX1 as a suppressor of RAS activity and tumorigenicity. *Cell*. 2005;121:849-858.
163. Eis PS, Tam W, Sun L, et al. Accumulation of miR-155 and BIC RNA in human B cell lymphomas. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005;102:3627-3632.
164. Metzler M, Wilda M, Busch K, Viehmann S, Borkhardt A. High expression of precursor microRNA-155/BIC RNA in children with Burkitt lymphoma. *Genes Chromosomes Cancer*. 2004;39:167-169.
165. Tam W. Identification and characterization of human BIC, a gene on chromosome 21 that encodes a noncoding RNA. *Gene*. 2001;274:157-167.
166. Haasch D, Chen YW, Reilly RM, et al. T cell activation induces a noncoding RNA transcript sensitive to inhibition by immunosuppressant drugs and encoded by the proto-oncogene, BIC. *Cell Immunol*. 2002;217:78-86.
167. van den Berg A, Kroesen BJ, Kooistra K, et al. High expression of B-cell receptor inducible gene BIC in all subtypes of Hodgkin lymphoma. *Genes Chromosomes Cancer*. 2003;37:20-28.
168. Lanza G, Ferracin M, Gafa R, et al. mRNA/microRNA gene expression profile in microsatellite unstable colorectal cancer. *Mol Cancer*. 2007;6:54.
169. Schepeler T, Reinert JT, Ostefeld MS, et al. Diagnostic and prognostic microRNAs in stage II colon cancer. *Cancer Res*. 2008;68:6416-6424.
170. Lawrie CH, Gal S, Dunlop HM, et al. Detection of elevated levels of tumour-associated microRNAs in serum of patients with diffuse large B-cell lymphoma. *Br J Haematol*. 2008;141:672-675.
171. Mitchell PS, Parkin RK, Kroh EM, et al. Circulating microRNAs as stable blood-based markers for cancer detection. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008;105:10513-10518.
172. Chen X, Ba Y, Ma L, et al. Characterization of microRNAs in serum: a novel class of biomarkers for diagnosis of cancer and other diseases. *Cell Res*. 2008;18:997-1006.

