



TESIS DOCTORAL:

LINFOMAS T PERIFÉRICOS: ESTUDIO DE MARCADORES HISTOLÓGICOS, INMUNOFENOTÍPICOS Y MOLECULARES, Y SELECCIÓN DE TERAPIA DIRIGIDA.

TARGETED THERAPIES IN PERIPHERAL T-CELL LYMPHOMA: STUDY OF HISTOLOGICAL FEATURES, IMMUNOPHENOTYPIC AND MOLECULAR.

LÍNEA DE INVESTIGACIÓN: CÁNCER: NEOPLASIAS HEMATOLÓGICAS.

Tesis presentada por Arantza Onaindia Pérez.

Director de tesis: Dr. Miguel Angel Piris Pinilla. Hospital Universitario Marqués de Valdecilla, Santander / IDIVAL.

Tutor de tesis: Dr. Miguel Angel Piris Pinilla. Hospital Universitario Marqués de Valdecilla, Santander / IDIVAL.

Escuela de Doctorado de la Universidad de Cantabria
Universidad de Cantabria.

GRUPO DE GENÓMICA DEL CÁNCER.

NEOPLASIAS HEMATOLÓGICAS: TERAPIA DIRIGIDA POR EL DIAGNÓSTICO MOLECULAR.

VISTO BUENO DIRECTOR DE LA TESIS

Confirmando que el trabajo que contiene esta tesis doctoral ha sido desarrollado por la Dra Arantza Onaindía y que cuenta con mi aprobación para su defensa ante el tribunal académico nombrado por la Universidad de Cantabria. Agradezco a la Dra. Onaindía haber aceptado el modelo de tesis doctoral basado en publicaciones con revisión por pares, lo cual nos ha permitido contar con asesoría externa que ha mejorado significativamente los artículos publicados.

Dr. Miguel Ángel Piris
Jefe de Servicio de Anatomía Patológica
Hospital Universitario Marques de Valdecilla
Director Científico IDIVAL
39008 Santander
España

A mis padres.

Arantza Onaindia Pérez

AGRADECIMIENTOS

A todos aquellos que han dispuesto las condiciones y parte de su esfuerzo para que este trabajo se pudiese desarrollar, especialmente al director de la tesis, el Dr. Miguel Ángel Piris Pinilla y todos los miembros del grupo de Genómica del Cáncer del Instituto de Investigación Marqués de Valdecilla (IDIVAL), particularmente a Nerea Martínez, Cristina Pérez, Jose Pedro Vaqué, así como a los miembros del laboratorio (Carmen Almaraz, Helena Pisonero, Rebeca Madureira y Soraya Curiel del Olmo).

A los miembros de la Unidad del Banco de Tumores del Hospital Universitario Marqués de Valdecilla HUMV/IDIVAL (Laura Cereceda, José Bernardo Revert Arce), por su apoyo en la logística de recolección de muestras y datos clínicos, así como al Banco de Tumores del CNIO, y a César Ortega por su colaboración en el trabajo de inmunohistoquímica.

A los Dres. Santiago Montes Moreno y Socorro María Rodríguez Pinilla por su apoyo y colaboración en el desarrollo de los artículos que han compuesto esta tesis. A las Dras. Ana Batlle y Sonia González de Villambrosía de la Unidad de Citogenética del Hospital Universitario Marqués de Valdecilla por su habilidad en la interpretación del FISH.

A todos los colaboradores clínicos que han completado de forma desinteresada los formularios de datos clínicos y a todos los pacientes que generosamente han cedido sus muestras.

A las agencias que han financiado los proyectos de investigación en los que se enmarcan los originales de esta tesis: Asociación Española Contra el Cáncer (AECC) y Instituto de Salud Carlos III del Ministerio Español de Economía y Competencias (MINECO and RTIC) MINECO, (SAF2013-47416-R and RD06/0020/0107-RD012/0036/0060)) to MAP (SAF2013-47416-R) ISCIII-MINECO-AES-FEDER así como al Plan Nacional I+D+I: 2012-2015-PI12/00357, 2011-2014-CP11/00018), and 2014-2017-FIS PI14/01784.

PALABRAS CLAVE

incluyen Linfoma T Angioinmunoblástico (AITL)

Linfoma Anaplásico de células grandes (ALCL)

Linfoma T-Periférico NOS (PTCL-NOS)

Terapia dirigida

Anticuerpos monoclonales; Brentuximab Vedotin

Inmunoterapia e inhibidores de los “check-points” inmunes

Marcadores moleculares de grupos de enfermedades: Translocación del locus *IRF4-DUSP22*

Mutaciones recurrentes en JAK/STAT y terapias específicas; Ruxolitinib

RESUMEN

Los linfomas T periféricos (PTCLs) constituyen un grupo heterogéneo de entidades diversas entre las que se incluyen Linfoma T Angioinmunoblástico (AITL), Linfoma Anaplásico de células grandes (ALCL), Linfoma T-Periférico NOS (PTCL-NOS), Leucemia/linfoma T del adulto (ATLL), y neoplasias derivadas de células T y NK de tipo nasal (ENKTL). Todas ellas se caracterizan por un pronóstico muy pobre y escasa respuesta a los regímenes quimioterápicos convencionales. Esto se debe en parte a la dificultad diagnóstica que presentan debido a su heterogeneidad morfológica, y desconocimiento acerca de su etiopatogenia, ya que sus bases moleculares no se encuentran aún claramente definidas. De esta manera, surge la necesidad de identificar nuevos marcadores que permitan la aplicación de una terapia más dirigida y una mejora en el pronóstico de estos pacientes. En los últimos años las nuevas tecnologías de secuenciación han identificado mutaciones recurrentes, que podrían ser objeto de terapias dirigidas en estos pacientes, ya sea mediante el empleo de anticuerpos monoclonales o drogas dirigidas contra dianas precisas.

El objetivo de esta tesis es el estudio de marcadores que permitan el diagnóstico y selección de terapia dirigida en Linfomas T Periféricos. El estudio se dividirá en tres puntos de interés y dianas terapéuticas, motivo de debate en los últimos tiempos: (1) reconocimiento de formas clínicopatológicas específicas de Linfoma Anaplásico de Células grandes cutáneo primario (cALCL) y su diagnóstico diferencial, (2) expresión de CD30 en Linfomas T Angioinmunoblásticos y Linfomas T periféricos sin otra especificación y terapia dirigida con anti-CD30, y finalmente (3) estudio de mutaciones recurrentes y potenciales dianas terapéuticas en linfomas T cutáneos (CTCLs).

El diagnóstico diferencial entre el linfoma anaplásico primario cutáneo y la afectación cutánea por parte de un linfoma anaplásico de células grandes sistémico conlleva importantes decisiones terapéuticas y es un tema de debate actualmente. El objetivo del primer trabajo es el estudio de las características histológicas, inmunofenotípicas y moleculares de una corta serie de cALCL con translocación del locus *IRF4-DUSP22*, sugerida inicialmente como específica de los casos de linfoma primario cutáneo, con objeto de identificar rasgos histopatológicos que

traduzcan la presencia del reordenamiento y selección de pacientes para la aplicación de terapias dirigidas.

El segundo trabajo pretende estudiar detalladamente la utilidad de la inmunohistoquímica en la evaluación de la expresión de CD30 en los AITL y PTCL-NOS, con el fin de establecer criterios objetivos que permitan la selección de candidatos a recibir tratamiento con anti-CD30, únicamente aprobado hasta la fecha por la FDA para el tratamiento de linfomas de Hodgkin y Linfomas Anaplásicos de células grandes refractarios.

Las nuevas alteraciones moleculares evidenciadas por los estudios de Expresión Génica (GEP) han conducido a una revisión de la clasificación de la WHO de los linfomas T, y han identificado la activación de numerosas vías de activación específicas de diferentes tipos de PTCL, y potencialmente bloqueables con fármacos ya existentes en el mercado hoy en día. El objetivo del tercer trabajo es la identificación de mutaciones recurrentes en CTCLs, rutas moleculares activadas y estudio de marcadores subrogados, así como el empleo potencial de inhibidores.

PALABRAS CLAVE

Linfomas T Periféricos (PTCLs); alteraciones moleculares; perfiles inmunofenotípicos; marcadores subrogados; mutaciones específicas; terapia dirigida.

SUMMARY

T-cell Lymphomas (PTCLs) are a very heterogeneous group of non-Hodgkin Lymphomas (NHLs), with a dismal prognosis and whose molecular basis are still poorly understood. This group includes several entities like Angioimmunoblastic T-cell Lymphoma (AITL), Peripheral T-cell Lymphoma Not Otherwise Specified (PTCL-NOS), Anaplastic Large cell lymphoma (ALCL), Adult T-cell leukemia/lymphoma (ATLL), and extranodal NK/t-cell lymphoma, nasal type. Gene expression profiling (GEP) data have recently identified several recurrent mutations, activating different pathways and potential targets for specific therapies either monoclonal antibodies or specific targeted therapy, leading to an improvement of this patients poor outcome.

The aim of this thesis is the identification of morphologic and immunophenotypic markers contributing to PTCLs diagnosis and targeted treatment. This study will include three points: differential diagnosis between systemic anaplastic large cell lymphoma with cutaneous involvement and primary cutaneous anaplastic large cell lymphoma, CD30 expression in AITL and directed treatment with anti-CD30 antibodies, and immunophenotypic markers of activated pathways and PTCLs molecular signatures.

Differential diagnosis between systemic anaplastic large cell lymphoma with cutaneous involvement and primary cutaneous anaplastic large cell lymphoma leads to very different therapeutical attitudes. The first article will focus on the distinction of different presentations of Anaplastic Large Cell lymphoma by the study of histologic, immunophenotypic and molecular features of C-ALCL showing *IRF4-DUSP22* translocation, firstly described to be specific of C-ALCL, so as to identify the histologic expression of this molecular rearrangement.

Secondly, we will study CD30 expression in AITL and Peripheral T-cell lymphomas, not otherwise specifies (PTCL-NOSs), as Brentuximab Vedotin, recently approved for refractory ALCL and Hodgkin lymphoma, could be a new therapeutic option for patients with PTCLs. The objective is to study the reliability of the immunohistochemistry on CD30 status asesment in the clinical routine, so as to establish objetive criteria for therapy selection.

Finally, recent papers have identified recurrent mutations by GEP in PTCLs, leading to a reconsideration of the present World's Health Organisation (WHO) classification. Several activated pathways have been identified in specific entities. The aim of the third study is the

identification of surrogated markers of specific mutations in cutaneous T-cell lymphomas (CTCLs), allowing their use in the clinical routine as diagnostic and therapy-selection tools.

KEY WORDS

Peripheral T-cell lymphomas (PTCLs); molecular basis and specific mutations; surrogated markers; directed therapy.

ACRÓNIMOS

| | |
|---------------------|---|
| LNH..... | Linfomas No Hodgkin |
| HL..... | Linfoma de Hodgkin |
| cHL..... | Linfoma de Hodgkin Clásico |
| PTCLs | Linfomas T Periféricos |
| PTCL-NOS | Linfomas T Periféricos sin otra especificación |
| AITL..... | Linfoma T Angioinmunoblástico |
| ALCL..... | Linfoma Anaplásico de Células Grandes |
| cALCL..... | Linfoma Anaplásico de Células Grandes primario cutáneo |
| ALCLs..... | Linfoma Anaplásico de Células Grandes sistémico |
| ALCL ALK+..... | Linfoma Anaplásico de Células Grandes sistémico, ALK-positivo |
| ALCL ALK-..... | Linfoma Anaplásico de Células Grandes sistémico, ALK-negativo |
| ATLL..... | Leucemia/Linfoma T del adulto |
| ENKTL..... | Neoplasias derivadas de células T y NK de tipo nasal |
| CTCLs..... | Linfomas T cutáneos |
| EATL de tipo I..... | Linfoma T asociado a enteropatía de tipo I |
| LPDs..... | Procesos Linfoproliferativos primarios cutáneos |
| LyP..... | Papulosis Linfomatoide |
| MF..... | Micosis Fungoides |
| t-MF..... | Micosis Fungoides transformada |
| TCR..... | Receptor de linfocitos T |
| OS..... | Supervivencia Global |
| PFS..... | Supervivencia Libre de Progresión |
| ORR..... | Tasa de Respuesta Global |
| Tfh..... | T follicular helper |
| EBV..... | Virus de Epstein-Barr |
| FDA..... | <i>Food and Drugs Administration</i> |
| CHOP..... | Ciclofosfamida, adriamicina, vincristina, prednisona |

ACVBP.....Adriamicina, ciclofosfamida, vindesina, bleomicina, prednisona
 ABVD.....Doxorubicina, bleomicina, vinblastina, dacarbazina
 AVD.....Doxorubicina, vinblastina, dacarbazina
 Hyper-CVAD.....Ciclofosfamida, vincristina, adriamicina, dexametasona
 BV.....Brentuximab Vedotin
 CTLA-4.....*Cytotoxic T-Lymphocyte associated protein*
 PD-1.....*Programmed cell death 1*
 PD-L1.....*Programmed cell death-ligand 1*
 PD-L2.....*Programmed cell death-ligand 2*
 GEP.....Estudios de expresión génica
 STAT.....*Signal transducers and activators of transcription*
 DUSP22.....*Dual specificity phosphatase 22 promoter*
 IRF4..... *Multiple mieloma oncogene/1 interferon regulatory factor 4*

| | |
|---|----|
| PALABRAS CLAVE | 11 |
| RESUMEN | 13 |
| SUMMARY | 15 |
| ACRÓNIMOS | 17 |
| ÍNDICE | 19 |
| I. INTRODUCCIÓN | 21 |
| 1. LINFOMAS T PERIFÉRICOS: CONCEPTO Y CLASIFICACIÓN | 21 |
| 2. PRONÓSTICO Y TRATAMIENTO | 23 |
| 3. PRINCIPALES SUBTIPOS DE LINFOMAS T PERIFÉRICOS | 25 |
| 3.1. LINFOMA T PERIFÉRICO SIN OTRA ESPECIFICACIÓN (PTCL-NOS) | 25 |
| 3.2. LINFOMA T ANGIOINMUNOBLÁSTICO (AITL) | 26 |
| 3.3. LINFOMA ANAPLÁSICO DE CÉLULAS GRANDES (ALCL) | 28 |
| 3.4. DESÓRDENES LINFOPROLIFERATIVOS CUTÁNEOS CD30-POSITIVOS | 31 |
| 4. PATOGENIA DE LOS LINFOMAS T PERIFÉRICOS Y DIANAS TERAPÉUTICAS | 33 |
| 4.1. PAPEL DE LA ACTIVACIÓN DEL RECEPTOR DE LINFOCITOS T (TCR) Y NUEVAS ESTRATEGIAS TERAPÉUTICAS MEDIANTE LA IDENTIFICACIÓN DE MUTACIONES RECURRENTES | 34 |
| 4.2. TERAPIA DIRIGIDA: ANTICUERPOS MONOCLONALES, INMUNOTERAPIA E INHIBIDORES DE LA VÍA JAK/STAT. | 36 |
| 4.2.1. TERAPIA DIRIGIDA CON ANTICUERPOS MONOCLONALES: CD30, DEFINICIÓN Y POTENCIAL COMO DIANA TERAPÉUTICA | 36 |
| a. CD30: DEFINICIÓN | 36 |
| b. CD30: POTENCIAL COMO DIANA TERAPÉUTICA | 37 |
| 4.2.2. INMUNOTERAPIA E INHIBIDORES DE LOS “CHECK-POINT” INMUNES | 39 |
| a. INHIBIDORES DE CTLA-4 (Cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4) | 40 |
| b. INHIBIDORES DE PD-1 (Programmed cell death-1), Y DE SUS LIGANDOS PD-L1 Y PD-L2. | 41 |
| 4.2.3. INHIBICIÓN DE LA VÍA JAK/STAT | 43 |

| | |
|---|----|
| II. HIPÓTESIS/OBJETIVO | 45 |
| III. ARTÍCULOS QUE COMPONEN EL NÚCLEO CENTRAL DE LA TESIS (Se adjunta material suplementario en CD adjunto) | 49 |
| Artículo 1: Primary cutaneous anaplastic large cell lymphomas with 6p25.3 rearrangement exhibit particular histological features | 51 |
| Artículo 2: CD30 Expression by B and T Cells: A Frequent Finding in Angioimmunoblastic T-Cell Lymphoma and Peripheral T-Cell Lymphoma-Not Otherwise Specified. | 61 |
| Artículo 3: Mutated Jak Kinases And Deregulated Stat Activity Are Potential Therapeutic Targets In Cutaneous T-Cell Lymphoma. | 69 |
| IV. RESUMEN Y DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS | 73 |
| V. CONCLUSIONES | 85 |
| VI. PERSPECTIVAS | 87 |
| VII. PROCEDIMIENTOS Y MÉTODOS | 89 |
| 1. MUESTRAS TISULARES | 89 |
| 2. LÍNEAS CELULARES | 89 |
| 3. ESTUDIO DEL REORDENAMIENTO DE 6P25.3 MEDIANTE FISH O “HIBRIDACIÓN IN SITU MEDIANTE INMUNOFLUORESCENCIA” | 90 |
| 4. TÉCNICAS BASADAS EN PROTEÍNAS | 90 |
| 5. TÉCNICAS BASADAS EN RNA | 92 |
| 6. TÉCNICAS BASADAS EN DNA | 93 |
| 7. VIABILIDAD CELULAR | 94 |
| 8. ANÁLISIS ESTADÍSTICO | 94 |
| VIII. REFERENCIAS | 95 |

I. INTRODUCCIÓN

1. LINFOMAS T PERIFÉRICOS: CONCEPTO Y CLASIFICACIÓN

Los linfomas T periféricos (PTCLs) constituyen un grupo muy heterogéneo de entidades derivadas de linfocitos post-tímicos, que presentan una gran variabilidad clínica, morfológica, inmunofenotípica, citogenética y molecular. Se han identificado varios mecanismos moleculares que llevan a la transformación de las células T, y que afectan a los procesos de diferenciación, y maduración de los linfocitos, evidenciando un alto grado de plasticidad de las células T. El estudio de estos fenómenos ha cambiado dramáticamente la concepción de los PTCLs, llevando a proponer nuevos modelos y una definición más precisa de los mismos.

Los PTCLs representan el 12-15% de los Linfomas no-Hodgkin en el mundo occidental, más prevalentes en Asia (1, 2), siendo un grupo muy heterogéneo de entidades, con hasta más de 20 subtipos diferentes, que se encuentran recogidos por la Organización Mundial de la Salud (WHO). La WHO (2) reconoce diferentes subtipos de PTCLs, entre los cuales se incluyen el Linfoma T Angioinmunoblástico (AITL), el linfoma Anaplásico de células grandes (ALCL), la leucemia-linfoma T del adulto (ATLL), y otras entidades derivadas de células NK entre las cuales se encuentra el Linfoma T-NK extraganglionar de tipo nasal (ENKTL) (tabla 1). Algunas de estas entidades se encuentran en relación con infecciones virales, o un determinado trasfondo genético. La incidencia de los PTCLs se ha incrementado en algunos países, con un total de 8000-9500 casos nuevos al año en Estados Unidos y Europa, y una estimación de 2,1 casos por 100.000 habitantes en el mundo. La distribución de los PTCLs se encuentra recogida en la figura 1. Diferentes factores de riesgo han sido identificados, incluyendo infecciones virales, factores ocupacionales, exposiciones ambientales y hábitos dietéticos (1, 3).

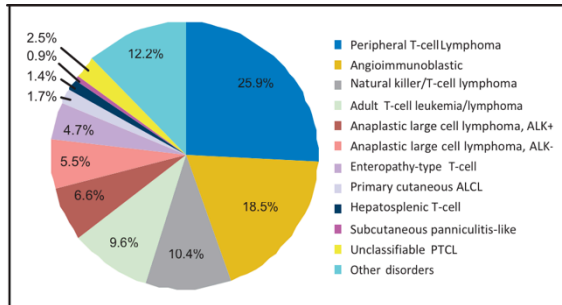


Figura 1. Distribución de los subtipos más frecuentes de PTCLs en el conjunto de 1314 casos estudiados por el grupo internacional de Linfomas T y de células NK.