173. Ballabio E, Mitchell T, van Kester MS, et al. MicroRNA expression in Sezary syndrome: identification, function, and diagnostic potential. *Blood*. 2010;116:1105-1113.
174. Swerdlow SH, CE HN, Jaffe ES, Pileri SA, Stein H, Thiele J, Vardiman JW. WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. IARC Press 2008.
175. Xiao C, Calado DP, Galler G, et al. MiR-150 controls B cell differentiation by targeting the transcription factor c-Myb. *Cell*. 2007;131:146-159.
176. Thai TH, Calado DP, Casola S, et al. Regulation of the germinal center response by microRNA-155. *Science*. 2007;316:604-608.
177. Tan LP, Wang M, Robertus JL, et al. miRNA profiling of B-cell subsets: specific miRNA profile for germinal center B cells with variation between centroblasts and centrocytes. *Lab Invest*. 2009;89:708-716.
178. Montes-Moreno S, Martinez N, Sanchez-Espiridion B, et al. miRNA expression in diffuse large B-cell lymphoma treated with chemoimmunotherapy. *Blood*;118:1034-1040.
179. Rinaldi A, Capello D, Scandurra M, et al. Single nucleotide polymorphism-arrays provide new insights in the pathogenesis of post-transplant diffuse large B-cell lymphoma. *Br J Haematol*. 2010;149:569-577.
180. Malumbres R, Sarosiek KA, Cubedo E, et al. Differentiation stage-specific expression of microRNAs in B lymphocytes and diffuse large B-cell lymphomas. *Blood*. 2009;113:3754-3764.
181. Liu TY, Chen SU, Kuo SH, Cheng AL, Lin CW. E2A-positive gastric MALT lymphoma has weaker plasmacytoid infiltrates and stronger expression of the memory B-cell-associated miR-223: possible correlation with stage and treatment response. *Mod Pathol*. 2010;23:1507-1517.
182. Liang TJ, Qin CY. The emerging role of microRNAs in immune cell development and differentiation. *APMIS*. 2009;117:635-643.
183. Davoren PA, McNeill RE, Lowery AJ, Kerin MJ, Miller N. Identification of suitable endogenous control genes for microRNA gene expression analysis in human breast cancer. *BMC Mol Biol*. 2008;9:76.
184. Cheson BD, Pfistner B, Juweid ME, et al. Revised response criteria for malignant lymphoma. *J Clin Oncol*. 2007;25:579-586.
185. MP KE. Nonparametric estimation from incomplete observations. *Am Stat Assoc J*. 1958:457-481.
186. Peto R, Pike MC, Armitage P, et al. Design and analysis of randomized clinical trials requiring prolonged observation of each patient. I. Introduction and design. *Br J Cancer*. 1976;34:585-612.
187. D. C. Regression models and life-tables. *J R Stat Soc*. 1972:187-220.
188. Lawrie CH, Saunders NJ, Soneji S, et al. MicroRNA expression in lymphocyte development and malignancy. *Leukemia*. 2008;22:1440-1446.
189. de Yebenes VG, Belver L, Pisano DG, et al. miR-181b negatively regulates activation-induced cytidine deaminase in B cells. *J Exp Med*. 2008;205:2199-2206.
190. Zhou B, Wang S, Mayr C, Bartel DP, Lodish HF. miR-150, a microRNA expressed in mature B and T cells, blocks early B cell development when expressed prematurely. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007;104:7080-7085.
191. Lawrie CH. MicroRNA expression in lymphoid malignancies: new hope for diagnosis and therapy? *J Cell Mol Med*. 2008;12:1432-1444.
192. Zhang J, Jima DD, Jacobs C, et al. Patterns of microRNA expression characterize stages of human B-cell differentiation. *Blood*. 2009;113:4586-4594.
193. Mirnezami AH, Pickard K, Zhang L, Primrose JN, Packham G. MicroRNAs: key players in carcinogenesis and novel therapeutic targets. *Eur J Surg Oncol*. 2009;35:339-347.
194. Roehle A, Hoefig KP, Repsilber D, et al. MicroRNA signatures characterize diffuse large B-cell lymphomas and follicular lymphomas. *Br J Haematol*. 2008;142:732-744.
195. Srivastava SK, Bhardwaj A, Singh S, et al. MicroRNA-150 directly targets MUC4 and suppresses growth and malignant behavior of pancreatic cancer cells. *Carcinogenesis*;32:1832-1839.
196. Wu Q, Jin H, Yang Z, et al. MiR-150 promotes gastric cancer proliferation by negatively regulating the pro-apoptotic gene EGR2. *Biochem Biophys Res Commun*;392:340-345.
197. Zhou L, Qi X, Potashkin JA, Abdul-Karim FW, Gorodeski GI. MicroRNAs miR-186 and miR-150 down-regulate expression of the pro-apoptotic purinergic P2X7 receptor by activation of instability sites at the 3'-

- untranslated region of the gene that decrease steady-state levels of the transcript. *J Biol Chem.* 2008;283:28274-28286.
198. Barroga CF, Pham H, Kaushansky K. Thrombopoietin regulates c-Myb expression by modulating micro RNA 150 expression. *Exp Hematol.* 2008;36:1585-1592.
199. Flamant S, Ritchie W, Guilhot J, et al. Micro-RNA response to imatinib mesylate in patients with chronic myeloid leukemia. *Haematologica*;95:1325-1333.
200. Agirre X, Jimenez-Velasco A, San Jose-Eneriz E, et al. Down-regulation of hsa-miR-10a in chronic myeloid leukemia CD34+ cells increases USF2-mediated cell growth. *Mol Cancer Res.* 2008;6:1830-1840.
201. Ghisi M, Corradin A, Basso K, et al. Modulation of microRNA expression in human T-cell development: targeting of NOTCH3 by miR-150. *Blood*;117:7053-7062.
202. Zanette DL, Rivadavia F, Molfetta GA, et al. miRNA expression profiles in chronic lymphocytic and acute lymphocytic leukemia. *Braz J Med Biol Res.* 2007;40:1435-1440.
203. Hussein K, Theophile K, Busche G, et al. Significant inverse correlation of microRNA-150/MYB and microRNA-222/p27 in myelodysplastic syndrome. *Leuk Res*;34:328-334.
204. Du ZM, Hu LF, Wang HY, et al. Upregulation of MiR-155 in nasopharyngeal carcinoma is partly driven by LMP1 and LMP2A and downregulates a negative prognostic marker JMJD1A. *PLoS One*;6:e19137.
205. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/55818>.
206. Donnem T, Eklo K, Berg T, et al. Prognostic impact of MiR-155 in non-small cell lung cancer evaluated by in situ hybridization. *J Transl Med*;9:6.
207. Yamanaka Y, Tagawa H, Takahashi N, et al. Aberrant overexpression of microRNAs activate AKT signaling via down-regulation of tumor suppressors in natural killer-cell lymphoma/leukemia. *Blood.* 2009;114:3265-3275.
208. Grignol V, Fairchild ET, Zimmerer JM, et al. miR-21 and miR-155 are associated with mitotic activity and lesion depth of borderline melanocytic lesions. *Br J Cancer*;105:1023-1029.
209. Reed JA, Bales E, Xu W, Okan NA, Bandyopadhyay D, Medrano EE. Cytoplasmic localization of the oncogenic protein Ski in human cutaneous melanomas in vivo: functional implications for transforming growth factor beta signaling. *Cancer Res.* 2001;61:8074-8078.
210. Reed JA, Lin Q, Chen D, Mian IS, Medrano EE. SKI pathways inducing progression of human melanoma. *Cancer Metastasis Rev.* 2005;24:265-272.
211. Deheuninck J, Luo K. Ski and SnoN, potent negative regulators of TGF-beta signaling. *Cell Res.* 2009;19:47-57.
212. Levati L, Pagani E, Romani S, et al. MicroRNA-155 targets the SKI gene in human melanoma cell lines. *Pigment Cell Melanoma Res*;24:538-550.
213. Segura MF, Belitskaya-Levy I, Rose AE, et al. Melanoma MicroRNA signature predicts post-recurrence survival. *Clin Cancer Res*;16:1577-1586.
214. Kong W, He L, Coppola M, et al. MicroRNA-155 regulates cell survival, growth, and chemosensitivity by targeting FOXO3a in breast cancer. *J Biol Chem*;285:17869-17879.
215. Brunet A, Park J, Tran H, Hu LS, Hemmings BA, Greenberg ME. Protein kinase SGK mediates survival signals by phosphorylating the forkhead transcription factor FKHL1 (FOXO3a). *Mol Cell Biol.* 2001;21:952-965.
216. Brunet A, Bonni A, Zigmond MJ, et al. Akt promotes cell survival by phosphorylating and inhibiting a Forkhead transcription factor. *Cell.* 1999;96:857-868.
217. Jiang S, Zhang HW, Lu MH, et al. MicroRNA-155 functions as an OncomiR in breast cancer by targeting the suppressor of cytokine signaling 1 gene. *Cancer Res*;70:3119-3127.
218. Vargova K, Curik N, Burda P, et al. MYB transcriptionally regulates the miR-155 host gene in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*;117:3816-3825.
219. Kong W, Yang H, He L, et al. MicroRNA-155 is regulated by the transforming growth factor beta/Smad pathway and contributes to epithelial cell plasticity by targeting RhoA. *Mol Cell Biol.* 2008;28:6773-6784.
220. Yin Q, Wang X, McBride J, Fewell C, Flemington E. B-cell receptor activation induces BIC/miR-155 expression through a conserved AP-1 element. *J Biol Chem.* 2008;283:2654-2662.