Diagrama cogido de Vose et al. (2008).

Tabla 1. Clasificación de los Linfomas T Periféricos según la WHO (2008)

| MATURE T-CELL AND NK-CELL NEOPLASMS | |
|---|--------|
| T-cell prolymphocytic leukaemia | 9834/3 |
| T-cell large granular lymphocytic leukaemia | 9831/3 |
| <i>Chronic lymphoproliferative disorder of NK-cells</i> | 9831/3 |
| Aggressive NK cell leukaemia | 9948/3 |
| Systemic EBV positive T-cell lymphoproliferative disease of childhood | 9724/3 |
| Hydroa vaccineforme-like lymphoma | 9725/3 |
| Adult T-cell leukaemia/lymphoma | 9827/3 |
| Extranodal NK/T cell lymphoma, nasal type | 9719/3 |
| Enteropathy-associated T-cell lymphoma | 9717/3 |
| Hepatosplenic T-cell lymphoma | 9716/3 |
| Subcutaneous panniculitis-like T-cell lymphoma | 9708/3 |
| Mycosis fungoides | 9700/3 |
| Sézary syndrome | 9701/3 |
| Primary cutaneous CD30 positive T-cell lymphoproliferative disorders | |
| Lymphomatoid papulosis | 9718/1 |
| Primary cutaneous anaplastic large cell lymphoma | 9718/3 |
| Primary cutaneous gamma-delta T-cell lymphoma | 9726/3 |
| <i>Primary cutaneous CD8 positive aggressive epidermotropic cytotoxic T-cell lymphoma</i> | 9709/3 |
| <i>Primary cutaneous CD4 positive small/medium T-cell lymphoma</i> | 9709/3 |
| Peripheral T-cell lymphoma, NOS | 9702/3 |
| Angioimmunoblastic T-cell lymphoma | 9705/3 |
| Anaplastic large cell lymphoma, ALK positive | 9714/3 |
| <i>Anaplastic large cell lymphoma, ALK negative</i> | 9702/3 |

Las neoplasias de células T maduras y NK generalmente afectan a personas de edad media o adultos, y presentan una mayor incidencia en varones que en mujeres. La edad media en el momento del diagnóstico es de 60 años (rango 17-90 años). Los pacientes se presentan más frecuentemente en estadios avanzados (III/IV), con hepatomegalia y esplenomegalia (15-25%), y afectación extraganglionar (aproximadamente en el 40%) (4). Se han propuesto diferentes escalas para medir y predecir el comportamiento clínico de estas neoplasias, en base a datos clínicos, estadio e índices de proliferación (5).

2. PRONÓSTICO Y TRATAMIENTO

De forma general, los PTCLs son enfermedades muy agresivas con pobre respuesta a los regímenes quimioterápicos convencionales y corta supervivencia(6), con escasas excepciones. Así, la supervivencia media a los 5 años es del 20-30%), con la única excepción de los Linfomas Anaplásicos de Células Grandes ALK-positivos (ALCL ALK+), que tienen una supervivencia a los 5 años del 70% (tabla 2 y figura 2). Los pacientes con PTCLs generalmente son tratados con terapias basadas en antraciclinas, más frecuentemente CHOP (ciclofosfamida, adriamicina, vincristina y prednisona), que es el mismo régimen empleado en los linfomas agresivos de células B, y por lo tanto el tratamiento quimioterápico de los PTCLs no se encuentra dirigido. En general los pacientes no suelen responder a estos tratamientos, por lo que suelen ser incluidos en ensayos clínicos que emplean fármacos diferentes a los clásicos (tabla 2).

Desgraciadamente, actualmente hoy en día no somos capaces de comprender de momento la biología molecular de los PTCLs, por diferentes motivos: escasa frecuencia de estas entidades, la gran heterogeneidad de estos tumores y ausencia de modelos reproducibles en humanos. Estas restricciones han limitado el conocimiento de la patogénesis de los PTCLs, la identificación de marcadores moleculares para selección de terapia y el desarrollo ulterior de terapias dirigidas que permitan mejorar el pronóstico de estos pacientes.

Tabla 2. Características de los principales subtipos de PTCLs (tabla cogida de Armitage et al. 2012)

| Subtype | % of PTCLs worldwide/no America | % Reproducibility of histologic diagnosis | Median age | % Stage I/II | % Bone marrow positive | "Standard" treatment | % 5-year PFS OS | "New" Treatments |
|--------------------------|---------------------------------|---|------------|--------------|------------------------|--|-----------------|---|
| PTCL-NOS | 26/34 | 75 | 60 | 31 | 22 | Clinical trial ^a | 20 32 | Pralatrexate, romadepsin, dasatinib |
| AITL | 19/16 | 81 | 65 | 11 | 29 | Clinical trial ^a | 18 32 | Cyclosporine, bevacizumab, lenalidomide |
| ALCL | | | | | | | | |
| ALK1 | 7/16 | 97 | 34 | 35 | 12 | CHOP ± E | 60 70 | Brentuximab, crizotinib (ALK1) |
| ALK2 | 6/8 | 74 | 58 | 42 | 7 | Clinical trial ^a | 36 49 | |
| Nasal NK/T-Cell Lymphoma | 10/5 | 92 | 52 | 73 | 10 | Localized-XRT ± chemo disseminated SMILE | 29 42 | L-Asparaginase |
| Enteropathy Type | 5/6 | 79 | 61 | 31 | 3 | Intensive chemo-therapy and autotrans-plantation | 4 20 | — |
| Hepatosplenic | 1/3 | 72 | 34 | 5 | 74 | none | 0 7 | Pentostatin, alemtuzumab, cladribine |

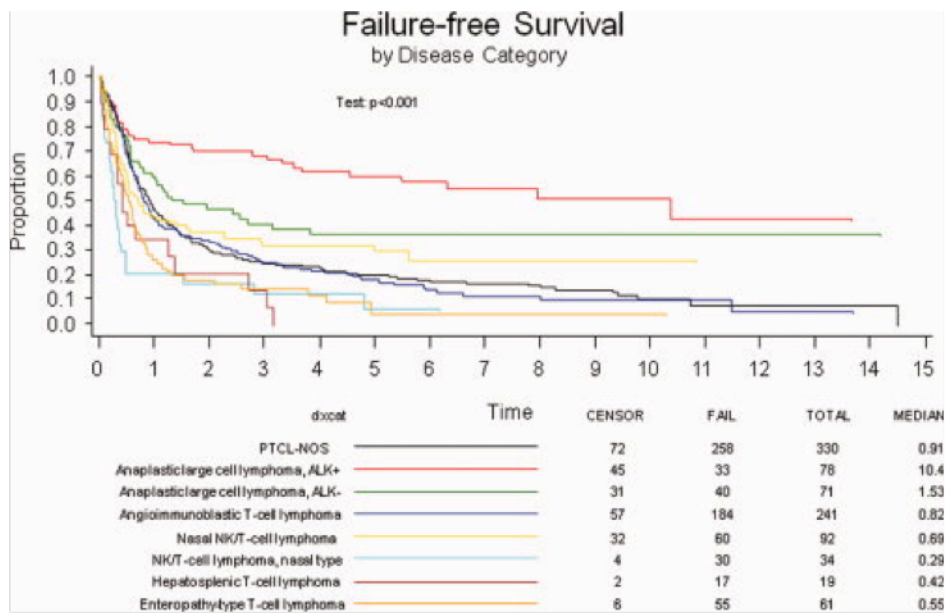


Figura 2. Supervivencia libre de fallo en pacientes con Linfomas T periféricos, en función de cada subtipo histológico. Figura tomada del Grupo internacional de Linfomas T Periféricos y Linfomas T-NK.(6) Armitage 2012

3. PRINCIPALES SUBTIPOS DE LINFOMAS T PERIFÉRICOS.

3.1 LINFOMA T PERIFÉRICO SIN OTRA ESPECIFICACIÓN (PTCL-NOS)

Los linfomas T periféricos, sin otra especificación (PTCL-NOS) constituyen el subtipo más frecuente de PTCLs, y no puede ser considerado una entidad específica en sí misma, sino un grupo de desórdenes que no pueden incluirse dentro de las otras categorías bien definidas (2). La mayoría de los casos en el momento del diagnóstico se presentan con linfadenopatía generalizada y afectación extraganglionar. En el momento del diagnóstico la mayoría de los pacientes presentan enfermedad diseminada con síntomas B, y en algunos casos se complica con síndrome hemofagocítico.

Morfológicamente se encuentra compuesto por células de pequeño y gran tamaño, con una proliferación vascular y un infiltrado compuesto por eosinófilos, células plasmáticas e histiocitos. La proliferación neoplásica puede borrar la arquitectura ganglionar o presentar un patrón de zona T (2). Se pueden observar casos con un patrón linfoepitelioide denominado “Linfoma de Lennert”. La mayoría de los casos de PTCL-NOS expresan CD4, pero pueden encontrarse casos con otros fenotipos; las lesiones de tipo linfoepitelioide suelen ser CD8+, y muchos PTCL-NOS presentan expresión aberrante de marcadores T. Existen casos con un patrón folicular o peri-folicular, y se ha demostrado en algunos de estos casos la expresión del fenotipo Tfh, por lo que estos tumores pueden ser parte del espectro del AITL. Los estudios de expresión génica han demostrado que el 20% de los PTCL-NOS pueden reclasificarse como AITL(7, 8).

La supervivencia a los 5 años libre de progresión (PFS) es del 20%, y la supervivencia global (OS) es del 32% (**tabla 2**). El Índice Pronóstico Internacional (IPI) puede predecir el comportamiento tras el tratamiento: los pacientes con baja puntuación en el IPI (0/1) presentan únicamente un 33% de PFS y 50% de OS a 5 años, mientras que los pacientes con IPI altos de 4/5 presentan una PFS y OS a los 5 años del 6 y 11% respectivamente (6).

El tratamiento más acertado para estos pacientes sigue siendo hoy en día incierto. Diferentes regímenes quimioterápicos han sido empleados: CHOP únicamente, CHOP +

etopósido, CHOP+alantuzumab, CHOP+dineleukin diftitox, CHOP+bortezomib, ACVBP (adriamicina, ciclofosfamida, vindesina, bleomicina y prednisona), hyper-CVAD (ciclofosfamida, vincristina, adriamicina y dexametasona), y una variedad de regímenes conteniendo antraciclina y gemcitabina, y ninguno de ellos parece mostrar una ventaja sustancial sobre el otro. La mayoría de los pacientes con PTCL-NOS suelen ser incluidos en ensayos clínicos, y para aquellos refractarios al tratamiento inicial, palatretxato/romidepsina, y anticuerpos monoclonales anti-CD30 como Brentuximab Vedotin han sido aprobados por la Food and Drugs Administration. Lenalidomida, dasatinib y alisertib constituyen otros tratamientos actualmente en estudio. El trasplante alogénico de células madre hematopoyéticas ha resultado curativo en algunos casos de PTCL-NOS refractarios o recurrentes (6).

El pobre pronóstico de esta entidad se debe en parte al escaso conocimiento acerca de su biología. Las células neoplásicas suelen presentar un fenotipo T helper (CD4+ CD8-) y CD5 y CD7 se encuentran generalmente infra regulados. La expresión de CD30 ha sido descrita en hasta el 30% de ellos. Presentan alteraciones citogenéticas hasta el 25-30% (pérdidas en 5q y 9p), y los estudios de Gene Expression Profiling han demostrado altos niveles de expresión en genes implicados en la proliferación como *CCNA2*, *CCNB1*, *TOP2A* y *PCNA*, en asociación con un peor pronóstico (9).

3.2 LINFOMA T ANGIOINMUNOBLÁSTICO (AITL)

El Linfoma T Angioinmunoblástico (AITL) es el segundo tipo de linfoma T más común, representando el 18,5% de todos los casos de PTCLs, con una prevalencia variable entre continentes y países, dándose la incidencia más alta en Europa (29%). Afecta predominantemente a pacientes de edad media y añosos, sin una clara predilección por un sexo en particular.

El Linfoma T Angioinmunoblástico (AITL) es el prototipo del linfoma de fenotipo T helper (Tfh). Inicialmente descrito como “linfadenopatía generalizada con disproteinemia” por Frizzera et al.(10), se incluyó en la cuarta edición del libro de la WHO como una entidad propia, dentro del grupo de los PTCLs, al ser demostrada su naturaleza clonal(2). Suele presentarse en estadio

IVB como una linfadenopatía generalizada con hepato-esplenomegalia, erupción cutánea, sintomatología sistémica e hipergamaglobulinemia. La médula ósea se encuentra frecuentemente afectada, y los pacientes suelen presentar una inmunodeficiencia secundaria al tumor, considerada la causa de la expansión de blastos B EBV positivos(2).

Histológicamente, los senos subcapsulares se encuentran parcialmente preservados, y existe una prominente proliferación de vénulas y vasos endoteliales arborescentes, con hiperplasia de células dendríticas foliculares. Las células tumorales son de tamaño pequeño e intermedio, con núcleos irregulares, nucléolos pequeños y citoplasma claro, y se encuentran entremezcladas con un número variable de células inflamatorias (eosinófilos, células plasmáticas e histiocitos). En algunos casos el diagnóstico diferencial con la variante folicular del PTCL-NOS resulta imposible; estas entidades presentan una firma molecular muy similar, lo cual explica que en la próxima clasificación de la WHO pasen a denominarse como “linfomas de fenotipo T folicular”.

Las células neoplásicas muestran un perfil de expresión T defectivo, con pérdida de CD5 y/o CD7. Suelen ser CD4+ y CD8-, aunque puede evidenciarse un subgrupo de linfocitos T CD8+ reactivos. El fenotipo Tfh se define como la co-expresión de al menos tres de los siguientes marcadores: PD-1, CD10, BCL6, SAP, ICOS, CXCL13, y CCR5(11). Existen blastos B asociados, EBV-positivos, y hasta en el 10-20% de los casos pueden dar lugar al desarrollo de un Linfoma B de células grandes EBV-positivo. Existe una expansión de la red de células dendríticas foliculares que puede ponerse de manifiesto con tinciones para CD21, CD23 o CXCL13. En el 25% de los casos, las células neoplásicas expresan CD30, lo cual puede ser objeto de tratamiento con nuevas terapias, dirigidas, que trataremos más adelante en esta tesis (12).

La PFS y OS a los 5 años son del 5 y 32% respectivamente(6), y el tratamiento más adecuado aún no se encuentra definido: los pacientes con IPI de 0/1 presentan OS a los 5 años de del 56% con regímenes de tipo CHOP, mientras que ésta desciende al 25% en aquellos con IPI de 4/5, y la PFS a los 5 años es del 34% y 16% respectivamente. Otros regímenes quimioterapéuticos como la ACVBP consiguen remisiones completas en el 46% de los pacientes con OS y PFS a los 5 años del 33 y 29% respectivamente, pero hasta el 20% de los pacientes desarrollan infecciones graves durante el tratamiento, de manera que estos pacientes suelen

ser sometidos de forma habitual al trasplante autólogo de células madre hematopoyéticas (6).

Varios grupos han empleado diferentes plataformas para estudiar el transcriptoma de los AITLs, con objeto de proporcionar nuevas herramientas diagnósticas e identificación de mecanismos que contribuyen a su patogénesis. De Leval (13) y Piccaluga (14) han demostrado que el AITL presenta una firma génica diferente de otros tipos de PTCL-NOS, y muy similar a la de las células Tfh normales. Esto puede explicar alguno de los hallazgos paradójicos de AITL, como la presencia de linfocitos B, la hiperplasia de células dendríticas foliculares, y la presencia de hipergamaglobulinemia.

Los estudios mutacionales empleando Next Generation Sequencing (NGS), han identificado un número de mutaciones recurrentes en *TET2*, *IDH2*, *DNMT3A* y *RHOA* en AITL (15-17). La más común es la mutación de *TET2*, con pérdida de función, que afecta al 70-80% de los pacientes. La segunda mutación más frecuente es la de *RHOA*, que se da en el 70% de los casos, y parece contribuir junto con las mutaciones en *TET2* al proceso linfomagenético. Le siguen las mutaciones en *DNMT3* e *IDH2*, siendo ésta última específicas de AITL (18), mientras que las demás pueden encontrarse en otros tipos de PTCL, aunque en menor frecuencia.

3.3 LINFOMA ANAPLÁSICO DE CÉLULAS GRANDES (ALCL)

El Linfoma Anaplásico de células grandes (ALCL) constituye el tercer tipo más frecuentes de PTCLs, y es la entidad más representativa entre los linfomas CD30+. Los linfomas anaplásicos de células grandes, sistémicos (ALCLs), se clasifican actualmente en el grupo de los linfomas T, y se subdividen en ALK-positivos (ALK+) y ALK-negativos (ALK-), en función de la presencia de la translocación t(2;5)(p23;q35), que afecta a *ALK* (en el cromosoma 2) y *NPM1* (en el cromosoma 5), y que conduce a la sobreexpresión de *ALK*. El ALCLs debe ser distinguido de los Linfomas T periféricos sin otra especificación (PTCL-NOS). Las formas cutáneas de ALCL (cALCL) se consideran un grupo aparte, con rasgos clínicos y biológicos diferentes .

El ALCLs representa entre el 2 y el 8% de los LNH en adultos, y el 15-30% en niños. Los ALCL ALK+ son linfomas agresivos que se dan típicamente en las primeras tres décadas de la

vida, más frecuentemente en el sexo masculino (3,9). Suelen presentarse en estadios III-IV, con sintomatología sistémica y afectación extraganglionar en el 60% de los casos (3,9). El ALCL ALK- se presenta en pacientes mayores de 60 años, en estadio avanzado, con afectación cutánea, hepática o gastrointestinal. Diversos estudios han demostrado que el ALCL ALK- presenta un curso clínico favorable de los ALCL ALK+ (3-9).

El ALCL ALK+ es la única forma de PTCL agresivo con un pronóstico relativamente bueno (PFS y OS a los 5 años del 60% y 70% respectivamente), e incluso, algunos pacientes pueden ser curados con regímenes de tipo CHOP, lo cual probablemente en parte se deba a la joven edad de presentación de estos pacientes. Sin embargo, CHOP no es una opción terapéutica óptima, ya que hasta el 40% de los ALCL ALK+ y el 60% de los ALCL ALK- no pueden ser curados mediante esta aproximación terapéutica (6). El tratamiento con ACVBP no parece mostrar diferencias con CHOP. Nuevas terapias con anti-CD30 están siendo probadas con respuestas esperanzadoras y en caso de los pacientes con ALCL ALK+, el empleo de crizotinib, inhibidor de ALK de posología oral, parece obtener remisiones completas (19).

Los estudios de expresión génica (GEP) han permitido subdividir los ALCL en diferentes subgrupos, en función de la activación de *MYC*, *IRF4*, y *mTOR*. También han demostrado que la activación de NF- κ B permite estratificar a los pacientes con ALCL en dos subgrupos con diferente pronóstico. Los pacientes con ALCL ALK- presentan una alta expresión de HIF1- α , H-ras/K-ras y de IL-10. Niveles altos de expresión se encuentran relacionados con la activación de la vía de señalización de ALK, y con una fuerte activación de STAT3, que regula la expresión de HIF1 α e IL-10.

Las dianas de ALK también se encuentran sobreexpresadas en los pacientes con ALCL ALK- (30%), lo cual sugiere que STAT3 podría tener un potencial patogénico en el ALCL. Se ha postulado que los ALCL podrían derivar de células CD4+ citotóxicas, debido a la expresión de proteínas citotóxicas como perforina, granzima y TIA1. La activación constitutiva de STAT3 parece ser la responsable de la disregulación de TCR (20), pero también de la expresión de CD30 y del fenotipo citotóxico de las células de ALCL.