221. Gatto G, Rossi A, Rossi D, Kroening S, Bonatti S, Mallardo M. Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 trans-activates miR-155 transcription through the NF-kappaB pathway. *Nucleic Acids Res.* 2008;36:6608-6619.
222. Gottwein E, Mukherjee N, Sachse C, et al. A viral microRNA functions as an orthologue of cellular miR-155. *Nature.* 2007;450:1096-1099.
223. Watanabe A, Tagawa H, Yamashita J, et al. The role of microRNA-150 as a tumor suppressor in malignant lymphoma. *Leukemia*;25:1324-1334.
224. Arboleda MJ, Lyons JF, Kabbinavar FF, et al. Overexpression of AKT2/protein kinase Bbeta leads to up-regulation of beta1 integrins, increased invasion, and metastasis of human breast and ovarian cancer cells. *Cancer Res.* 2003;63:196-206.
225. Collado M, Medema RH, Garcia-Cao I, et al. Inhibition of the phosphoinositide 3-kinase pathway induces a senescence-like arrest mediated by p27Kip1. *J Biol Chem.* 2000;275:21960-21968.
226. Thompson RC, Herscovitch M, Zhao I, Ford TJ, Gilmore TD. NF-kappaB down-regulates expression of the B-lymphoma marker CD10 through a miR-155/PU.1 pathway. *J Biol Chem*;286:1675-1682.
227. Miletic AV, Anzelon-Mills AN, Mills DM, et al. Coordinate suppression of B cell lymphoma by PTEN and SHIP phosphatases. *J Exp Med*;207:2407-2420.
228. Pedersen IM, Otero D, Kao E, et al. Onco-miR-155 targets SHIP1 to promote TNFalpha-dependent growth of B cell lymphomas. *EMBO Mol Med.* 2009;1:288-295.
229. van Kester MS, Ballabio E, Benner MF, et al. miRNA expression profiling of mycosis fungoides. *Mol Oncol.* 2011.
230. van der Fits L, van Kester MS, Qin Y, et al. MicroRNA-21 expression in CD4+ T cells is regulated by STAT3 and is pathologically involved in Sezary syndrome. *J Invest Dermatol.* 2011;131:762-768.
231. Maj J, Jankowska-Konsur A, Sadakiewska-Chudy A, Noga L, Reich A. Altered microRNA expression in mycosis fungoides. *Br J Dermatol.*
232. Monticelli S, Ansel KM, Xiao C, et al. MicroRNA profiling of the murine hematopoietic system. *Genome Biol.* 2005;6:R71.
233. Lawrie CH, Shilling R, Troussard X, et al. Expression profiling of persistent polyclonal B-cell lymphocytosis suggests constitutive expression of the AP-1 transcription complex and downregulation of Fas-apoptotic and TGFbeta signalling pathways. *Leukemia.* 2009;23:581-583.
234. Landgraf P, Rusu M, Sheridan R, et al. A mammalian microRNA expression atlas based on small RNA library sequencing. *Cell.* 2007;129:1401-1414.
235. Lawrie CH, Chi J, Taylor S, et al. Expression of microRNAs in diffuse large B cell lymphoma is associated with immunophenotype, survival and transformation from follicular lymphoma. *J Cell Mol Med.* 2009;13:1248-1260.
236. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/4602>.
237. Maltzman JS, Carman JA, Monroe JG. Role of EGR1 in regulation of stimulus-dependent CD44 transcription in B lymphocytes. *Mol Cell Biol.* 1996;16:2283-2294.
238. Ren S, Zhang Y, Wang Y, et al. Targeting P2X receptor inhibits the metastasis of murine P388D1 lymphoid neoplasm cells to lymph nodes. *Cell Biol Int*;34:1205-1211.
239. Xu-Monette ZY, Medeiros LJ, Li Y, et al. Dysfunction of the TP53 tumor suppressor gene in lymphoid malignancies. *Blood.*
240. Parry EM, Alder JK, Lee SS, et al. Decreased dyskerin levels as a mechanism of telomere shortening in X-linked dyskeratosis congenita. *J Med Genet*;48:327-333.
241. Montanaro L, Calienni M, Bertoni S, et al. Novel dyskerin-mediated mechanism of p53 inactivation through defective mRNA translation. *Cancer Res*;70:4767-4777.
242. Zambon AC, Wilderman A, Ho A, Insel PA. Increased expression of the pro-apoptotic protein BIM, a mechanism for cAMP/protein kinase A (PKA)-induced apoptosis of immature T cells. *J Biol Chem*;286:33260-33267.
243. Rao E, Jiang C, Ji M, et al. The miRNA-17 approximately 92 cluster mediates chemoresistance and enhances tumor growth in mantle cell lymphoma via PI3K/AKT pathway activation. *Leukemia.*