El subgrupo de ALCL ALK- ha sido muy difícil de establecer, debido en parte a la ausencia

de criterios uniformes que permitan su diagnóstico, y ya que presenta muchas similitudes con otros PTCL, como el PTCL-NOS, que constituye uno de los principales diagnósticos diferenciales, sobre todo en aquellos casos con una citología monomorfa, con presencia variable de células hallmark, o en los cuales se pierden marcadores inmunohistoquímicos.

Existen algunos factores que permiten diferenciarlos: las ganancias en 1q se dan hasta en el 50% de los ALCL ALK- y son menos comunes en PTCL-NOS, y ZAP70 se encuentra hasta en el 92% de los PTCL-NOS pero es raro en los ALCL ALK- (7%)(9).

Los estudios de expresión génica han identificado tres firmas moleculares que permiten distinguir el ALCL ALK- de los PTCL-NOS (8, 21), aunque los límites entre ambas entidades son borrosos y, en la práctica clínica difíciles de aplicar, estudios moleculares han mostrado que linfomas anaplásicos ALK-negativos tienen alteraciones moleculares diversas subyacentes. Así, la traslocación que afecta al locus DUSP22, que se encuentra adyacente a IRF4, localizado en 6p25.3, junto con 7q32.3 se detectó en el 20% de los ALCLs (22). Esta traslocación conduce a una disminución de la expresión de DUSP22 y sobreexpresión de MIR29A, localizado en 7q.

En el estudio de Iqbal (8), los casos reclasificados como ALCL ALK- mostraron de forma sorprendente una pobre supervivencia en comparación con los PTCL-NOS. Recientemente ese demostró que los casos de ALCL ALK-con reordenamiento de TP63 tienen un curso más pobre(23) y presentan rasgos atípicos. Otro estudio sobre expresión de microRNA identificó un enriquecimiento en algunos subtipos de microRNA en los casos de ALCL ALK+ y ALK-, en comparación con otros subtipos de PTCL. Un estudio reciente ha demostrado que los casos de PTCL-NOS pueden clasificarse en dos subgrupos en función de la expresión de GATA3 y TBX21 (8), factores reguladores de la transcripción asociados con diferentes subtipos de células T. GATA3 se expresa en condiciones normales en células Th2, y participa en su diferenciación y proliferación, mientras que TBX1 regula la polarización de las células Th1, diferenciación y función de las células CD8+ citotóxicas (24, 25). El subgrupo con expresión de GATA3 presenta un pronóstico más pobre en comparación con el subgrupo con expresión de TBX21, en relación con la expresión de marcadores citotóxicos, (7).

3.4 DESÓRDENES LINFOPROLIFERATIVOS CUTÁNEOS CD30-POSITIVOS

En 1985, Stein documentó la expresión del antígeno Ki-1 o CD30 en una serie de Linfomas de Hodgkin (HL), y en algunas neoplasias histiocíticas derivadas de células linfoides activadas conocidas como Linfoma Anaplásico de Células Grandes o ALCL. A pesar de que la expresión de CD30 se considera un marcador de HL y ALCL, diversos procesos linfoproliferativos pueden expresarlo en superficie o en el citoplasma. Éstos incluyen los procesos linfoproliferativos primarios cutáneos (LPDs) (26), Linfoma T asociado a enteropatía de tipo I (EATL de tipo I) (27), Linfomas T/NK extraganglionares (ENTL) (28), Micosis Fungoides (MF) y Micosis Fungoides transformada (t-MF) (29), y PTCL-NOS.

Los desórdenes linfoproliferativos CD30+ de la piel incluyen el Linfoma Anaplásico de Células grandes primario cutáneo (cALCL), la Papulosis Linfomatoide (LyP), y la Micosis Fungoides transformada.

La LyP y el cALCL se definen como entidades distintas, caracterizándose la primera por una presentación clínica en forma de pápulas autolimitadas. Entre las LyP, existen múltiples subtipos histológicos: el infiltrado neoplásico se encuentra constituido por células de mediano tamaño (tipos B), a gran tamaño con elementos anaplásicos o pleomórficos (LyP A, C y E), generalmente asociados con un componente inflamatorio e histiocítico (tipo A). En el tipo D, existe un infiltrado epidermotrópico CD8+, CD30+, de tipo reticulosis pagetoide, que puede simular el linfoma cutáneo primario CD8+ (32, 33), pero que se comporta como las LyP. Sin embargo, en los casos de LyP de tipo E, las células presentan un infiltrado dérmico con un patrón angiocéntrico, asociado con vasculitis y con el depósito de fibrina en las paredes vasculares. Recientemente se describió un nuevo subtipo de LyP con reordenamiento de 6p25.3, y con un patrón histológico bifásico característico(34). Inmunofenotípicamente, las células neoplásicas expresan, CD3, CD4, CD30, HLA-DR y CD25, y pierden frecuentemente CD7. Presentan un curso clínico indolente, con regresión espontánea, y pueden afectar múltiples localizaciones.

El cALCL primario generalmente se manifiesta como un nódulo solitario y único de gran

tamaño y de rápido crecimiento, generalmente en cabeza y cuello y extremidades. Las células neoplásicas presentan un gran tamaño, son pleomórficas, con rasgos anaplásicos, uno o más nucléolos y presentan fuerte positividad para CD30 (>75%), CD25, CD71 y HLA-DR. Los marcadores T asociados suelen encontrarse parcialmente expresados, con pérdida de CD2, CD3, y CD5. La mayoría de los casos expresan también proteínas citotóxicas como TIA-1, granzima B y perforina. Los casos de LyP y cALCL deben distinguirse de los linfomas T CD4+ primarios cutáneos, que fueron recientemente incluidos como una entidad provisional en la clasificación de la WHO del 2008 (2). En general estos tumores se presentan como lesiones únicas en la cara o tronco, y no forman las placas características de la MF. Pueden presentarse en forma de infiltrados dérmicos nodulares o difusos, con extensión al subcutis. La presencia de epidermotropismo podría sugerir MF. Fenotípicamente, las células expresan marcadores de fenotipo Tfh (31). Los estudios de PCR suelen mostrar habitualmente reordenamiento de TCR, y la radioterapia y la excisión de la lesión son tratamientos curativos.

Tanto el cALCL como la LyP son procesos de naturaleza clonal en los cuales habitualmente puede identificarse además de un clon predominante, una población oligo- o policlonal de células CD30+, lo cual sugiere que las células neoplásicas proceden de la transformación de un trasfondo policlonal de linfocitos T CD30+. Este mismo fenómeno puede observarse en cALCL derivados de lesiones de tipo LyP (35). Se ha documentado una relación clonal en algunos pacientes con LyP, que se transformaron a MF (36).

Pham-Ledard (37) describió la presencia de traslocaciones que afectan al gen *IRF4* en el 26% de los cALCL, reordenamiento que también se encuentra presente en las MF. La evolución de los desórdenes linfoproliferativos CD30+, y su comportamiento clínico depende de la adquisición o de la presencia de diferentes defectos genéticos, pero también del grado de infiltración de las células Tregs. De manera similar, la transformación de las células tumorales en la MF a formas agresivas CD30+ se ha atribuido al fenotipo citotóxico de las células tumorales (38).

El reordenamiento de *IRF4* se ha demostrado en el 20-25% de los casos de cALCL y t-MF, sugiriendo que las t-MF con reordenamiento de *IRF4* supondrían un cALCL evolucionado, más que una transformación a células grandes de una MF (37). Las alteraciones genéticas ligadas a la

transformación de la MF, se han identificado tan sólo parcialmente (39). Se incluyen un espectro alteraciones genéticas (39), y un microambiente rico en Th2, asociado con un incremento del número de Foxp3+ y niveles de IL-10 (40).

En el síndrome de Sézary (SS), contraparte leucémica de la MF cutánea, las células neoplásicas pierden CCR4 (molécula de superficie responsable del epidermotropismo en las células tumorales de MF) y expresan altos niveles de CCR7 y CD27 (que en las células memoria de la piel se encuentran generalmente ausentes), y niveles variables de CCR6, CCR10 y CLA, sugiriendo un fenotipo de células T memoria. Estos datos sugieren que una célula de origen diferente en estos dos desórdenes, a pesar de la hipótesis de que las células del SS representan el estadio final leucémico de la evolución de la MF (41).

En base a la dificultad diagnóstica que presentan los diferentes subtipos de PTCLs, y la escasa respuesta a las terapias convencionales, surge la necesidad de nuevos estudios que permitan la identificación de dianas terapéuticas y tratamientos más dirigidos en PTCLs.

4. PATOGENIA DE LOS LINFOMAS T PERIFÉRICOS Y DIANAS TERAPÉUTICAS

La clasificación molecular de los linfomas T periféricos no se encuentra aún totalmente establecida, debido a la gran complejidad de estas entidades y las zonas de solapamiento y confusión entre ellas. Esto explica en parte el fracaso terapéutico en este grupo de entidades y las dificultades en su diagnóstico. Sin embargo, estudios recientes han arrojado luz acerca de estas patologías. De Leval et al (42). Inicialmente clasificó los PTCLs en función de las firmas genéticas asociadas con la expresión de CD30, mientras que otros estudios sugerían que en otro subgrupo de pacientes las células T neoplásicas dependen de la señalización vía TCR.

4.1 PAPEL DE LA ACTIVACIÓN DEL RECEPTOR DE LINFOCITOS T (TCR) Y NUEVAS ESTRATEGIAS TERAPÉUTICAS MEDIANTE LA IDENTIFICACIÓN DE MUTACIONES RECURRENTES

Las células T CD4+ se diferencian siguiendo múltiples vías que resultan de la interacción entre antígeno y receptor de linfocitos T (T-cell receptor TCR), y de los niveles de citoquinas microambientales(58), de forma que la activación de TCR mediada por antígenos, juega un papel fundamental en la transformación de los linfocitos T. Estudios en modelos animales han demostrado que las vías de señalización pre-TCR y tras la activación de TCR participan en la transformación de las células T inmaduras mediante la fusión de cinasas (59) o sobreexpresión de STAT5A/B (60).

Existe marcada evidencia de que la señalización vía TCR juega un papel patogénico fundamental en la transformación de las células T tumorales. En la Micosis Fungoides (MF), la proximidad de las células neoplásicas a las células de Langerhans presentadoras de antígenos, así como el cambio de inmunofenotipo de Th1 a Th2 en los estadios avanzados, es señal de una activación constitutiva de la señalización vía TCR en las células neoplásicas. Además, múltiples estudios demuestran que la mayoría de los linfomas T no Hodgkin presentan un transcriptoma consistente con la activación de TCR, particularmente en las entidades de bajo grado. La única excepción la constituye el ALCL, que generalmente pierde el complejo TCR y/o las cinasas próximas(61), ya que la fusión de ALK regula la expresión de las moléculas activadas por TCR a través de JAK/STAT (62, 63).

Ocurre algo similar en los PTCL-NOS que presentan la fusión ITK-SYK. SYK fosforila múltiples proteínas simulando un patrón similar al que resulta de la activación de TCR, con la activación de CD69 y la producción de IL-2 , conduciendo a la activación de las vías AKT y MAPK (64). La progresión de la enfermedad podría ser limitada con inhibidores de la actividad enzimática de SYK (64, 65).

La contribución del microambiente en el desarrollo de los desórdenes linfoproliferativos

y en el mantenimiento del fenotipo de las células neoplásicas se ha demostrado en varias neoplasias linfoides B y T. En los estadios tempranos de linfomas T cutáneos (CTCL), las células T CD4+ presentan un fenotipo Th1, y las células citotóxicas CD8+ controlan la infiltración neoplásica. En los estadios más avanzados, las células Th1 son sustituidas por células Th2, productoras de citocinas y factores angiogénicos y linfomagénicos, como VEGF-A y VEGF-C (66). Este cambio se encuentra ligado al incremento de la expresión de la tirosina cinasa linfoide B, la ciclooxigenasa 2 y la activación de STAT3 y STAT5(50). La activación de JAK/STAT lleva a la producción de IL-10 y TGFβ(40), y a un incremento del número de células Foxp3. JAK/STAT también se encuentra ligado al enrolamiento de PD-L1 en las células T neoplásicas vía PD1 en células normales.

Entre los PTCLs sistémicos, el AITL representa una entidad única con una organización peculiar del microambiente, con presencia de vénulas endoteliales altas, un infiltrado rico en células dendríticas foliculares, células B abundantes, y positividad para el virus de Epstein-Barr en diferentes grados en el infiltrado linfoide, y un número variable de linfocitos T reguladores y Th17. Las células T reguladoras pueden ser atraídas por monocitos y células derivadas de monocitos, que expresan PD-L1 (67). La sobreproducción de IL-6 por las células neoplásicas se encuentra asociada con el componente plasmocitoide y las células EBV. Éstas son capaces de producir factor de necrosis tumoral (TNF) y linfoquinas (LT), que controlan la proliferación de las células T a través de un mecanismo autocrino y paracrino (macrófago-célula T)(68).

También se ha relacionado la disregulación de la expresión de las linfoquinas con la transformación de las células T, ya que los ratones con expresión de IL2 e IL5 desarrollan desórdenes NK(69).

De esta forma, la activación de TCR juega un papel fundamental en la patogénesis de los PTCLs, induciendo la expresión de numerosos marcadores surrogados. La identificación de las mutaciones que generan la activación del TCR hace posible el desarrollo de terapia específica dirigida contra las dianas mutadas o las rutas activadas como consecuencia de las mismas.

4.2 TERAPIA DIRIGIDA: ANTICUERPOS MONOCLONALES, INMUNOTERAPIA E INHIBIDORES DE LA VÍA JAK/STAT.

En los últimos años hemos asistido al surgimiento de nuevas terapias dirigidas para el tratamiento de los linfomas usando compuestos dirigidos, anticuerpos específicos o anticuerpos conjugados con drogas, dirigidos contra antígenos de superficie.

4.2.1 TERAPIA DIRIGIDA CON ANTICUERPOS MONOCLONALES: CD30, DEFINICIÓN Y POTENCIAL COMO DIANA TERAPÉUTICA

a. CD30: DEFINICIÓN

CD30 es un miembro de la superfamilia de TNF, que en su porción intracelular posee una secuencia peptídica capaz de unir los factores TNFR-asociados (TRAF1, 2, 3 y 5), capaces de activar la vía NF κ B. En los órganos linfoides normales, puede identificarse un número variable de linfocitos CD30+ en la médula tímica entorno a los corpúsculos de Hassal, en las áreas parafoliculares y en las áreas periféricas en los centros foliculares de los ganglios linfáticos periféricos. Los linfocitos circulantes en sangre periférica, generalmente CD8+, pueden expresar niveles bajos o intermedios de CD30. CD30 también se expresa en las células B normales, macrófagos, células NK activadas, células endoteliales y células deciduales (43). In vivo, tras una infección viral se incrementa el número de células CD30+, algunas de las cuales pueden presentar rasgos sternbergoides, y aumentan los niveles de CD30 soluble circulante (44, 45). Varios investigadores han demostrado que los niveles circulantes de CD30 pueden emplearse como biomarcadores en pacientes con desórdenes linfoproliferativos T CD30-positivos (CD30+) (46-48).

Niveles altos de CD30 se obtienen mediante la activación de TCR y transducción de la señal por CD28, aún en ausencia de IL-4. CD30 se encuentra expresado constitutivamente en las células T productoras de citoquinas de tipo Th2, aunque su presencia no es exclusiva de células de tipo Th2.

CD30 se expresa en diferentes subtipos de linfomas, más notablemente en el linfoma Anaplásico de Células Grandes y en las células de Reed-Sternberg de la forma clásica del linfoma de Hodgkin (HL). En los ALCL ALK+, la vía NPM-ALK sostiene la expresión de CD30 (49), que aparece asociada con la activación de múltiples rutas de señalización y factores de transcripción, como NFκB y STAT3. La translocación de ALK regula la expresión de CD30 en ALCL. Todavía no se encuentra bien definido el mecanismo por el cual CD30 es activado en los linfomas ALCL ALK- y PTCL-NOS, no obstante, una fracción de los Linfomas Anaplásicos de Células grandes ALK-negativos (ALCLs ALK-) presentan mecanismos alternativos que llevan a la activación constitutiva de JAK/STAT, y la activación del receptor de linfoquinas puede ser en parte responsable de la expresión de CD30 en los desórdenes cutáneos linfoproliferativos (50), ENKTCL y EATL (51).

El papel de CD30 en linfomas no se encuentra bien establecido. La activación de TCR mediada por CD30 puede activar múltiples vías de señalización (c-Jun, Jun-B, p28, y NFκB) (52), algunas de las cuales requieren la dimerización de los TRAFs.

b. CD30: POTENCIAL COMO DIANA TERAPÉUTICA

CD30 se ha revelado como una importante diana para las terapia con anticuerpos conjugados. Estudios iniciales mostraron solo respuestas clínicas parciales o transitorias (54), pero el desarrollo de Brentuximab Vedotin cambió totalmente el escenario. Brentuximab Vedotin es un anticuerpo monoclonal anti-CD30 conjugado con MMAE, un agente sintético que produce la disrupción de los microtúbulos. Su empleo ha resultado efectivo en modelos preclínicos de ratones con ALCL y HL (70), y ensayos clínicos en primera y segunda línea han mostrado una impresionante mejora clínica después del tratamiento con Brentuximab Vedotin (71)(55-57).

Los resultados de un ensayo en fase 1 demostraron en una serie de 45 pacientes con neoplasias CD30-positivas (42 HL entre ellos), una actividad prometedora, con respuestas objetivas en 17 pacientes (11 remisiones completas), y efectos adversos moderados

(neuropatía periférica en el 22% de los pacientes)(72). En otro ensayo en fase 2 que incluía pacientes con HL refractario tras trasplante autólogo de médula ósea, se obtuvieron tasas de respuesta del 75%, con remisiones completas en el 34%, mantenidas hasta 20,5 meses (73).

Los resultados de este último ensayo clínico condujeron a la aprobación de Brentuximab Vedotin por parte de la FDA para el tratamiento de pacientes con Linfoma de Hodgkin refractario a los regímenes quimioterapéuticos convencionales o recidivados tras el trasplante de progenitores de células madre hematopoyéticas.

Todo ello derivó en el estudio de posibles combinaciones de brentuximab con otros fármacos usados como primera opción terapéutica en pacientes con nuevos diagnósticos (74). Los resultados obtenidos de la combinación de Brentuximab con ABVD (doxorubicina, bleomicina, vinblastina, dacarbazina) mostraron una mayor tasa de toxicidad pulmonar (44%), aunque la combinación BV con AVD (sin bleomicina), era generalmente mejor tolerada, con tasas de remisión completa del 96% en 25 pacientes. Actualmente, existe un ensayo en fase 3 en progreso comparando el empleo de Brentuximab + AVD frente a Brentuximab + ABVD como primera línea terapéutica en LH avanzados, (NCT01712490), lo cual podría suponer un cambio y redefinición de la terapia de la forma clásica del Linfoma de Hodgkin.

Un estudio pivotal en fase 2 exploró la actividad de Brentuximab Vedotin en 58 pacientes con ALCL refractario (75), con tasas de respuesta del 86% y remisiones completas del 57%, y una duración de la respuesta de más de un año(72% de los pacientes con ALCL ALK-negativo). Estos resultados llevaron a la aprobación del fármaco por parte de la FDA, para el tratamiento de ALCL sistémico refractario tras el empleo de un primer régimen multiquimioterápico. Una actualización reciente de los resultados de este estudio mostró una tasa de supervivencia a los 4 años del 64%, con un 47% de pacientes con remisiones completas, y sin evidencia de progresión en 10 de los 17 pacientes que fueron sometidos a trasplante de progenitores hematopoyéticos como terapia de consolidación.

Dadas estas impresionantes respuestas observadas en el tratamiento de la enfermedad recidivada, otro ensayo en fase 1 evaluó la seguridad y eficacia de Brentuximab en combinación con quimioterapia como primera línea de tratamiento en PTCLs CD30+, evidenciando que la combinación de Brentuximab Vedotin con CHP (omitiendo la vincristina para reducir la neurotoxicidad), presenta una actividad prometedora y un perfil de seguridad tolerable (56).

Actualmente, se encuentra en desarrollo un ensayo en fase 3, randomizado y doble ciego (ENCHELON-2), que compara el empleo de Brentuximab + CHP vs. CHOP en pacientes con nuevos diagnósticos de linfomas T CD30+ (NCT01777152).

De esta manera, Brentuximab ha demostrado una gran eficacia tanto en ALCL, HL así como otros Linfomas T periféricos. Actualmente se están desarrollando ensayos en fase 3 que comparan la eficacia de BV en combinación con quimioterapia al empleo de la quimioterapia convencional tanto en HL como ALCL. Los resultados de estos ensayos pueden cambiar dramáticamente la primera opción terapéutica en estos casos, de forma similar a como lo hizo el rituximab en los LNH de células B.

4.2.2 INMUNOTERAPIA E INHIBIDORES DE LOS “CHECK-POINT” INMUNES

El arsenal inmunosupresor del microambiente tumoral incluye diversos tipos celulares (por ejemplo, células T reguladoras o células supresoras de estirpe mieloide), moléculas solubles (TGF- β , IL-10, IL-3, SCF), moléculas supresoras (arginasa, IDO) y un conjunto de receptores/ligandos coinhibidores que se expresan en las células efectoras residentes en el tumor (CTLA-4, PD-1, Tim-3, Lag-3 y BTLA). Estos últimos se denominan comúnmente “inmuno checkpoints”.

Se han desarrollado recientemente una serie de fármacos capaces de inhibir moléculas coinhibidoras expresadas en algunos tumores sólidos, como PD-1 (*Programmed cell death-1*), PD-L1 (ligando de PD1) o CTLA-4 (*Cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4*). En condiciones fisiológicas, el sistema inmune cuenta con mecanismos moleculares y celulares que mantienen la tolerancia y evitan el daño derivado de las respuestas inmunes efectoras. En el cáncer estos mecanismos actúan de manera concertada, contrarrestando la inmunidad antitumoral y permitiendo el crecimiento del tumor. Las estrategias terapéuticas dirigidas al bloqueo de estos “inmuno checkpoints” pueden restaurar la respuesta inmune.

La utilidad de estos fármacos en tumores sólidos y linfoma de Hodgkin ya ha sido demostrada, y actualmente se están estudiando en el tratamiento de otras neoplasias hematológicas (76). Estos agentes presentan un patrón único de reacciones adversas inmunes

relacionadas, que incluyen la toxicidad gastrointestinal (diarreas y colitis), neumonías, aumento de transaminasas, erupciones cutáneas y endocrinopatías(76).

a. INHIBIDORES DE CTLA-4 (Cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4)

Las moléculas más estudiadas han sido los inhibidores de CTLA-4, una proteína expresada en la membrana de los linfocitos T que actúa como freno de activación de la célula T e inhibe la respuesta al reconocimiento de un antígeno mediante el TCR. Han sido desarrollados anticuerpos que bloquean CTL-4, resultando en una liberación de la respuesta inmune que logra una actividad antitumoral con resultados sorprendentes. Desafortunadamente, también se han visto asociados efectos secundarios en relación con daño tisular por autoinmunidad.

CTLA-4, miembro de la superfamilia de la inmunoglobulina CD28 juega un papel importante en la respuesta inmune al controlar negativamente la función de los linfocitos T reguladores, conduciendo a una disminución de la respuesta inmune antitumoral (77), y constituye el primer receptor del checkpoint inmune cuyo bloqueo se consiguió.

Ipilimumab es un anticuerpo monoclonal dirigido contra CTLA-4 que inicialmente mostró un beneficio clínico evidente en pacientes con neoplasias sólidas como el melanoma (78). Estos resultados condujeron al desarrollo de un ensayo en fase I empleando ipilimumab en pacientes con Linfomas No Hodgkin de células B recidivados o refractarios a terapias convencionales (79). Dieciocho pacientes con enfermedades recidivadas o refractarias (14 linfomas foliculares, 3 Linfomas Difusos de Células Grandes y 1 Linfoma del Manto) fueron tratados con ipilimumab obteniendo tasas de respuesta del 11%, incluyendo un paciente con Linfoma Difuso de células Grandes con respuesta completa mantenida durante 31 meses, y un paciente con linfoma folicular con una respuesta parcial mantenida hasta 19 meses tras el tratamiento. A pesar de que la tasa de respuesta no sea elevada, el hecho de que esta respuesta sea mantenida ha motivado el desarrollo de más estudios acerca de la inhibición de los “checkpoints” inmunes en las neoplasias hematológicas, y actualmente se encuentran en desarrollo un ensayo en fase 1 en pacientes con linfomas B recidivados o refractarios empleando la combinación de ipilimumab y rituximab (NCT01729806).

b. INHIBIDORES DE PD-1 (Programmed cell death-1), Y DE SUS LIGANDOS PD-L1 y PD-L2.

Otra de la vía más prometedoras es la de PD-1, que actúa en estados más tardíos de la respuesta inmune. Esta proteína es expresada en linfocitos T activados y en células NK y B activadas. Su función es limitar la actividad de las células T en tejidos durante un proceso inflamatorio y limitar la autoinmunidad. Se han descrito dos ligandos: PDL-1 y PDL-2, que se expresan en los tejidos (sanos y tumorales) como respuesta a señales inflamatorias. Las células tumorales sobreexpresan PDL-1 y PDL-2 de manera constitutiva a través de oncogenes, o inducidas por células reactivas antitumorales. De este modo se establece una retroalimentación negativa por la cual la unión de PD-1 con su ligando inhibe la respuesta inmunológica antitumoral (80). En este caso, también han sido desarrollados anticuerpos dirigidos contra el receptor PD-1 y sus ligandos PDL-1 y PDL-2, que permitirían dar vía libre a la respuesta inmunológica iniciada por el reconocimiento de células aberrantes neoplásicas. Se ha visto una fuerte relación entre el nivel de expresión de PDL-1 y la respuesta obtenida. Por otro lado, los efectos adversos autoinmunes parecen ser menos graves que los observados bloqueando CTLA-4. El tratamiento con inhibidores de dichas moléculas coinhibitorias (anti-CTLA-4, PD-1 o PDL-1) en monoterapia o combinados con otros agentes antineoplásicos, han supuesto una importante mejora del pronóstico de patologías como melanoma metastático, carcinoma renal, cáncer de próstata y, recientemente, cáncer no microcítico de pulmón, consolidándose de esta forma como tratamiento real y eficaz para una buena parte de los tumores sólidos (81). Tras demostrar la sobreexpresión de algunos de estos marcadores en enfermedades oncohematológicas como síndromes linfoproliferativos o síndromes mielodisplásicos, el tratamiento con estas moléculas está siendo evaluado, con resultados preliminares muy satisfactorios.

A este respecto, el linfoma de Hodgkin clásico (cHL) ha sido particularmente de interés, al tratarse de una diana terapéutica ideal para el tratamiento anti-PD-1 (82), ya que las células de Reed-Sternberg usan la vía PD-1 para evadir la respuesta inmune. Alteraciones en el cromosoma 9p24.1 producen la sobreexpresión de los ligandos PD-L1 y PD-L2 en las células de Reed-Sternberg, y además la amplificación de esta región cromosómica que incluye el locus de

JAK2 conduce del mismo modo a la expresión de PD-L1 a través de la vía JAK2/STAT (82). Además, la infección por el virus de Epstein-Barr (EBV) incrementa también la expresión de PD-L1 en las células EBV positivas en en Linfoma de Hodgkin (83). Estos hallazgos sugieren que el Linfoma de Hodgkin es muy dependiente de la vía PD-1 para su desarrollo, y que por lo tanto la inhibición de esta vía podría constituir una terapia efectiva.

Actualmente, existen numerosos anticuerpos anti-PD1 que están siendo estudiados en diferentes ensayo. Nivolumab es un anticuerpo monoclonal humanizado anti-PD1 con resultados esperanzadores en tumores sólidos. Un ensayo en fase 1 en pacientes con neoplasias hematológicas recidivadas incluyendo linfomas de Hodgkin clásicos, Linfomas No Hodgkin de células B y Linfomas No Hodgkin de células T y casos de mieloma múltiple ha sido realizado recientemente y los resultados de los 23 pacientes con LH han sido recientemente publicados(79). El estudio comprendía una serie de casos de LH refractarios tras 4-5 líneas previas de tratamiento sistémico, con un 78% de pacientes con recidivas tras tratamiento con Brentuximab Vedotin y post-trasplante autólogo de células madre hematopoyéticas. La tasa de respuesta fue del 87%, con respuestas completas de hasta el 17%, y un perfil de seguridad aceptable (efectos adversos de grado 3 descritos en 5 pacientes, y ausencia de eventos grado 4 ó 5). Actualmente acaba de completarse la fase de enrolamiento de un ensayo en fase II en pacientes con recidivas de HL tras ser sometidos a trasplante autólogo de células madre hematopoyéticas (NCT02181738).

Los resultados relativos al resto de neoplasias hematológicas de este ensayo en fase I también han sido recientemente publicados (84). Estos pacientes también habían sido previamente tratados con 3 o más regímenes terapéuticos diferentes. Los pacientes con Linfomas No Hodgkin B presentaron una tasa de respuesta global del 28%, con un 7% de remisiones completas (tasa de respuesta del 36 y 40% en pacientes con DLBCL y FL respectivamente). La tasa de respuesta global de los pacientes con Linfomas No Hodgkin T fue del 17% (no se obtuvieron respuestas completas). Cabe señalar que 5 pacientes con PTCLs presentaron una tasa de respuesta del 40%. Actualmente existe un ensayo clínico en fase 2, investigando la eficacia de nivolumab en Linfomas Foliculares refractarios (NCT02038946) y Linfomas B Difusos de Células grandes refractarios o recidivados. (NCT02038933).

Pembrolizumab es otro anticuerpo monoclonal humanizado anti-PD1 , cuya eficacia y seguridad están siendo actualmente estudiados en el ensayo KEYNOTE-013, en pacientes con neoplasias hematológicas recidivadas o refractarias. Los resultados en la cohorte de pacientes con HL, incluyendo pacientes previamente tratados con Brentuximab Vedotin y un 66% con recidivas post-trasplante de médula ósea, también han sido publicados recientemente (85). Quince pacientes han sido evaluados hasta la fecha, con tasas de respuesta del 53% y remisiones completas hasta e el 20%.

La eficacia y el perfil de seguridad de los inhibidores de PD-1 en el tratamiento de los pacientes con HL refractarios, está promoviendo el interés en el empleo de estos fármacos en fases tempranas de HL en combinación con otras terapias. Actualmente se están desarrollando estudios que emplean pembrolizumab como terapia de consolidación post-trasplante autólogo de células madre en DLBCL y HL (NCT02362997), en combinación con rituximab en FL recidivados (NCT02446457), y en combinación con quimioterapia en linfomas más avanzados (NCT02408042).

4.2.3 INHIBICIÓN DE LA VÍA JAK/STAT

La familia de las cinasas JAK es una familia de tirosin-cinasas intracelulares activadas tras su fosforilación, inducida por la unión de una citosina con su receptor asociado. Esto lleva al reclutamiento y fosforilación de las proteínas STAT (signal transducers and activators of transcription), que se dimerizan y traslocan al núcleo, activando la transcripción de una serie de genes diana que participan en los procesos de proliferación celular e inmunidad. La activación anormal de la vía JAK-STAT se produce en numerosos tipos de neoplasias, incluyendo linfomas, con lo cual surge el interés acerca de las diferentes formas de inhibición de la vía (73).

Pacritinib (SB1518) es una pequeña molécula, inhibidora de la cinasa JAK2, que ha demostrado actividad preclínica en linfomas, como demuestran los datos del estudio previamente mencionados. En ese ensayo en fase I acerca de la eficacia y seguridad de pacritinib en una serie de 34 pacientes con HL o NHL refractarios, se evidenciaron tasas de respuesta del 14%, con Buena tolerancia y efectos adversos grado 1 ó 2 únicamente. A pesar de

tratarse de una baja tasa de respuesta, este estudio evidenció la posibilidad de considerar la vía JAK/STAT como una potencial diana terapéutica en linfomas y plantea la necesidad de identificar biomarcadores, predictores de respuesta a esta terapia.

Por otra parte, las vías JAK-STAT y PI3K juegan un papel importante en la supervivencia de las células de Reed-Sternberg, y se encuentran disreguladas en el linfoma de Hodgkin (86). La combinación de agents inhibidores de estas rutas podría tener un efecto sinérgico. Un ensayo en fase 1 empleando una combinación de INCB040093 (inhibidor de PI3K) junto con INCB039110 (inhibidor selectivo de JAK1) en pacientes con neoplasias de células B recidivadas o refractarias, mostró un perfil de seguridad aceptable (87, 88) con tasas de respuesta del 50% y una respuesta completa en uno de los 6 pacientes que recibieron únicamente INCB040093, y tasas de respuesta del 67% y respuestas completas en 2 de los 9 pacientes que recibieron la combinación de INCB040093 y INCB039110 (88).

II. HIPÓTESIS

El estudio molecular de los linfomas de células T permitirá identificar marcadores moleculares que identifiquen subgrupos definidos clinico-patológicamente y seleccionar terapias específicas.

OBJETIVOS

- 1.- Estudio de las características histológicas, inmunofenotípicas y moleculares de una corta serie de linfomas anaplásicos primarios cutáneos con translocación del locus *IRF4-DUSP22*
- 2.- Estudio de la expresión de una proteína diana de terapia, CD30, en linfomas T periféricos usando técnicas de expresión de mRNA y proteína. Caracterización de frecuencia y distribución celular.
- 3.- Estudio mutacional de linfomas T cutáneos para identificación de dianas mutadas, con especial atención a los genes implicados en la ruta JAK/STAT

La presente tesis se centra en tres aspectos de interés, motivo de debate hoy en día, todos ellos englobados en un tema común: “Marcadores que permitan el diagnóstico y selección de terapia dirigida en Linfomas T Periféricos”.

Estos tres temas, que se tratarán separadamente, son los siguientes:

1) Marcadores histológicos y moleculares que permiten el diagnóstico diferencial entre el Linfoma Anaplásico de Células grandes cutáneo primario y la afectación cutánea por un Linfoma Anaplásico sistémico;

2) Expresión de CD30 en Linfomas T Angioinmunoblásticos y Linfomas T periféricos sin otra especificación y terapia dirigida con anti-CD30;

3) Marcadores subrogados de mutaciones específicas o perfiles de expresión y rutas activadas en Linfomas T periféricos y nuevas dianas terapéuticas: Estudio de estado mutacional y actividad de JAK/STAT en Linfomas T cutáneos como potencial Diana terapéutica
Estudio de estado mutacional y actividad de JAK/STAT en Linfomas T cutáneos como potencial Diana terapéutica.

III. ARTÍCULOS QUE COMPONEN EL NÚCLEO CENTRAL DE LA TESIS

Se adjunta material complementario en CD adjunto.

Artículo 1:

Título: Primary cutaneous anaplastic large cell lymphomas with 6p25.3 rearrangement exhibit particular histological features

Autores: Arantza Onaindia^{1,*}, Santiago Montes-Moreno¹, Socorro M Rodríguez-Pinilla², Ana Batlle³, Sonia González de Villambrosía³, Antonio M Rodríguez⁴, Víctor Alegre⁵, Glenda M Bermúdez¹, Carmen González-Vela¹ and Miguel A Piris¹

Revista: Histopathology, 2015 May;66(6):846-55. doi: 10.1111/his.12529. Epub 2015 Feb 4.

DOI: 10.1111/his.12529

Factor de Impacto de Histopathology: 3.453.

Artículo 2:

Título: CD30 Expression by B and T Cells: A Frequent Finding in Angioimmunoblastic T-Cell Lymphoma and Peripheral T-Cell Lymphoma-Not Otherwise Specified.

Autores: Onaindia, Arantza MD; Martínez, Nerea PhD; Montes-Moreno, Santiago MD, PhD; Almaraz, Carmen Tech; Rodríguez-Pinilla, Socorro M. MD, PhD; Cereceda, Laura Tech; Revert, Jose B. Tech; Ortega, César Tech; Tardío, Antoni MD; González, Lucía MD; García, Sonia MD; Camacho, Francisca I. MD, PhD; González-Vela, Carmen MD, PhD; Piris, Miguel A. MD, PhD

Revista: American Journal of Surgical Pathology Article first published online: Post Author Corrections: November 16, 2015

DOI: 10.1097/PAS.0000000000000571

Factor de Impacto de American Journal of Surgical Pathology: 4.592

Artículo 3:

Título: Mutated Jak Kinases And Deregulated Stat Activity Are Potential Therapeutic Targets In Cutaneous T-Cell Lymphoma

Autores: Cristina Pérez, Julia González-Rincón, Arantza Onaindia, Carmen Almaráz, Nuria García-Díaz, Helena Pisonero, Soraya Curiel-Olmo, Sagrario Gómez, Laura Cereceda, Rebeca Madureira, Mercedes Hospital, Dolores Suárez-Massa, José L. Rodríguez-Peralto, Concepción Postigo, Alicia Leon-Castillo, Carmen González-Vela, Nerea Martinez, Pablo Ortiz-Romero, Margarita Sánchez-Beato, Miguel Á. Piris, José P. Vaqué

Revista: Haematologica 2015 Nov;100(11):e450-3. doi: 10.3324/haematol.2015.132837. Epub 2015 Aug 20.

Factor de Impacto de Haematologica: 5.814.

Primary cutaneous anaplastic large cell lymphomas with 6p25.3 rearrangement exhibit particular histological features

Arantza Onaindia,¹ Santiago Montes-Moreno,¹ Socorro M Rodríguez-Pinilla,² Ana Batlle,³ Sonia González de Villambrosía,³ Antonio M Rodríguez,⁴ Víctor Alegre,⁵ Glenda M Bermúdez,¹ Carmen González-Vela¹ & Miguel A Piris¹

¹Pathology Department, Hospital Universitario Marqués de Valdecilla, Santander, Spain, ²Pathology Department, Fundación Jiménez Díaz, Madrid, Spain, ³Haematology Department, Hospital Universitario Marqués de Valdecilla, Santander, Spain, ⁴Pathology Department, Hospital SAS Jerez, Cádiz, Spain, and ⁵Dermatology Department, Hospital General Universitario de Valencia, Valencia, Spain

Date of submission 9 May 2014

Accepted for publication 21 June 2014

Published online Article Accepted 14 August 2014

Onaindia A, Montes-Moreno S, Rodríguez-Pinilla S M, Batlle A, González de Villambrosía S, Rodríguez A M, Alegre V, Bermúdez G M, González-Vela C & Piris M A

(2015) *Histopathology* 66, 846–855. DOI: 10.1111/his.12529

Primary cutaneous anaplastic large cell lymphomas with 6p25.3 rearrangement exhibit particular histological features.

Aims: CD30-positive primary cutaneous lymphoproliferative disorders include several entities with differing clinical presentation but overlapping histological features, including lymphomatoid papulosis and primary cutaneous anaplastic large cell lymphoma (C-ALCL). *DUSP22-IRF4* locus translocation is present in 20–57% of C-ALCLs, and has also been described in a series of 11 lymphomatoid papulosis patients, where it was associated with a particular biphasic histological pattern, including pagetoid reticulosis-type epidermal infiltration. We aimed to study whether the presence of this translocation may define distinctive histological features in C-ALCL.

Methods and results: We collected three cases of C-ALCL with histological features similar to those

described in the new variant of lymphomatoid papulosis with 6p25.3 rearrangement. We studied their histological features and immunophenotype, using a panel of antibodies against CD30, TCR-βF1, TCR-γ, CD4, CD8, CD20, Ki-67 and ALK. FISH analyses were performed using an IRF4–DUSP22 break-apart probe for the study of the 6p25.3 rearrangement. FISH results were positive in the three cases, which all showed distinctive histological and immunohistochemical features: a diffuse dermal infiltrate of atypical medium-to-large cells, and marked epidermotropism with small, atypical intra-epidermal lymphocytes.

Conclusions: Our findings suggest that the presence of 6p25.3 rearrangement might be related to this particular biphasic pattern.