244. Menigatti M, Cattaneo E, Sabates-Bellver J, et al. The protein tyrosine phosphatase receptor type R gene is an early and frequent target of silencing in human colorectal tumorigenesis. *Mol Cancer*. 2009;8:124.
245. Bruchova-Votavova H, Yoon D, Prchal JT. miR-451 enhances erythroid differentiation in K562 cells. *Leuk Lymphoma*;51:686-693.
246. <http://diana.cslab.ece.ntua.gr/DianaToolsNew/index.php?r=tarbase/index&mirnas=MIMAT0000451>.
247. Sarma SN, Kim YJ, Ryu JC. Differential gene expression profiles of human leukemia cell lines exposed to benzene and its metabolites. *Environ Toxicol Pharmacol*;32:285-295.
248. <http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=MIR150>.
249. <http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=MIR155&search=mir155>.
250. Vigorito E, Perks KL, Abreu-Goodger C, et al. microRNA-155 regulates the generation of immunoglobulin class-switched plasma cells. *Immunity*. 2007;27:847-859.
251. Taganov KD, Boldin MP, Chang KJ, Baltimore D. NF-kappaB-dependent induction of microRNA miR-146, an inhibitor targeted to signaling proteins of innate immune responses. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006;103:12481-12486.
252. O'Connell RM, Rao DS, Chaudhuri AA, et al. Sustained expression of microRNA-155 in hematopoietic stem cells causes a myeloproliferative disorder. *J Exp Med*. 2008;205:585-594.
253. Dorsett Y, McBride KM, Jankovic M, et al. MicroRNA-155 suppresses activation-induced cytidine deaminase-mediated Myc-IgH translocation. *Immunity*. 2008;28:630-638.
254. Teng G HP, Landgraaf P, Rice A, Tuschl T, Casellas R, Papavasiliou FN. Micro-RNA-155 is a negative regulator of activation-induced cytidine deaminase. *Immunity*. 2008;28:621-629.
255. Dorsett Y, Robbiani DF, Jankovic M, Reina-San-Martin B, Eisenreich TR, Nussenzweig MC. A role for AID in chromosome translocations between c-myc and the IgH variable region. *J Exp Med*. 2007;204:2225-2232.
256. Ramiro AR, Jankovic M, Eisenreich T, et al. AID is required for c-myc/IgH chromosome translocations in vivo. *Cell*. 2004;118:431-438.
257. Desiderio S. Along came a spider: AID escapes a microRNA web. *Immunity*. 2008;28:596-598.
258. Jung I, Aguiar RC. MicroRNA-155 expression and outcome in diffuse large B-cell lymphoma. *Br J Haematol*. 2009;144:138-140.
259. Skalsky RL, Samols MA, Plaisance KB, et al. Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus encodes an ortholog of miR-155. *J Virol*. 2007;81:12836-12845.
260. Gottwein E, Cai X, Cullen BR. Expression and function of microRNAs encoded by Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*. 2006;71:357-364.
261. Yu Q, Minoda Y, Yoshida R, et al. HTLV-1 Tax-mediated TAK1 activation involves TAB2 adapter protein. *Biochem Biophys Res Commun*. 2008;365:189-194.
262. Weigelt K, Lichtinger M, Rehli M, Langmann T. Transcriptomic profiling identifies a PU.1 regulatory network in macrophages. *Biochem Biophys Res Commun*. 2009;380:308-312.
263. Bellon T, Perrotti D, Calabretta B. Granulocytic differentiation of normal hematopoietic precursor cells induced by transcription factor PU.1 correlates with negative regulation of the c-myb promoter. *Blood*. 1997;90:1828-1839.
264. Tatetsu H, Ueno S, Hata H, et al. Down-regulation of PU.1 by methylation of distal regulatory elements and the promoter is required for myeloma cell growth. *Cancer Res*. 2007;67:5328-5336.