Keywords: 6p25.3 rearrangement, biphasic pattern, *DUSP22-IRF4* translocation, lymphomatoid papulosis (LyP), primary cutaneous anaplastic large cell lymphoma (C-ALCL)

Address for correspondence: A Onaindia Pérez, Pathology Department, Hospital Universitario Marqués de Valdecilla, IFIMAV, Avenida de Valdecilla 25, 39008 Santander, Spain. e-mail: aonaindia@humv.es

© 2014 John Wiley & Sons Ltd.

Introduction

CD30-positive cutaneous lymphoproliferative disorders are a group of entities with differing prognosis and clinical evolution. They include lymphomatoid papulosis (LyP) and primary cutaneous anaplastic

large cell lymphoma (C-ALCL). Despite differences in their clinical presentation, follow-up and response to treatment, these entities may have common histological and phenotypical features.

The study of 6p25.3 rearrangement has recently been described as a useful tool in the differential diagnosis of C-ALCL and systemic ALCL with secondary cutaneous involvement.^{1,2} FISH testing has identified this translocation in 20–57% of the cases of C-ALCL reported so far. Additionally, among all cutaneous T cell lymphoproliferative disorders, FISH for the *DUSP22-IRF4* locus has 99% specificity and a 90% positive predictive value for cutaneous anaplastic large cell lymphoma.³ These studies found no morphological differences between C-ALCL cases with and without the 6p25.3 rearrangement.

A new variant of LyP with a 6p25 rearrangement has since been described in a series of 11 patients. These cases featured clinical features of LyP with a distinctive biphasic histopathological pattern, with *DUSP22-IRF4* locus translocations identified by FISH.⁴ We here report three cases of C-ALCL with translocations involving the *DUSP22-IRF4* locus that exhibit a similar biphasic histological pattern.

Material and methods

We collected three cases of C-ALCL with a 6p25 translocation and histological features similar to those described in the new variant of LyP. We received paraffin blocks from these three patients, seen at the Fundación Jiménez Díaz (Madrid), Hospital SAS Jerez (Cádiz) and Hospital General Universitario de Valencia (Valencia), for a second opinion. Four- μ m paraffin sections were stained with haematoxylin and eosin. Following heat-induced antigen retrieval, 3- μ m sections were immunostained using the Envision method (Dako, Glostrup, Denmark) and avidin–biotin peroxidase detection, with diaminobenzidine as chromogen, on an automated immunostainer (Dako). A panel of antibodies was used against CD30 [Ber-H2, ready to use (RTU); Dako], TCR- β F1 (8A3, dilution 1/40; Thermo Scientific, Fremont, CA, USA), TCR- γ (G3-20, dilution 1/50; Thermo Scientific), CD3 (rabbit polyclonal, RTU; Dako), CD4 (4B12, RTU; Dako), CD8 (C8/144B, RTU; Dako), CD20 (L26, RTU; Dako), Ki-67 (MIB1, RTU; Dako) and ALK (ALK-1, RTU; Dako).

FISH analyses were performed on 3- μ m tissue sections using an *IRF4-DUSP22* (6p25.3) break-apart probe (KBI-10613; Kreatech, Leica, Spain) following standard procedures.^{5,6} Ten μ l of a prediluted probe were applied to the specimen. At least 100 intact,

non-overlapping nuclei were analysed on each slide. Nuclei were scored as rearranged if at least one split orange–green signal was observed. Gains were reported when three or more fusion signals were observed. Control values were established previously based on the mean \pm 3 standard deviations (SD) of 10 control samples. The cut-off value for chromosome gain or rearrangement was 15% in both cases. The translocation partner genes were not identified, and T cell receptor gene rearrangement studies were not performed.

ETHICS

Ethics approval and informed consent were not required for the study.

Results

CASE 1

Case 1 was that of a 69-year-old woman showing a single, erythematous and nodular lesion on her left cheek that was growing rapidly, by more than 2 cm in 2 weeks (Figure 1). Histological examination showed a nodular and diffuse dermal infiltrate affecting the papillary and reticular dermis (Figure 2). The epidermis overlying the dermal nodule exhibited a characteristic pagetoid reticulosis-like intra-epidermal lymphocytosis; these lymphocytes were mostly small and had hyperchromatic and irregular nuclei. The dermal lymphocytes were larger (medium-to-large), with irregular and hyperchromatic nuclei. Several nucleoli were apparent, and large cells with finely granular cytoplasm were intermingled with hallmark cells. Mitotic figures were also abundant. Immunohistochemical studies showed that neoplastic cells in the dermal and intra-epidermal components were strongly positive for CD30 and TCR- β F1, and negative for CD3, CD4, CD8, CD20, ALK and TCR- γ . Interphase FISH for the *IRF4-DUSP22* locus on 6p25.3 produced a split signal that indicated a 6p25.3 rearrangement. The lesion was excised and the patient did not experience any recurrence or spread to distant sites in the 7 months of follow-up.

CASE 2

Two weeks before his first consultation, a 58-year-old man developed a single small (0.6-cm) lesion on his eyelid, persisting during the following 4 months, until its excision. There was no history of previous skin lesions nor LyP, and the patient did not refer to any

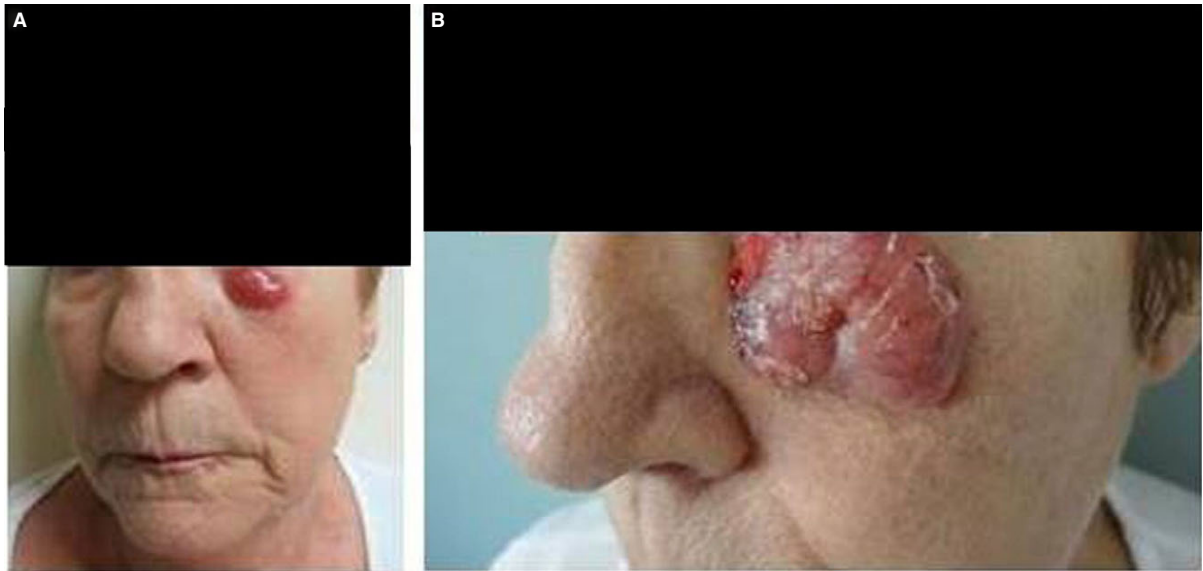


Figure 1. Clinical presentation of cutaneous anaplastic large cell lymphoma with *DUSP22-IRF4* translocation. A, Presenting lesion on the left cheek of a 69-year-old woman (case 1). An isolated, erythematous tumour is present. B, Two weeks later, growing lesion with desquamative areas and central depression.

other symptoms. The biopsy showed a prominent dermal nodule with a dense lymphoid infiltrate; there was diffuse infiltration of the deep and superficial dermis by large- and medium-sized pleomorphic cells (Figure 3). Hallmark cells were intermingled with large cells with marked pleomorphism, pale nuclei, vesicular chromatin and intranuclear inclusions. Eosinophils were rarely seen, but apoptotic bodies and mitotic figures were frequent. There was also another component of small-to-medium sized cells with cerebriform nuclei and irregular contours, showing striking epidermotropism and folliculotropism. Neoplastic cells were positive for CD30, CD3, CD8 and TCR- β F1, and negative for CD20, CD4, TCR- γ and ALK. FISH results were also positive for the *DUSP22-IRF4* translocation. A thoracoabdominal body scan ruled out systemic ALK-negative ALCL, and there was no evidence of disease 9 months after the excision.

CASE 3

A 49-year-old man presented with a history of a solitary 0.8-cm nodule on his chin that had grown to more than 2 cm in less than 1 month. The tumour was removed surgically, and histological examination revealed a prominent dermal nodule showing superficial ulceration and diffuse lymphoid proliferation with epidermotropism in the superficial and deep dermis. As

described in the other two cases, neoplastic lymphocytes had a biphasic pattern. A diffuse dermal infiltrate of atypical, medium-to-large cells, with several nucleoli, large, vesicular nuclei and pale cytoplasm, with abundant mitotic figures and hallmark cells, was present. The epidermis and superficial dermis were infiltrated by small CD30-positive cells, with atypical features, irregular cell shape and cerebriform nuclei, distributed in a pagetoid reticulosis-like pattern. Both components were positive for CD30, CD3 and TCR- β F1, and negative for TCR- γ , CD20, CD4, CD8 and ALK (Figure 4). FISH results were positive for the 6p25.3 rearrangement. The tumour was removed surgically. The patient presented with another violaceous papule on his left wrist, which was not biopsied. He did not have systemic symptoms, and systemic ALK-negative ALCL was excluded by imaging studies (thoracoabdominal body scan, PET and MRI). The patient received local radiotherapy, without any recurrence during the 6 months following removal.

Discussion

We report three cases of primary cutaneous ALCL with translocations involving the *DUSP22-IRF4* locus, all with a similar clinical presentation and distinctive histological features (Table 1). All three patients had a solitary, nodular and rapidly growing lesion on the face, showing a striking biphasic histological pattern.

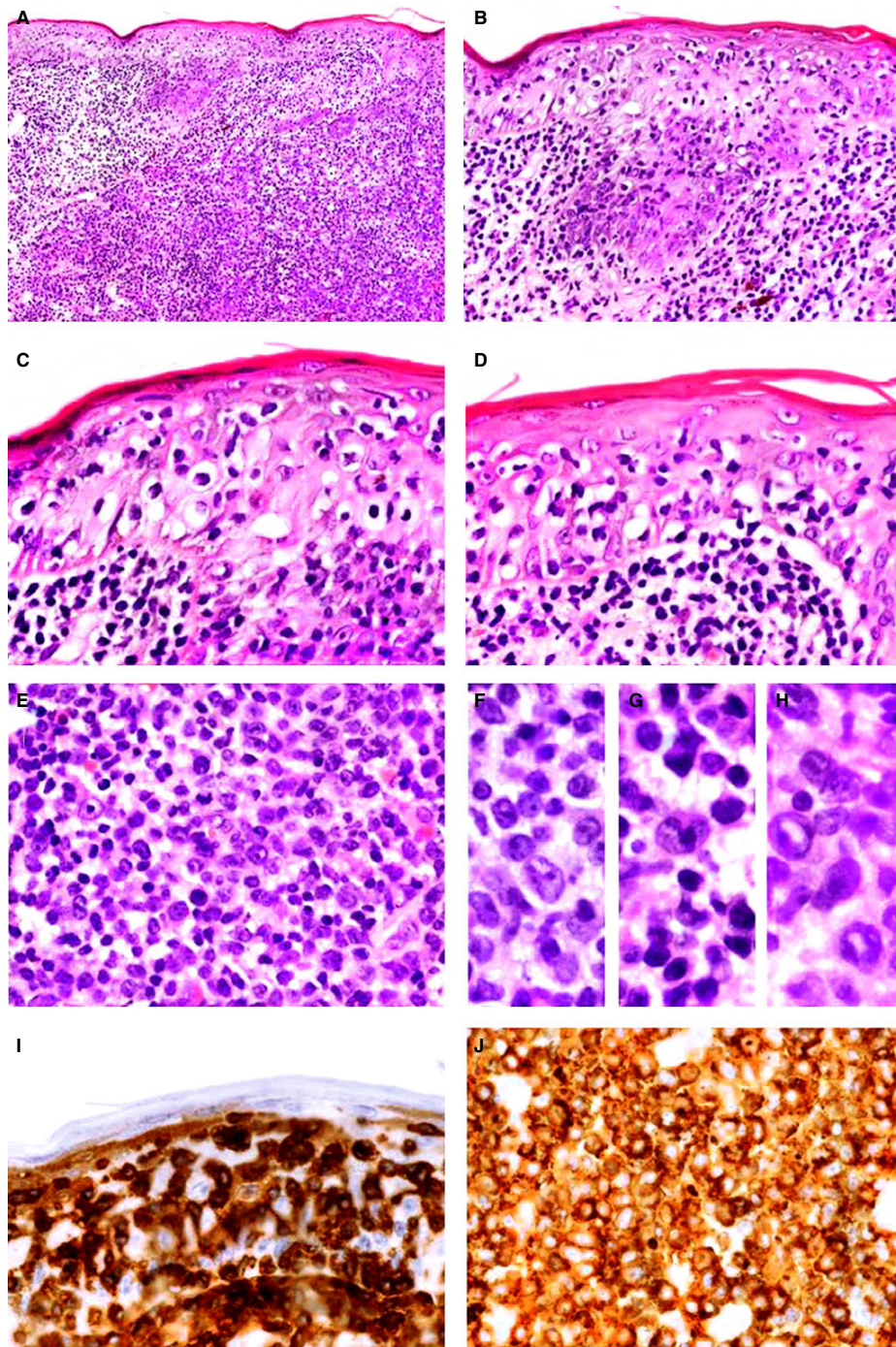


Figure 2. Histological features of cutaneous anaplastic large cell lymphoma with *DUSP22-IRF4* translocation (case 1). A. Low-power microscopic image of the lesion showing a nodular and diffuse dermal infiltrate of medium-large atypical cells. B. Pagetoid reticulosis-like intra-epidermal lymphocytosis overlying the dermal infiltrate. The lymphocytes are mostly small and have hyperchromatic and irregular nuclei (C,D). The dermal lymphocytes were larger (medium-to-large), with irregular and hyperchromatic nuclei (E). Large cells with finely granular cytoplasm (F), kidney-shaped cells (G) and intranuclear inclusions (H) were also evident. The dermal and intra-epidermal components were both strongly CD30-positive (I, J).

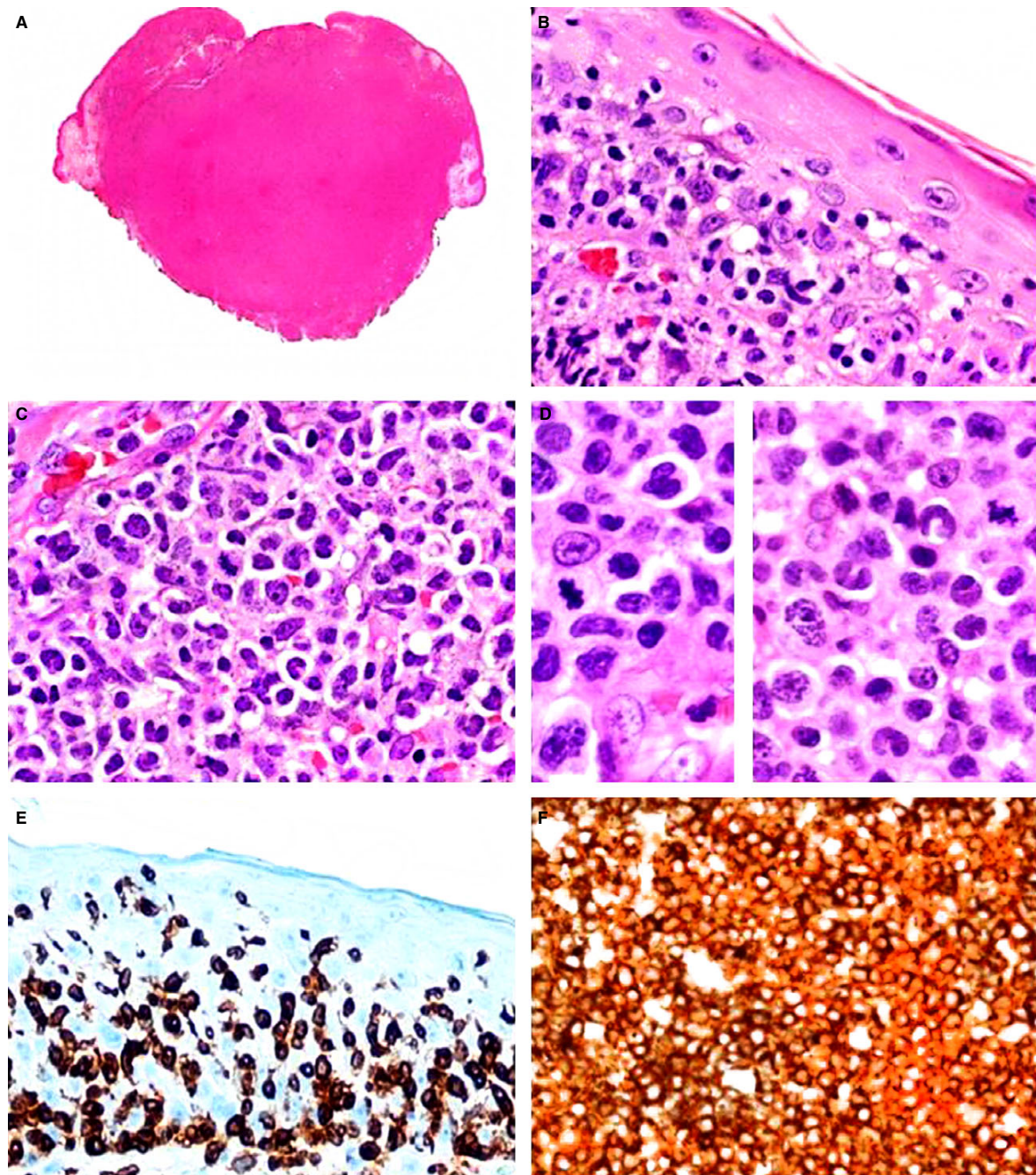


Figure 3. Histological features of cutaneous anaplastic large cell lymphoma with 6p25.3 rearrangement. A, Low-power microscope image of the lesion in the eyelid of a 58-year-old man (case 2) demonstrating a dermal nodule with the macroscopic appearance of a tumoral lesion. B, Intra-epidermal infiltrate, with small-medium-sized lymphocytes with atypical features. C, Dermal infiltrate composed of large cells with hyperchromatic nuclei and finely granular cytoplasm. D, Mitotic figures, apoptotic bodies and hallmark cells were also present. E, F, Dermal and intra-epidermal cells were positive for CD30.

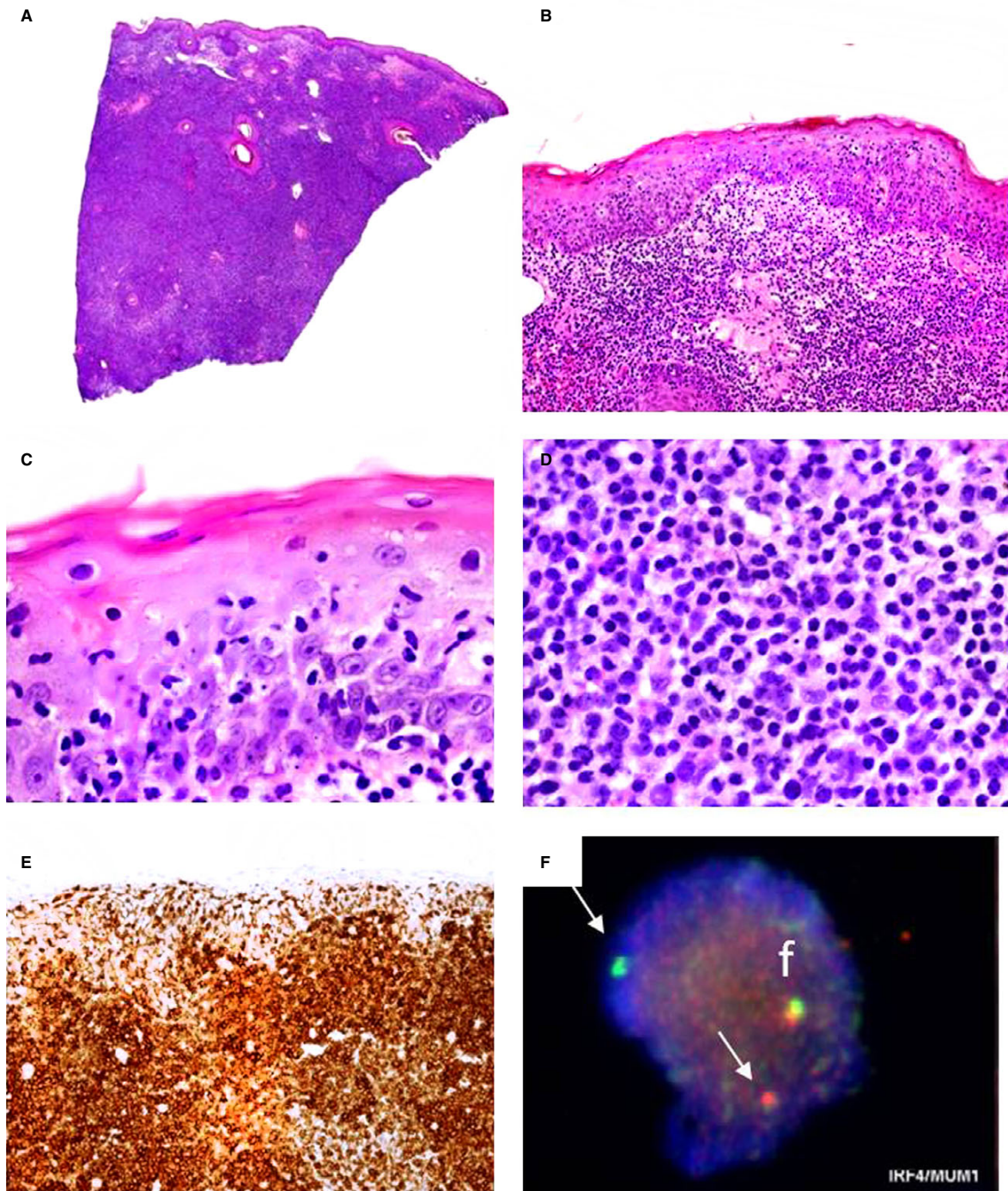


Figure 4. Histological features of cutaneous anaplastic large cell lymphoma with *DUSP22-IRF4* translocation (case 3). A, Low-power microscopic image of the lesion, a diffuse dermal infiltration on the chin of a 49-year-old man (case 3), characterized histologically by a dense dermal infiltrate with epidermal involvement. B, C, Marked epidermotropism by small lymphocytes. D, Dermal infiltrate of medium-sized and atypical lymphocytes. E, Both components were strongly CD30-positive. F, Results of interphase FISH using a break-apart probe for the *IRF4-DUSP22* locus on 6p25.3 (case 3). One cell nucleus is shown, with a normal, intact fusion signal (f) and an abnormal split signal (arrows: red, telomeric; green, centromeric), indicating a 6p25.3 rearrangement.

Table 1. Clinical, histological, immunophenotypal and genetic features of three patients with C-ALCL

| | Case | | |
|------------------------------|--|--|---|
| | 1 | 2 | 3 |
| Clinical presentation | | | |
| Age (years) | 69 | 58 | 49 |
| Sex | F | M | M |
| Site | Cheek | Eyelid | Chin |
| Type of lesion | Solitary tumour (>3 cm) | Subepidermal nodule (0.6 cm) | Solitary nodule (2 cm) |
| Histological features | | | |
| Epidermal component | Slightly atypical pagetoid reticulosis-like infiltrate | Epidermotropism, folliculotropism and presence of small lymphocytes lining the basal layer | Atypical intraepidermal lymphoid infiltrate |
| Dermal component | Medium-sized cells with scattered anaplastic cells | Diffuse infiltrate with hallmark cells and abundant mitotic figures | Large cells with marked anaplastic features |
| Immunophenotype | | | |
| ALK | Negative | Negative | Negative |
| CD3 | Negative | Positive (D, E) | Positive (D, E) |
| CD4 | Negative | Negative | Negative |
| CD8 | Negative | Positive (D, E) | Negative |
| CD20 | Negative | Negative | Negative |
| CD30 | Positive (D, E) | Positive (D, E) | Positive (D, E) |
| TCR- β F1 | Positive (D, E) | Positive (D, E) | Positive (D, E) |
| TCR- γ | Negative | Negative | Negative |
| Ki-67 | – | >80% | – |
| Genetics | | | |
| 6p25.3 rearrangement | Present | Present | Present |
| Follow-up | | | |
| Treatment | Excision | Excision | Excision Local radiotherapy |
| Follow-up (months) | 7 | 9 | 6 |
| Spontaneous resolution | – | – | – |
| Disseminated skin disease | No | No | No |
| Extracutaneous disease | No | No | No |
| Status at last follow-up | NED | NED | NED |

Lyp: Lymphomatoid papulosis; ALK: Anaplastic lymphoma kinase; D: Positive staining in dermal component; E: Positive staining in epidermal component; C-ALCL: Primary cutaneous anaplastic large cell lymphoma; NED: No evidence of disease.

Table 2. Differential diagnosis of CD30-positive lymphoproliferative disorders

| | Primary cutaneous anaplastic large cell lymphoma | Systemic anaplastic large cell lymphoma (ALK-negative) with cutaneous involvement | Lymphomatoid papulosis with 6p25.3 rearrangement ⁴ |
|-----------------------|---|---|--|
| Epidemiology | Adults (median age 60 years). Male predominance (2–3 M:1 F) | Adults 40–65 years. Male predominance (1.5 M:1 F) | Elderly patients (mean age 75 years). Male predominance (9 M:2 F) |
| Clinical presentation | Solitary nodules (>2 cm) on trunk, face, extremities and buttocks. Frequently ulcerated and with partial regression. Multifocal lesions 20%. No history or clinical evidence of MF. Regional node involvement 10% | Advanced stage (III or IV) | Single or multiple papulonodular lesions (0.3–1.0 cm), without ulceration on the head and neck, upper torso, and extremities. Absence of disseminated cutaneous disease or clinical evidence of extracutaneous disease |
| Histological features | Nodular or diffuse dermal infiltrate. Sheets of CD30 ⁺ (>75%) atypical lymphocytes (anaplastic, pleomorphic or immunoblastic) | Large pleomorphic cells ('hallmark cells'). Mitotic figures | Dermal nodule with a dense lymphoid infiltrate, and atypical lymphoid infiltrate in the epidermis simulating lesions of pagetoid reticulosis; periadnexal involvement |
| Immunophenotype | CD30 ⁺ (>75%) ALK ⁻ | CD30 ⁺ ALK ⁻ EMA ⁺ , CD43 ⁺ , CD2 ⁺ , CD4 ⁺ | Biphasic pattern of CD30 expression (dermis>epidermis). ALK ⁻ CD15 ⁺ (<30%) CD4/CD8 ^{+/-} TCRβ ⁺ Ki-67 index>80% |
| Genetics | Clonal TCR rearrangements >90%. 6p25.3 rearrangement in 20–57% ^{2,3,11} | Clonal TCR rearrangement | Clonal TCR rearrangements >40%. 6p25.3 rearrangements in all cases (<i>DUSP22-IRF4</i> locus) |
| Prognosis | Frequent relapse. Favourable prognosis: 90% 10-year disease-related survival | 5-year relapse-free survival 36% | Spontaneous regression a few weeks after presentation |
| Treatment | Excision ± radiotherapy | Systemic chemotherapy | Wait and see. Local excision with or without cryotherapy, or radiotherapy |

MF, Mycosis fungoides; TCR, T-cell receptor.

Immunohistochemical studies revealed that neoplastic cells of both components (dermal and intra-epidermal) were strongly positive for CD30, negative for ALK and positive for at least one T cell marker (TCR-βF and/or CD3). Interphase FISH for the *DUSP22-IRF4* locus on 6p25.3 revealed an abnormal split signal that indicated a 6p25.3 rearrangement. Systemic ALK-negative ALCL was excluded by imaging studies, all three

tumours were excised, and the patients experienced no recurrence or spread to distant sites during their 6–9 months of follow-up.

As discussed above, C-ALCL must be differentiated from cutaneous involvement by systemic ALK-negative ALCL and LyP.⁷ These three entities have overlapping histological features but distinct clinical presentations (Table 2).

Table 3. Incidence of *IRF4* translocation in skin biopsies of T cell lymphoproliferative disorders: summary of four reported series

| Study | S-ALCL | C-ALCL | LyP |
|---|------------|-------------|--------------|
| Feldman <i>et al.</i> ² | 1/23 | 8/14 (57%) | Not tested |
| Pham-Ledard <i>et al.</i> ¹² | Not tested | 6/23 (26%) | 0/7 |
| Wada <i>et al.</i> ³ | 0/7 | 9/45 (20%) | 1/32 (3%) |
| Karai <i>et al.</i> ⁴ | Not tested | Not tested | 11/11 (100%) |
| Total | 0 | 23/82 (28%) | 12/50 (24%) |

S-ALCL, Systemic anaplastic large cell lymphoma; C-ALCL, Cutaneous anaplastic large cell lymphoma; LyP, Lymphomatoid papulosis.

C-ALCL is defined as a CD30-positive large T cell lymphoma presenting primarily in the skin and characterized by a good prognosis and response to treatment.⁸ Primary C-ALCL is usually a large (>2 cm), solitary and commonly ulcerated lesion that occurs in adults. Partial regression is common, but spontaneous regression is rare, and extracutaneous involvement is possible.⁹ The disease must be distinguished from systemic ALCL with cutaneous involvement, which is a separate disease with different cytogenetics, clinical features and outcome.¹⁰ Systemic involvement was absent in the three patients here described, either at diagnosis or after follow-up.

Several studies have reported rearrangements of 6p25.3 in both cutaneous and systemic ALCL. Feldman *et al.*² reported 12 peripheral T cell lymphomas (PTCLs) with *DUSP22-IRF4* translocations among 155 PTCL cases (8%), including one of 23 ALK-negative ALCLs and eight of 14 C-ALCLs (57%); mutations were identified in six of 23 C-ALCL (26%) by Pham-Ledard *et al.*¹² and in 10 of 182 patients (5%) by Wada *et al.*³ including nine of 45 (20%) C-ALCL lymphomas and one of 32 (3%) cases of LyP (Table 3). More recently, Parilla-Castellar *et al.*¹¹ found 6p25.3 translocations in up to 30% of systemic ALK-negative ALCL, associated with a good response to therapy. Thus, it seems that the *DUSP22-IRF4* translocation may occur in different clinicopathological disorders, including LyP, C-ALCL and systemic ALCL, but in all cases it could be associated with specific morphological or clinical features.

Morphologically, no differences were observed between C-ALCL lymphomas with and without *DUSP22-IRF4* translocations in the aforementioned studies.^{2,3,12} Lesions showed confluent sheets of large tumour cells, with cytological features of so-called 'hallmark' cells, similar to those seen in systemic ALCL. By defining criteria, CD30 was expressed in

the majority (>75%) of tumour cells in all cases; similar morphological and phenotypical characteristics were also seen in the single case of LyP that was positive for the mutation, but the clinical features favoured LyP over C-ALCL.

A series of 11 cases of LyP harbouring chromosomal rearrangements of the *DUSP22-IRF4* locus on 6p25.3 has been described recently⁴ (Table 3). All the cases had the same characteristic biphasic pattern that was present in the three cases we report: a dermal nodule with a dense lymphoid infiltrate showing large and hallmark cells, and an epidermal infiltrate with small-to-medium-sized cells, simulating lesions of pagetoid reticulosis.

Distinguishing between C-ALCL and this new variant of LyP currently relies upon clinical data, mainly those concerning the size, number and evolution of the lesions. LyP is defined as a chronic, recurrent, self-healing eruption of papules and small nodules in a single body area that undergoes spontaneous regression. The lesions here described were large single tumoral masses without posterior relapses.

In this study we report three cases of skin biopsies showing histological and phenotypical features of a T lymphoproliferative CD30-positive disorder and clinical features of primary cutaneous ALCL. To the authors' knowledge, the biphasic pattern shown by the three cases has only been described previously in LyP with *DUSP22-IRF4* translocation. These findings suggest that primary cutaneous CD30 lymphoproliferative disorders carrying the 6p25.3 translocation have similar histological features (biphasic pattern with pagetoid reticulosis-like epidermal infiltration), albeit with clinical presentations from LyP to C-ALCL.⁴ Investigation of the biological pathways triggered by *DUSP22-IRF4* rearrangements and/or expression in cutaneous T cell lymphomas may determine a biological basis for targeted therapy.^{12,13}

Acknowledgements

The work was funded by grants from the Asociación Española Contra el Cáncer (AECC) and the MINECO (SAF2013-47416-R). We are grateful to IDIVAL and the HUMV Tissue Bank for providing us the samples. We would like to thank Laura Cereceda, José B. Revert and César Ortega for their excellent technical assistance.

Conflict of interests

The authors declare no potential conflicts of interest.

References

1. Kiran T, Demirkesen C, Eker C, Kumusoglu H, Tuzuner N. The significance of MUM1/IRF4 protein expression and IRF4 translocation of CD30(+) cutaneous T-cell lymphoproliferative disorders: a study of 53 cases. *Leuk. Res.* 2013; **37**: 396–400.
2. Feldman AL, Law M, Remstein ED *et al.* Recurrent translocations involving the IRF4 oncogene locus in peripheral T-cell lymphomas. *Leukemia* 2009; **23**: 574–580.
3. Wada DA, Law ME, Hsi ED *et al.* Specificity of IRF4 translocations for primary cutaneous anaplastic large cell lymphoma: a multicenter study of 204 skin biopsies. *Mod. Pathol.* 2011; **24**: 596–605.
4. Karai LJ, Kadin ME, Hsi ED *et al.* Chromosomal rearrangements of 6p25.3 define a new subtype of lymphomatoid papulosis. *Am. J. Surg. Pathol.* 2013; **37**: 1173–1181.
5. Sartore-Bianchi A, Fieuws S, Veronese S *et al.* Standardisation of EGFR FISH in colorectal cancer: results of an international interlaboratory reproducibility ring study. *J. Clin. Pathol.* 2012; **65**: 218–223.
6. Ventura RA, Martin-Subero JI, Jones M *et al.* FISH analysis for the detection of lymphoma-associated chromosomal abnormalities in routine paraffin-embedded tissue. *J. Mol. Diagn.* 2006; **8**: 141–151.
7. McQuitty E, Curry JL, Tetzlaff MT, Prieto VG, Duvic M, Torres-Cabala C. The differential diagnosis of CD8-positive ('type D') lymphomatoid papulosis. *J. Cutan. Pathol.* 2014; **41**: 88–100.
8. Willemze R, Meijer CJ. Classification of cutaneous T-cell lymphoma: from Alibert to WHO-EORTC. *J. Cutan. Pathol.* 2006; **33**(Suppl. 1): 18–26.
9. Krishnan J, Tomaszewski MM, Kao GF. Primary cutaneous CD30-positive anaplastic large cell lymphoma. Report of 27 cases. *J. Cutan. Pathol.* 1993; **20**: 193–202.
10. Ebo D, Van Hoof A. Large cell anaplastic lymphoma (Ki-1 lymphoma). *Acta Clin. Belg.* 1992; **47**: 170–177.
11. Parilla-Castellar ER, Said JW, Swerdlow SH *et al.* ALK-negative anaplastic large cell lymphoma is a genetically heterogeneous disease with widely disparate clinical outcomes. *Blood* 2014; Jun 3; pii: blood-2014-04-57191.
12. Pham-Ledard A, Prochazkova-Carlotti M, Laharanne E *et al.* IRF4 gene rearrangements define a subgroup of CD30-positive cutaneous T-cell lymphoma: a study of 54 cases. *J. Invest. Dermatol.* 2010; **130**: 816–825.
13. Shaffer AL, Emre NC, Romesser PB, Staudt LM. IRF4: immunity. Malignancy! Therapy? *Clin. Cancer Res.* 2009; **15**: 2954–261.

CD30 Expression by B and T Cells

A Frequent Finding in Angioimmunoblastic T-Cell Lymphoma and Peripheral T-Cell Lymphoma-Not Otherwise Specified

Arantza Onaindia, MD,* Nerea Martínez, PhD,† Santiago Montes-Moreno, MD, PhD,*‡
 Carmen Almaraz, Tech,† Socorro M. Rodríguez-Pinilla, MD, PhD,§ Laura Cereceda, Tech,†‡
 Jose B. Revert, Tech,‡ César Ortega, Tech,* Antoni Tardio, MD,|| Lucía González, MD,¶
 Sonia García, MD,# Francisca I. Camacho, MD, PhD,** Carmen González-Vela, MD, PhD,* and
 Miguel A. Piris, MD, PhD*†

Abstract: CD30 expression in peripheral T-cell lymphoma (PTCL) and angioimmunoblastic T-cell lymphoma (AITL) is currently of great interest because therapy targeting CD30 is of clinical benefit, but the clinical and therapeutic relevance of CD30 expression in these neoplasms still remains uncertain. The aim of this study was to better quantify CD30 expression in AITL and PTCL-not otherwise specified (NOS). The secondary objective was to determine whether CD30⁺ cells exhibit a B-cell or a T-cell phenotype. Gene expression profiling was studied in a series of 37 PTCL cases demonstrating a continuous spectrum of TNFRSF8 expression. This prompted us to study CD30 immunohistochemical (IHC) expression and mRNA levels by reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) in a different series of 51 cases (43 AITLs and

8 PTCL-NOSs) in routine samples. Double stainings with PAX5/CD30, CD3/CD30, and LEF1/CD30 were performed to study the phenotype of CD30⁺ cells. Most (90%) of the cases showed some level of CD30 expression by IHC (1% to 95%); these levels were high (> 50% of tumoral cells) in 14% of cases. CD30 expression was not detected in 10% of the cases. Quantitative RT-PCR results largely confirmed these findings, demonstrating a moderately strong correlation between global CD30 IHC and mRNA levels ($r = 0.65$, $P = 1.75e-7$). Forty-four of the positive cases (98%) contained CD30-positive B cells (PAX5), whereas atypical CD30-positive T cells were detected in 42 cases (93%). In conclusion, our data show that most AITL and PTCL-NOS cases express CD30, exhibiting very variable levels of CD30 expression that may be measured by IHC or RT-PCR techniques.

Key Words: CD30, AITL, PTCL-NOS, RT-PCR, GEP, EBV

(*Am J Surg Pathol* 2015;00:000–000)

From the *Pathology Department, Hospital Universitario Marqués de Valdecilla; †Cancer Genomics Laboratory, Instituto Formación Investigación Hospital Universitario Marqués de Valdecilla (IDIVAL); ‡Tissue Biobank, HUMV/IDIVAL, Santander; §Pathology Department, Fundación Jiménez Díaz; **Pathology Department, Hospital Universitario de Getafe, Madrid; ||Pathology Department, Hospital Do Meixoeiro, Vigo; ¶Pathology Department, Hospital General de Ciudad Real, Ciudad Real; and #Pathology Department, Hospital Universitario de Canarias, Tenerife, Spain.

M.A.P. is a senior author.

A.O. and M.A.P.: designed the study. A.O., M.A.P., and S.M.-M.: wrote the manuscript. C.A., N.M., S.M.R.-P., J.B.R., and C.O.: performed the experiments. L.C.: collected the samples. A.T., L.G., F.I.C.: provided the clinical data. C.G.-V.: supervised the manuscript. A.O., S.M.-M., and M.A.P.: performed experiments and/or analyzed data.