# ANEXO

**ANEXO 1.- FORMULARIO CLÍNICO-EPIDEMIOLÓGICO LCCB**

DATOS EPIDEMIOLÓGICOS: SEXO: V / M EDAD:

DATOS DIAGNÓSTICOS:

TIPO LINFOMA B CUTANEO PRIMARIO: zona marginal /folicular/ tipo piernas

FECHA DIAGNÓSTICO: EDAD AL DIAGNÓSTICO:

FECHA INICIO LESIONES: NÚMERO DE LESIONES AL DX:

LOCALIZACIÓN INICIAL LESIONES: cara /cuero cabelludo / cuello / tronco / mmss / mmii /otros

ESTUDIO EXTENSIÓN:

ADENOPATIAS PALPABLES: SI/NO

BIOPSIA MEDULA: SI/NO INFILTRACIÓN: SI/NO

TAC BODY: SI/NO EXTENSIÓN: SI/NO (Especificar adenopatías/esplenomegalia)

OTROS:

TRATAMIENTOS REALIZADOS

1.- FECHA TIEMPO REALIZADO:

2.- FECHA TIEMPO REALIZADO:

3.- FECHA TIEMPO REALIZADO:

RESPUESTA A TTO: SI /NO REMISIÓN COMPLETA: SI/NO FECHA: TTO CON EL Q SE CONSIGUE:

REMISIÓN PARCIAL: SI/NO FECHA: TTO CON EL Q SE CONSIGUE:

SEGUIMIENTO

AÑOS DE SEGUIMIENTO TRAS DX INICIAL:

ENFERMEDAD ESTABLE: SI / NO

RECIDIVA DURANTE EL SEGUIMIENTO: SI /NO FECHA : Nº DE LESIONES:

PROGRESIÓN DE LESIONES: SI/NO FECHA: Nº DE LESIONES:

ESTADIO MÁXIMO ALCANZADO:

TRATAMIENTO REALIZADO PARA RECIDIVA/PROGRESIÓN:

EVOLUCIÓN:

FECHA ULTIMA EVALUACIÓN CLINICA:

SITUACIÓN ACTUAL: RC: SI /NO RP: SI/NO ENFERMEDAD ESTABLE: SI/NO ÉXITUS : SI/ NO FECHA: CAUSA EXITUS:

FECHA DE FORMULARIO:

**Anexo 2. HOJA DE INFORMACIÓN AL PACIENTE PARA ESTUDIOS GENÉTICOS y PROTÉICOS.**

*Proyecto de Investigación titulado: NEOPLASIAS HEMATOLÓGICAS, TERAPIA APOYADA EN EL DIAGNÓSTICO MOLECULAR*

**Investigador principal:** *Dr M.A. Piris (CNIO). Investigador principal en el H 12 de Octubre:: Dr. Pablo L Ortiz Romero Servicio Dermatología.*

Se solicita su participación en este Proyecto de Investigación. Usted padece un proceso linfoproliferativo / mieloproliferativo (tachar lo que no proceda). Su médico ya le ha explicado en qué consiste su enfermedad. En este estudio participan servicios de dermatología, hematología y oncología de diversos hospitales de la Comunidad de Madrid y Castilla La Mancha.

Los procesos linfoproliferativos o mieloproliferativos son tumores malignos que se originan en unos tipos determinados de glóbulos blancos. Los glóbulos blancos forman parte del sistema defensivo del organismo.

Usted va a ser sometido a una intervención quirúrgica (biopsia) o se le va a tomar una muestra de sangre que resulta necesaria para su diagnóstico o seguimiento. Le pedimos permiso para recoger parte de esa muestra y poder utilizarla para estudios de investigación. De su participación en este estudio usted no obtendrá ningún beneficio directo. Sin embargo la identificación de genes, marcadores biológicos o dianas terapéuticas relacionados con los procesos linfoproliferativos podría beneficiar en un futuro a pacientes que los padecen y contribuir a un diagnóstico más precoz o al tratamiento de esta familia de tumores malignos.