Conflicts of Interest and Source of Funding: Supported by grants from the Asociación Española contra el Cáncer (AECC) and grants from the MINECO-Spain (SAF2013-47416-R, RD06/0020/0107-RD012/0036/0060; PI12/00357; CD11/00018). IDIVAL is partly funded by the Sociedad para el Desarrollo Regional de Cantabria (SODERCAN). The authors declare to have received lectures from Takeda.

Correspondence: Arantza Onaindia, Pathology Department, Hospital Universitario Marques de Valdecilla, Avda. Valdecilla 25, Santander ES 39008, Spain (e-mail: arantza_onaindia@yahoo.es).

Supplemental Digital Content is available for this article. Direct URL citations appear in the printed text and are provided in the HTML and PDF versions of this article on the journal's Website, www.ajsp.com.

Copyright © 2015 Wolters Kluwer Health, Inc. All rights reserved.

Peripheral T-cell lymphomas (PTCLs) are a heterogeneous group of non-Hodgkin lymphomas often associated with an aggressive clinical course and poor outcome. Their pathogenesis is still poorly understood.¹

Among the PTCL subtypes, PTCL-not otherwise specified (PTCL-NOS), angioimmunoblastic T-cell lymphoma (AITL), and anaplastic large cell lymphoma (ALCL) are the most frequent. Until recently, the therapeutic approach for PTCL was based on anthracycline-based combination chemotherapy. However, these have yielded poor outcomes, with overall response rates ranging from 39% to 84% in studies in which multiagent chemotherapy was used in newly diagnosed PTCL patients, as well as a median overall survival of only 5.5 months for patients with relapsed or refractory PTCL.²

To date, only 3 agents have been approved by the FDA for the treatment of relapsed or refractory PTCL: pralatrexate, romidepsin, and brentuximab vedotin (BV). The latter is exclusively reserved for patients with CD30-positive (CD30⁺) relapsed or refractory ALCL,³⁻⁵ resulting in 86% and 57% complete remission rates,

respectively, which enabled regulatory approval for use against this disease in 2011.⁵

CD30 is a tumor necrosis factor (TNF) receptor family transmembrane receptor with restricted expression in activated T and B cells in normal lymphoid tissues.⁶ BV is an antibody-drug conjugate that combines a cytotoxic agent (MMAE) with an anti-CD30 antibody.⁷ CD30 status assessment is thus considered critical to therapeutic decision-making. An investigational phase 2 trial using single-agent BV was recently performed by Horwitz et al⁸ involving both B-cell and T-cell lymphomas (excluding ALCL), in an attempt to characterize the relationship between CD30 expression and antitumor activity. The study comprised 13 cases of AITL and 22 PTCL-NOSs. The overall response rate was 54% in AITLs, with a median progression-free survival of 6.7 months, which implies that BV could be a therapeutic option for AITL. Nevertheless, no correlation between CD30 expression and response was observed, and objective responses were observed in patients with undetectable levels of CD30.⁸

The reliability of immunohistochemistry (IHC) for evaluating CD30 protein expression and the extent of CD30 expression in lymphoma remains unclear. Thus, the aim of the present study was to better determine and quantify CD30 expression in AITL and PTCL-NOS to establish objective criteria for PTCL patients who might benefit from directed anti-CD30 therapy. A secondary objective was to determine whether CD30⁺ cells exhibit a B-cell or a T-cell phenotype, with a view to evaluating novel therapeutic strategies.

MATERIALS AND METHODS

Gene Expression Profiling Analysis

Tumor diagnostic biopsies were obtained from the CNIO Tumour Bank Unit, after approval by the Clinical Research Ethics Committee of the Hospital Universitario Marqués de Valdecilla (HUMV, Santander, Spain), as reported in a previous study.⁹ The data of 37 frozen PTCL cases were used, comprising 19 PTCL-NOS, 15 AITL, and 3 ALCL cases. RNA was extracted using Trizol reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA), following the manufacturer's instructions. Gene expression experiments used a Whole Human Genome Oligo Microarray (4×44K format), following the manufacturer's instructions (Agilent Technologies Inc., Santa Clara, CA). Reactive lymph node and tonsil samples were used as controls. A partial description of the gene expression data in this series has been published previously.⁹ All raw microarray data from the PTCL series are available at the Gene Expression Omnibus under accession number GSE36172.

Patients and Tissue Samples

We collected a cohort of 55 cases that had been submitted to the HUMV for diagnosis or a second opinion between 2011 and 2014, after approval by the hospital's Clinical Research Ethics Committee. All cases were reviewed by 2 independent pathologists (A.O. and

M.A.P.), and criteria for the diagnosis of PTCL-NOS and AITL were based on the 2008 WHO classification.¹

Clinical Data

Clinical data and the standard prognostic indices for this series are summarized in Supplementary Table 1 (Supplemental Digital Content 1, <http://links.lww.com/PAS/A324>). All prognostic indices were assessed at the time of initial diagnosis.^{10–13}

Immunohistochemistry

Formalin-fixed paraffin-embedded (FFPE) tissues were used for histologic examination. Paraffin sections of 4-μm thickness were stained with hematoxylin and eosin. Whole-tissue sections (3-μm thick) were immunostained using the Envision FLEX method (Dako, Glostrup, Denmark) and diaminobenzidine (DAB) chromogen following a heat-induced antigen-retrieval step and avidin-biotin peroxidase detection on an automated immunostainer (Dako Autostainer Link 48). A panel of antibodies including CD30, CD3, PD1, CD20, and Ki 67 was used for diagnosis (Table 1). CD30 expression was quantified and expressed as the percentage of positive cells in whole-tissue sections, with distinction between tumoral and microenvironmental cells. IHC staining and in situ hybridization for Epstein-Barr virus-encoded RNA (EBER) were performed following conventional automated protocols.

To determine the phenotype of CD30-positive cells, membrane CD30 and nuclear PAX5 and LEF1 double IHC stains were performed on 3- to 4-mm-thick sections of FFPE tissues. Double CD30 and CD3 membrane stains were also performed. Slides were first deparaffinized and rehydrated. Antigens were retrieved with 10 mM citrate (pH 6.5). Slides were heated in a 770 W microwave oven for 14 minutes, cooled to room temperature, and rinsed in distilled water before staining. The slides were stained on a Dako Autostainer (Dako Autostainer Link 48). The sections were first blocked for endogenous peroxidase activity by the application of peroxidase-blocking reagent (EnVision Flex; Dako) for 5 minutes, followed by a brief buffer wash. The sections were then incubated with the first antibody for different periods: 20 minutes with PAX5, followed by a mouse linker (EnVision Flex; Dako) for 15 minutes, 30 minutes with LEF1, and 20 minutes with CD3. After a buffer rinse, sections were incubated with the Dako EnVision Flex/HRP detection reagent for 20 minutes. The sections were washed and treated with a solution of DAB for 10 minutes to produce the visible brown pigment. After rinsing, sections were incubated with the second anti-CD30 antibody for 20 minutes. Rabbit/mouse (LINK) (EnVision G12 System/AP; Dako) was then added, and a secondary reagent (Enhancer; Dako) was used for 30 minutes. The second color was added by applying permanent red chromogen for 10 minutes for PAX5/CD30 and LEF1/CD30 double stains and for 10 minutes for CD3/CD30. After rinsing, the sections were counterstained with hematoxylin, dehydrated, and coverslipped with Permount.

TABLE 1. Antibodies

| Antibody | Clone/Reference | Source | Antigen Retrieval/Visualization Method | Dilution |
|----------|-------------------|-------------------------|--|----------|
| CD20 | L26/IR604 | Dako, Glostrup, Denmark | Citrate pH 6/FLEX Dako | RTU |
| CD30 | Ber-H2/IR602 | Dako | Citrate pH 6/FLEX Dako | RTU |
| CD3 | IR503 | Dako | Citrate pH 6/FLEX Dako | RTU |
| PD1 | NAT105C/E3 | CNIO, Madrid, Spain | Citrate pH 6/FLEX Dako | 1/100 |
| PAX5 | DAK-PAX5/IR650 | Dako | Citrate pH 6/FLEX Dako | RTU |
| LEF1 | EPR2029Y/ab137872 | Abcam, Cambridge, UK | Citrate pH 6/FLEX Dako | 1/100 |
| Ki 67 | MIB-1/IR626 | Dako | Citrate pH 6/FLEX Dako | RTU |

RTU indicates ready to use.

Sections were carefully examined to evaluate the coexpression of these markers by the same cell. The staining pattern was evaluated and classified into 4 categories: 0, absence of coexpression; 1, coexpression by a low percentage (< 25%) of tumoral cells; 2, coexpression by an intermediate percentage (25% to 50%) of tumoral cells; and 3, coexpression by a high percentage (> 50%) of tumoral cells. The relative percentages of PAX5/CD30-positive, CD3/CD30-positive, and LEF1/CD30-positive cells were then calculated for each CD30 IHC score.

Quantitative Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction

Total RNA was extracted from FFPE tissue sections using the RNeasy Mini Kit (Qiagen, Valencia, CA). cDNA was synthesized from 500 µg DNaseI-treated RNA with SuperScript II Reverse Transcriptase (Invitrogen) and random primers. For CD30 (TNFRSF8) detection, TNFRSF8 Hs01114493_m1 Taqman probe (Life Technologies, Foster City, CA) was used. Gene expression was analyzed in a 7900HT Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems). Human GAPDH was used as an endogenous control, and HUT78 and MYLA cell lines were used as CD30-positive controls. $-\Delta\Delta C_t$ values were used for further analysis.

Statistical Analysis

Spearman correlation coefficients between CD30 IHC percentages and mRNA expression were calculated. The Fisher exact test was used to evaluate the significance of the association of PAX5 and LEF1 stains with the CD30 IHC scores.

RESULTS

Gene Expression Profiling Data From a Series of Frozen PTCL Samples Reveal That All PTCLs Exhibit Varying Levels of CD30 Expression

Gene expression profiling (GEP) analysis was first performed on a cohort of frozen tumor samples comprising 19 PTCL-NOS, 15 AITL, and 3 ALCL cases. Results demonstrated a continuous spectrum of *TNFRSF8* expression, ranging from negative (using 6 reactive lymph nodes as controls) to very positive results (Fig. 1A). These results suggest that all PTCLs exhibit variable levels of CD30 mRNA expression compared with reactive lymphadenitis and tonsils. All raw microarray data from the PTCL series are available at the Gene Expression Omnibus under accession number GSE36172.

PTCL-NOS and AITL Show Frequent But Heterogenous CD30 IHC Expression

The GEP results prompted us to study CD30 IHC expression in a second cohort of FFPE cases. The series comprised 51 cases, including 43 AITL (84%) and 8 PTCL-NOS cases (16%). Forty-nine of the cases were lymph node samples. One case corresponded to a spleen involved with AITL and another case to a cutaneous infiltration by PTCL-NOS. One AITL case showed a striking proliferation of reactive B-cell blasts (case no. 51), and another showed progression to diffuse large B-cell lymphoma (case no. 27).

Forty-six cases (90% of the total cohort) expressed CD30 at levels ranging from 1% to 95% of the tumoral and non-neoplastic B cells (mean expression, 27%). CD30 expression was undetectable in 3 AITL patients and 2 PTCL-NOS patients (10%), whereas 7 cases (4 AITLs and 3 PTCLs) presented high levels (> 50% of the tumoral cells) of CD30 expression, including 3 cases (6%) with > 80% of CD30⁺ cells (Figs. 1B, 2). No CD30 expression was seen in macrophages.

These results are in accordance with those obtained from the first series of frozen PTCLs, indicating that most PTCL samples contain CD30-positive cells that can be detected by IHC in routinely processed FFPE samples.

Quantitative Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction Experiments on FFPE Samples Support Findings From GEP and IHC

Quantitative reverse transcription polymerase chain reaction (qRT-PCR) was performed on 42 of the cases previously studied with IHC, yielding results from 28 (67%) of them. Eight cases failed to amplify and were therefore excluded. These results are in accordance with those obtained by GEP profiling, showing that CD30 expression is present to some degree in most PTCLs. CD30 IHC scores were moderately correlated with mRNA levels ($r = 0.65$, $P = 1.75e-7$) (Fig. 3). Only 1 case showed significantly higher IHC CD30 expression than mRNA levels (case no. 49), which could be explained by the existence of additional mechanisms regulating mRNA translation (Supplementary Table 2, Supplemental Digital Content 1, <http://links.lww.com/PAS/A324>). Cases with higher CD30 IHC than mRNA levels could be explained by an uneven distribution of CD30-positive cells throughout the tissue.

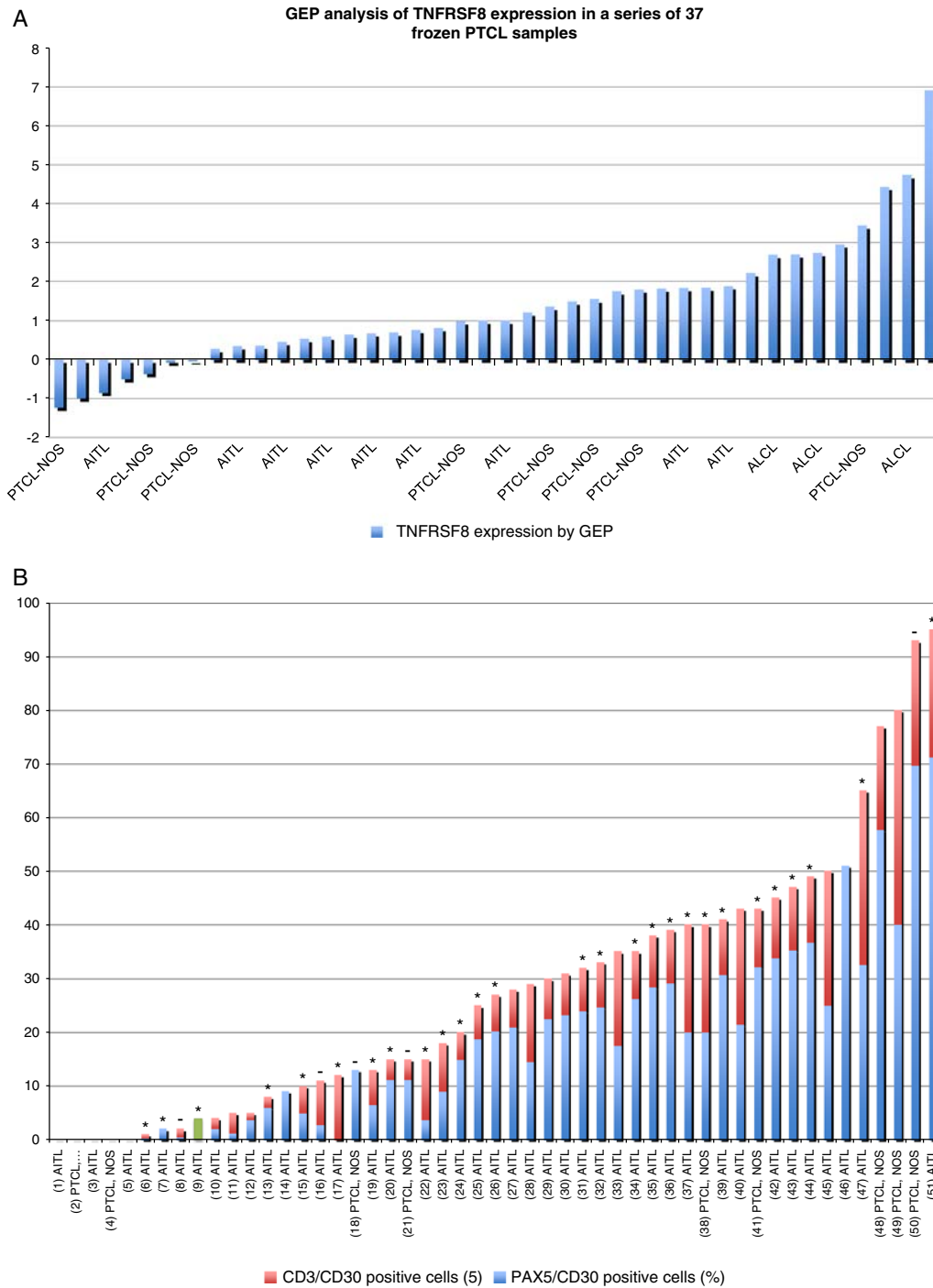


FIGURE 1. CD30 heterogenous IHC expression in AITL is correlated with GEP data. A, GEP data from a series of 37 frozen PTCLs show continuous expression of TNFRSF8. B, CD30 IHC expression in a series of FFPE samples of 51 PTCLs shows the same pattern. Histogram column height shows the total percentage of CD30⁺ cells for each case. The red and blue colors indicate the percentages of CD3⁺/CD30⁺ and of PAX5⁺/CD30⁺ cells in each sample. The green histogram in case 9 indicates the total percentage of CD30⁺ cells; double staining results were not available. In cases 7, 14, 18, and 46, CD30⁺ cells were PAX5 positive, and there were no CD3⁺/CD30⁺ cells. Case 17 comprised only CD3⁺/CD30⁺ cells. In total, 86.96% of the cases exhibited coexpression of PAX5 and CD3⁺/CD30⁺ cells. *EBV-positive cases with in situ hybridization for EBER. (-) Cases for which EBER results were not available.

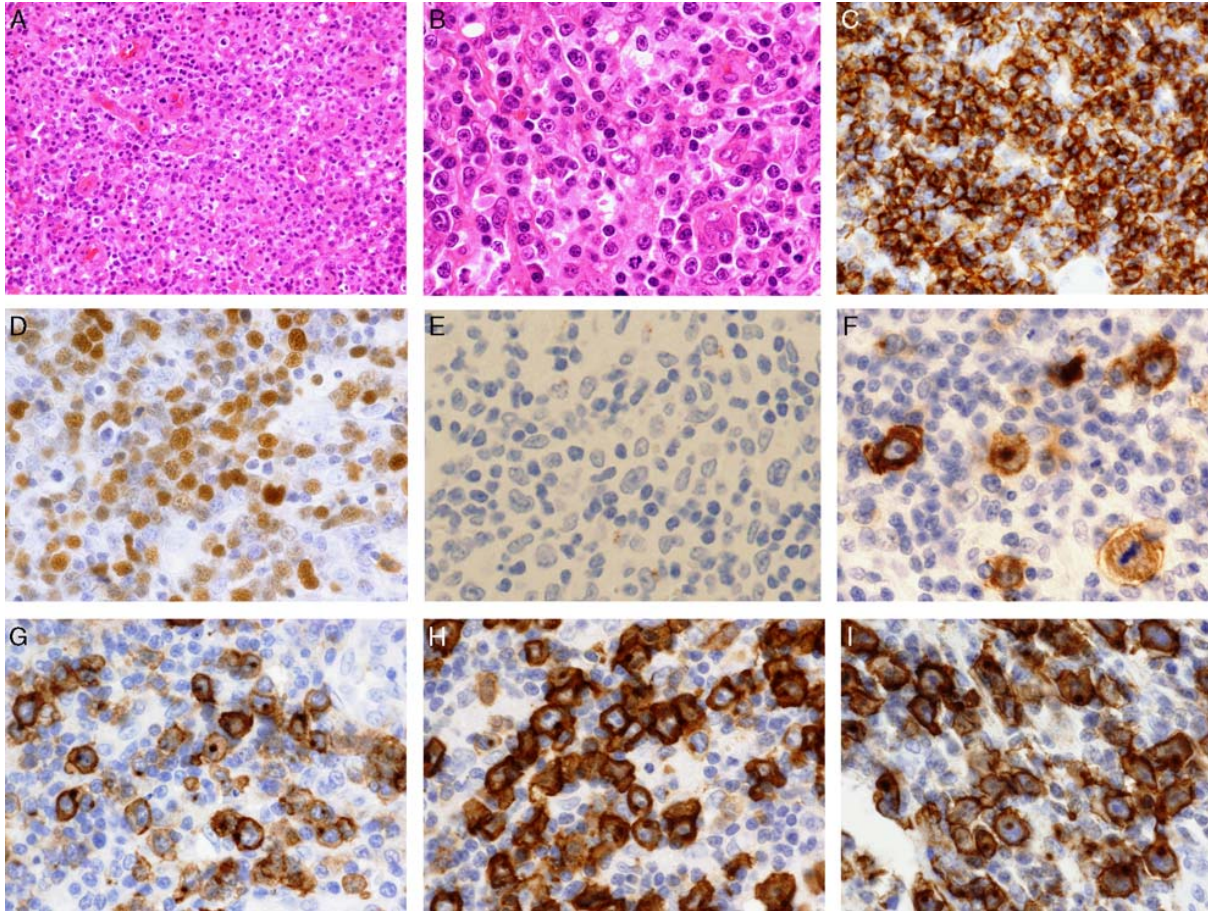


FIGURE 2. Heterogenous CD30 IHC expression in AITL. Representative examples of the CD30 protein expression in AITL (A, B: hematoxylin and eosin; C, D, E, F, G, H: CD30 immunostaining by immunoperoxidase and DAB). A–D, AITL composed of a polymorphous inflammatory background with high endothelium venule proliferation (A), and large Hodgkin Reed-Sternberg-like cells (B), with a prominent expansion of PD1-positive cells (C) and EBV-positive large and small cells (D). E–I, AITL with different percentages of CD30⁺ cells: 0% (E), 12% (F), 20% (G), 40% (H), and 65% (I).