Su participación en el estudio es totalmente voluntaria y si usted decide no participar recibirá todos los cuidados médicos que Ud. precise y la relación con el Equipo Médico que le atiende no va a verse afectada.

Si usted decide dar su permiso, la muestra que en condiciones normales se utilizaría solo para diagnóstico o seguimiento, se podrá utilizar para cultivar tanto las células tumorales como las células normales que forman el microambiente tumoral (células normales que rodean a las malignas y les dan soporte y alimento entre otras cosas). Además de cultivarlas, estas células se utilizarán para extraer ADN, ARN y proteínas y para realizar implantes en animales de experimentación. El ADN es un elemento que está presente en todas sus células porque lo ha recibido de sus padres y lleva un código en forma de "genes" que determina sus características físicas personales como el color de ojos, de piel, etc. El ARN es un intermediario que sirve para traducir la información contenida en el ADN y fabricar proteínas. Las diferencias entre unas personas y otras nos pueden ayudar a

explicar por qué algunas personas desarrollan unas enfermedades y otras no. La implantación de muestras en animales de experimentación se hace para reproducir la enfermedad humana en animales y poder probar nuevos tratamientos en fase de experimentación.

Se le pedirá su consentimiento para que con sus muestras biológicas (biopsia y/o sangre) se cultiven células normales y tumorales para, con ellas:

1.- Estudiar el ADN, ARN y proteínas que puedan ser útiles para un diagnóstico precoz o tratamiento de los procesos linfoma o mieloproliferativos.

2.- Cultivar células normales y tumorales e implantarlas en animales de experimentación

3.- Es probable que en un futuro se descubran nuevos marcadores relacionados con los procesos linfoma o mieloproliferativos. Por ello se le solicita que autorice al Investigador a almacenar su muestra para el estudio de otros marcadores que se puedan descubrir en el futuro. Como se eliminarán de la muestra todos los vínculos con su identidad, antes de guardarla, no será posible llegar a conocer su identidad a partir de ella. Esta muestra sólo se utilizará para estudiar genes o proteínas importantes implicados en los procesos linfoma o mieloproliferativos o para realizar nuevos implantes en animales de experimentación. No se realizarán otros estudios con ella.

Usted puede aceptar que sólo se realicen en sus muestras los estudios expresados en el punto 1 o solo el punto 2 o todos o Ud. puede decidir no aceptar ninguna

Si Usted acepta sólo los estudios descritos en el punto 1 o 2, su muestra se destruirá después de completar la extracción de material post de células.

Si Usted acepta que se guarde esa muestra para futuros estudios como se describe en el punto 3, el Investigador garantizará que guardará y utilizará la muestra hasta que ya no queden más células, ADN, ARN o proteínas. Una vez desvinculada la muestra no podrá ser destruida, pero no se podrá relacionar con usted.

Ud. debe otorgar su consentimiento informado por escrito, indicando qué parte del estudio acepta y firmando este documento, antes de extraerle la muestra de sangre, saliva o de tumor.

Si cambia de opinión después, Ud. puede pedir que se destruyan sus muestras. No obstante, si la muestra se ha enviado ya al laboratorio, no habrá posibilidad de destruirlas porque no habrá ningún modo de vincular una muestra determinada con su identidad. No será posible encontrar su muestra y por tanto no podrá ser destruida.

Como no se pueden relacionar las muestras con su identidad, aunque se trate de un estudio con datos genéticos, los datos que se obtengan del estudio no le serán comunicados ni a Usted ni a su médico. Los resultados serán analizados por grupos de investigadores o de expertos. Se le garantiza la absoluta confidencialidad de los datos genéticos obtenidos del estudio.

Toda la información relacionada con el estudio es estrictamente confidencial. Cada una de las muestras del estudio recibirá un número y nunca el equipo investigador que lleve a cabo el análisis genético conocerá su identidad. Se le ha dicho a su médico que guarde esta Hoja de Información y la Hoja de su Consentimiento otorgado con su firma en un archivo especial seguro que no forma parte de su historia clínica. Su historia clínica no contiene ninguno de sus resultados genéticos. Con objeto de controlar y garantizar la correcta realización del estudio, de acuerdo con la normativa vigente, representantes del Comité Ético de Investigación Clínica del Hospital, de las Autoridades Sanitarias Españolas y del promotor del proyecto podrán tener acceso a sus registros médicos.

Con la firma del Consentimiento Informado usted da su aprobación para que estas personas puedan acceder a sus registros médicos, cumpliendo de forma estricta la normativa vigente para la protección de sus datos personales (Ley Orgánica 15/1999, de 13 de diciembre, de Protección de Datos de Carácter Personal).

No se puede descartar que los resultados de la utilización de material biológico puedan dar lugar a la adquisición de derechos exclusivos que se basan en descubrimientos de la investigación. Usted no recibirá ninguna recompensa económica.

Los resultados del estudio podrán ser comunicados en reuniones científicas, Congresos Médicos o publicaciones científicas, pero siempre se mantendrá una estricta confidencialidad sobre la identidad de los pacientes.

Si Ud. precisa mayor información sobre este estudio puede contactar con el Investigador responsable, el Dr \_\_\_\_\_, del Servicio de \_\_\_\_\_ del Hospital \_\_\_\_\_. Tel \_\_\_\_\_.

## **Anexo 2. HOJA DE INFORMACIÓN AL PACIENTE PARA ESTUDIOS GENÉTICOS y PROTÉICOS.**

*Proyecto de Investigación titulado: NEOPLASIAS HEMATOLÓGICAS, TERAPIA APOYADA EN EL DIAGNÓSTICO MOLECULAR*

**Investigador principal:** Dr M.A. Piris (CNIO). **Investigador principal en el H 12 de Octubre:** Dr. Pablo L Ortiz Romero Servicio Dermatología; Dr Joaquin Martinez/Carlos Grande, Servicio de Hematología (táchese lo que no proceda):

1. Yo ..... declaro bajo mi responsabilidad que he leído la Hoja de Información sobre el estudio y acepto participar en el mismo.
2. Se me ha entregado una copia de la Hoja de Información al paciente. Se me han explicado las características y el objetivo del estudio y los posibles beneficios y riesgos que puedo esperar. Se me ha dado tiempo y oportunidad para realizar preguntas. Todas las preguntas fueron respondidas a mi entera satisfacción.
3. Sé que se mantendrá en secreto mi identidad y que se identificará la muestra que me han extirpado con un número codificado. Toda relación de la muestra con mi identidad se eliminará.
4. Entiendo que el objetivo del estudio es aumentar el conocimiento sobre los tumores de la sangre, linfomas y leucemias, aquí denominados neoplasias hematológicas. Los resultados del mismo no se comunicarán ni a mí ni a mi médico dado que no se podrá vincular la muestra con mi identidad.

Punto 1.- Yo DOY  No DOY  mi consentimiento voluntariamente para que se pueda realizar los estudios especificados en mis muestras de biopsia, saliva o sangre.

Punto 2.- Yo DOY  No DOY  mi consentimiento voluntariamente para que se pueda realizar los estudios relacionados con cultivos de células tumorales y normales e implantarlas en animales de experimentación.

Punto 3.- Yo DOY  No DOY  mi consentimiento voluntariamente para que se guarden mis muestras, con desvinculación de la identidad. Esto permitirá la realización de nuevas pruebas en el futuro cuando se tengan más conocimientos sobre los genes o proteínas relacionados con los procesos linfocitarios o mieloproliferativos.

Consiento en participar voluntariamente en este estudio

Fecha ..... y Firma del paciente.....

Constato que he explicado las características y el objetivo del estudio y sus riesgos y beneficios potenciales al sujeto cuyo nombre aparece escrito más arriba. El sujeto consiente en participar por medio de su firma fechada en persona.

Fecha ..... y Firma .....

(médico/ investigador). Nombre del Investigador o la persona designada de proporcionar la información