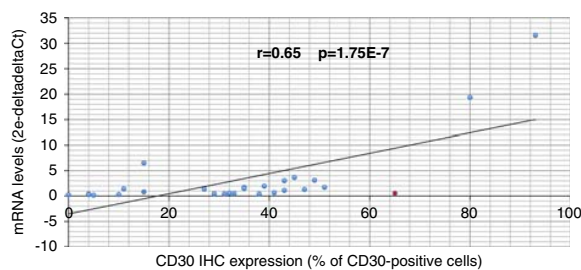


FIGURE 3. Correlation between CD30 IHC expression and mRNA levels assessed by qRT-PCR. Horizontal axis shows CD30 IHC expression (percentage of CD30⁺ cells) for each of the 28 cases analyzed. The vertical axis shows mRNA levels. Red dot indicates the only case with significantly lower mRNA levels than IHC scores. CD30 IHC levels are moderately strongly correlated with mRNA levels ($r=0.65$, $P=1.75e-7$).

CD30 Expression in B and T Cells

CD30 expression was detected in B-cell and T-cell compartments. The PAX5/CD30 double staining confirmed the existence of PAX5⁺/CD30⁺ large B-cell blasts, as described in AITL.¹⁴ There were also a substantial number of PAX5⁺/CD30⁺ small cells (Figs. 4A–C); this has not previously been reported in the literature. In total, 45/46 cases with CD30 IHC expression had CD30⁺ B cells (PAX5⁺/CD30⁺ cells), the proportions varying between 0.5% and 71% (mean, 21%).

We used both CD3 and LEF1 staining to demonstrate the coexpression of T-cell markers with CD30. LEF1 (transcription factor lymphoid enhancer binding factor-1) is a transcription factor crucial to the proliferation and survival of pro-B cells in mice. LEF1 expression is restricted to T-cell and B-cell precursors;

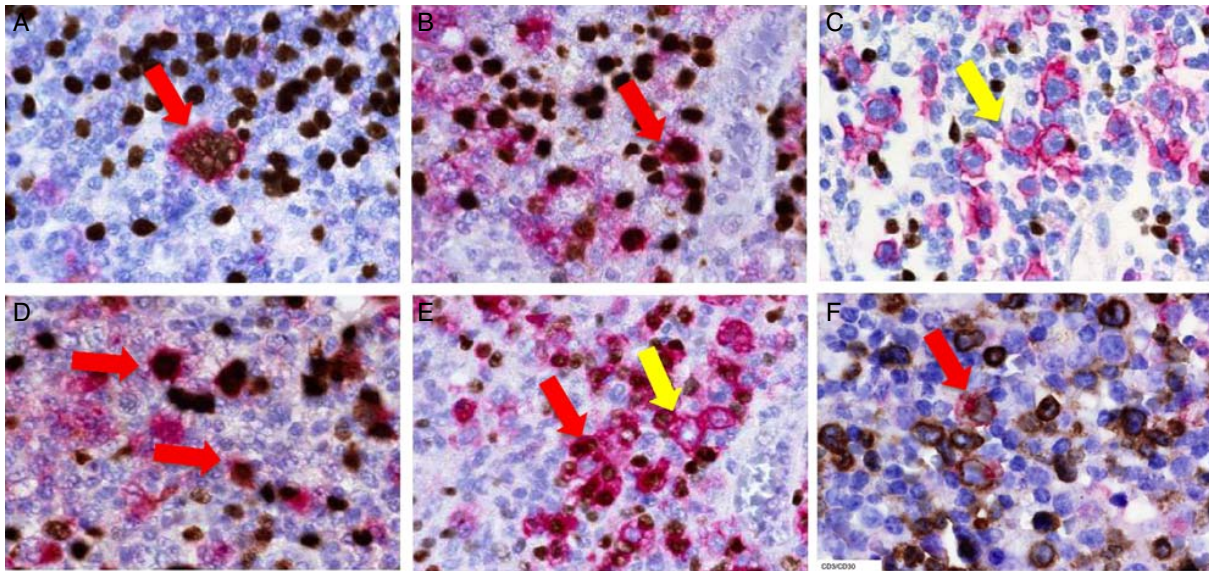


FIGURE 4. CD30-positive cells exhibit B and T phenotypes. A–C, Double PAX5/CD30 immunostaining in an AITL sample by immunoperoxidase, permanent red chromogen for CD30, and DAB for PAX5, respectively. CD30⁺ cells exhibit Hodgkin Reed-Sternberg–like histologic features (red arrow), and a B phenotype, with a weaker PAX5 stain than the surrounding mature B cells. Some small CD30⁺ cells are also intensely PAX5 positive (B, red arrow) and PAX5 negative (C, yellow arrow). D and E, Double LEF1/CD30 immunostaining in an AITL sample by immunoperoxidase, permanent red chromogen for CD30, and DAB for LEF1, respectively. Small CD30⁺ cells show nuclear LEF1 staining (D, red arrows), whereas large CD30⁺ cells are LEF1 negative in that case (E, yellow arrow). F, Double CD3/CD30 immunostaining in an AITL sample by immunoperoxidase, permanent red chromogen for CD30, and DAB for CD3, respectively. Small CD30⁺ cells coexpress membrane CD3 (red arrow).

expression is turned off at later stages of B-lineage development.¹⁵ CD3/CD30 and LEF1/CD30 double staining confirmed the pattern observed with PAX5/CD30 (Fig. 4). CD30-positive large B cells also showed weak LEF1 positivity, which was not taken into account by our analysis. CD3/CD30 staining confirmed that small LEF1⁺/CD30⁺ cells were T cells. These were positive in all the LEF1/CD30-positive cases for which results were available from both stainings (34/45 cases). Thus, 42 cases contained CD30⁺ T cells (93%), with a mean expression of 11% (range, 0% to 40%).

Forty-one cases with CD30 IHC expression (86.96%) simultaneously showed PAX5⁺/CD30⁺ B cells and LEF1⁺/CD30⁺ T cells. A single case (no. 17) featured only CD30⁺ T cells with no PAX5⁺/CD30⁺ cells, and 4 cases (nos. 7, 14, 18, and 46) had only CD30-positive B cells (Fig. 1B).

These results indicate that heterogenous expression of CD30 in AITL and PTCL-NOS is explained not only by the presence of large B blasts and small mature B cells but also by T cells with atypical cytology and CD30 expression, as may be detected in most PTCL cases, irrespective of the CD30 IHC score. Morphologic features and architectural distribution of the CD30-positive T cells strongly suggested their tumoral nature.

AITLs Show EBV-positive B and T Cells

In situ hybridization of 46 cases revealed 25 of them to be positive (3 PTCL-NOSs and 22 AITLs) and 21 to be

negative (3 PTCL-NOSs and 18 AITLs) for EBV. PAX5/CD30 double stainings and EBV results were obtained from 41 cases. Large B-cell blasts were found in the EBV-positive and EBV-negative cases; thus 24 cases (60%) of those with PAX5⁺/CD30⁺ cells were EBV positive, and 17 cases (41%) were EBV negative (Fig. 1B). No significant differences were found between the CD30 IHC scores of the 2 subgroups (33% vs. 30% of CD30⁺ in EBV-positive and EBV-negative cases, respectively; $P = 0.68$). There were several small PAX5⁺/CD30⁺ B cells, which may have corresponded to the small EBV-positive cells observed with EBV stains.

EBV-positive T cells were also observed, as seen in case 6, which was an EBV-positive case with only CD30-positive T cells. LEF1/CD30 and EBV results were available from 36/40 cases with CD30-positive T cells. Forty percent (14 cases) were EBV negative, and 60% (21 cases) were EBV positive.

DISCUSSION

CD30 Heterogenous Expression in AITL Is Correlated With GEP Data and mRNA Levels

In our study, GEP analysis of frozen tumor samples showed a continuous spectrum of *TNFRSF8*, suggesting that almost all AITLs and PTCL-NOSs may express CD30, even if this is not detectable at the protein level. These results are in accordance with those obtained by

CD30 IHC staining and qRT-PCR in another cohort comprising 45 AITL and 10 PTCL cases, in which a continuous spectrum of CD30 IHC expression was also observed.⁹ Most (90%) of the samples showed CD30 IHC expression to some degree, ranging from 0% to 95% of the cells (mean, 27%), including 3 AITL patients and 2 PTCL-NOS patients with undetectable CD30 expression (10%) and 4 AITL cases and 3 PTCL-NOS cases with high levels (> 50% of the tumoral cells) of CD30 expression (14%). qRT-PCR experiments demonstrated a moderate correlation between CD30 IHC expression and mRNA levels ($r = 0.65$, $P = 1.75e-7$), in accordance with the results of Bossard et al.¹⁴

CD30 IHC results are consistent with those previously published, indicating the wide spectrum of CD30 expression in PTCL.^{2,8,16} Karube et al¹⁶ analyzed 319 patients with T-cell/NK-cell lymphomas and found levels of CD30 expression ranging from 0% to 64% in a variety of T-cell lymphomas, including AITL and PTCL-NOS. Rodríguez-Pinilla et al¹⁷ studied a series of 89 AITLs and 104 PTCL-NOSs, in which 24% of the cases expressed CD30; 17 AITL and 19 PTCL-NOS cases had low levels of CD30 expression, whereas 1 AITL and 10 PTCL-NOS cases showed very high levels (> 80% of the tumoral and microenvironmental cells) of CD30 expression.

In the study performed by Horwitz et al⁸ on a series of CD30-positive PTCLs, CD30 IHC expression ranged from 0% to 95%. The series included 6 patients (17%) with undetectable CD30 expression per central laboratory assessment who nevertheless responded to anti-CD30 therapy. These results suggested a potential limitation of IHC for detecting very low levels of CD30 expression, consistent with the previously published findings of Krathen et al¹⁸ from a mycosis fungoides trial in which response to anti-CD30 therapy was unrelated to the level of expression of the molecule, as detected by IHC. Nevertheless, the methods of CD30 assessment were vaguely described by Horwitz et al,⁸ stating that only neoplastic cells were assessed, and the cases in which CD30 expression was not detected in routine IHC were shown to be CD30⁺ by quantitative image analysis (Nuance imaging system, CRi).¹⁸ The limitation of CD30 IHC determinations for assessing low-level CD30 expression could explain the lack of correlation between the response to BV and CD30 expression reported in the 2 studies.^{4,18} Differential expression of CD30 either by neoplastic or microenvironmental cells could also explain these results.

However, Bossard et al¹⁴ recently demonstrated a close correlation between CD30 IHC detection and mRNA levels. In their series of 238 PTCLs, CD30 IHC scores were significantly associated with CD30 mRNA levels ($r = 0.8$). CD30 mRNA expression was found to be bimodal, allowing 2 PTCL groups to be identified, with low and high levels of CD30 mRNA (threshold 50% of tumoral CD30⁺ cells). In our study, 86% (44/51) of the cases showed CD30 IHC expression in < 50% of the cells compared with 95% of the cases in the study by Bossard and colleagues (92/97), and 14% (7/51) showed high levels of CD30 IHC expression (compared with 5%). Our

results support Bossard's hypothesis, demonstrating a close correlation between CD30 IHC expression and mRNA levels.

Heterogenous Expression of CD30 in AITL May Be Explained by the Coexistence of CD30⁺ B and T Cells

In our series, 86.96% of the cases showed CD30 expression in both B (PAX5-positive) and T (CD3/LEF1-positive) cells, which may explain the CD30 heterogeneity in AITLs and PTCL-NOSs. One case featured only CD3/LEF1⁺/CD30⁺ cells, and 4 cases showed only PAX5⁺/CD30⁺ cells. Previous studies have tried to demonstrate CD30 expression in T cells: Rodríguez-Pinilla et al¹⁷ found that CD30-negative cases expressed both TCR- β F1 and CD3 in the membrane, whereas CD30⁺ cases expressed these 2 markers in the cytoplasm; Sabattini et al¹⁹ reported the existence of CD30⁺ neoplastic T cells in AITL; and Bossard et al¹⁴ demonstrated that non-anaplastic PTCLs with a higher proportion of large cell tumors were associated with higher IHC scores and CD30 intensity, whereas small cell PTCLs were more likely to be CD30 negative.¹⁴ Here, we confirm with CD3 and LEF1/CD30 double staining the existence of CD30⁺ T cells.

Considering the results of recent studies in which responses in CD30-targeting therapies are observed in patients with undetectable levels of CD30 protein, the mechanisms determining BV antitumor activity should be further studied. It is possible that the drug diffuses from the targeted CD30 reactive cells to the tumor microenvironment and causes cytotoxicity within the tumoral microenvironment.²⁰

In conclusion, our results show that all AITL and PTCL-NOS cases express *TNFRSF8*, even if CD30 is undetectable by IHC. We demonstrate a moderate correlation between CD30 IHC levels and mRNA levels, supporting findings recently published by Bossard et al,¹⁴ and we describe the coexistence of CD30⁺ B and T cells in AITLs. Our findings also indicate that CD30 IHC expression is highly variable in AITL and PTCL-NOS cases and can be consistently measured by IHC or RT-PCR. CD30 is expressed in large B-cell blasts and small EBV-positive B cells and in neoplastic CD30-positive T cells that can be detected in all PTCL cases, irrespective of the CD30 IHC score. AITL and PTCL-NOS patients may, therefore, be potential candidates for CD30-targeting strategies. CD30 IHC assessment is a potentially useful routine clinical tool for stratifying patients who might benefit from CD30-targeting treatment.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors are indebted to the patients who have contributed to this study. The authors especially wish to thank the Tissue Biobank of the Hospital Universitario Marqués de Valdecilla for clinical data and sample collection, and all the technical staff of the Pathology Laboratory in Hospital Universitario Marqués de Valdecilla for technical support. The authors also thank Helena Pisonero, Nuria García, Rebeca Madureiro, and Soraya Curiel del Olmo of

the Instituto de Investigación Marqués de Valdecilla (IDIVAL) for their exceptional work in performing experiments and collecting data.

REFERENCES

1. Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, et al. WHO classification of tumours and haematopoietic and lymphoid tissues. Lyon, France: IARC; 2008:269–320.
2. Mak V, Hamm J, Chhanabhai M, et al. Survival of patients with peripheral T-cell lymphoma after first relapse or progression: spectrum of disease and rare long-term survivors. *J Clin Oncol*. 2013;31:1970–1976.
3. O'Connor OA, Pro B, Pinter-Brown L, et al. Pralatrexate in patients with relapsed or refractory peripheral T-cell lymphoma: results from the pivotal PROPEL study. *J Clin Oncol*. 2011;29:1182–1189.
4. Coiffier B, Pro B, Prince HM, et al. Results from a pivotal, open-label, phase II study of romidepsin in relapsed or refractory peripheral T-cell lymphoma after prior systemic therapy. *J Clin Oncol*. 2012;30:631–636.
5. Pro B, Advani R, Brice P, et al. Brentuximab vedotin (SGN-35) in patients with relapsed or refractory systemic anaplastic large-cell lymphoma: results of a phase II study. *J Clin Oncol*. 2012;30:2190–2196.
6. Dürkop H, Latza U, Hummel M, et al. Molecular cloning and expression of a new member of the nerve growth factor receptor family that is characteristic for Hodgkin's disease. *Cell*. 1992;68:421–427.
7. Francisco JA, Cerveny CG, Meyer DL, et al. cAC10-vcMMAE, an anti-CD30-monomethyl auristatin E conjugate with potent and selective antitumor activity. *Blood*. 2003;102:1458–1465.
8. Horwitz SM, Advani RH, Bartlett NL, et al. Objective responses in relapsed T-cell lymphomas with single-agent brentuximab vedotin. *Blood*. 2014;123:3095–3100.
9. Odqvist L, Sánchez-Beato M, Montes-Moreno S, et al. NIK controls classical and alternative NF-κB activation and is necessary for the survival of human T-cell lymphoma cells. *Clin Cancer Res*. 2013;19:2319–2330.
10. Gutiérrez-García G, García-Herrera A, Cardesa T, et al. Comparison of four prognostic scores in peripheral T-cell lymphoma. *Ann Oncol*. 2011;22:397–404.
11. Gallamini A, Stelitano C, Calvi R, et al. Peripheral T-cell lymphoma unspecified (PTCL-U): a new prognostic model from a retrospective multicentric clinical study. *Blood*. 2004;103:2474–2479.
12. Went P, Agostinelli C, Gallamini A, et al. Marker expression in peripheral T-cell lymphoma: a proposed clinical-pathologic prognostic score. *J Clin Oncol*. 2006;24:2472–2479.
13. Weisenburger DD, Savage KJ, Harris NL, et al. Peripheral T-cell lymphoma, not otherwise specified: a report of 340 cases from the International Peripheral T-cell Lymphoma Project. *Blood*. 2011;117:3402–3408.
14. Bossard C, Dobay MP, Parrens M, et al. Immunohistochemistry as a valuable tool to assess CD30 expression in peripheral T-cell lymphomas: high correlation with mRNA levels. *Blood*. 2014;124:2983–2986.
15. Reya T, O'Riordan M, Okamura R, et al. Wnt signaling regulates B lymphocyte proliferation through a LEF-1 dependent mechanism. *Immunity*. 2000;13:15–24.
16. Karube K, Aoki R, Nomura Y, et al. Usefulness of flow cytometry for differential diagnosis of precursor and peripheral T-cell and NK-cell lymphomas: analysis of 490 cases. *Pathol Int*. 2008;58:89–97.
17. Rodríguez-Pinilla SM, Sánchez ME, Rodríguez J, et al. Loss of TCR-beta F1 and/or EZRIN expression is associated with unfavorable prognosis in nodal peripheral T-cell lymphomas. *Blood Cancer J*. 2013;3:e111:1–8.
18. Krathen M, Sundram U, Bashey S. Brentuximab vedotin demonstrates significant clinical activity in relapsed or refractory mycosis fungoides with variable CD30 expression (abstract). *Blood*. 2012:797.
19. Sabattini E, Pizzi M, Tabanelli V, et al. CD30 expression in peripheral T-cell lymphomas. *Haematologica*. 2013;98:e81–e82.
20. Vaklavas C, Forero-Torres A. Safety and efficacy of brentuximab vedotin in patients with Hodgkin lymphoma or systemic anaplastic large cell lymphoma. *Ther Adv Hematol*. 2012;3:209–225.

Mutated JAK kinases and deregulated STAT activity are potential therapeutic targets in cutaneous T-cell lymphoma

The malignant mechanisms that control the development of cutaneous T-cell lymphoma (CTCL) are starting to be identified. Recent evidence suggests that disturbances in specific intracellular signaling pathways, such as RAS-MAPK, TCR-PLCG1-NFAT and JAK-STAT, can play an essential role in the pathogenesis of CTCL.^{1,2} Our group previously reported a network of somatic mutations affecting genes with potential to affect critical T-cell signaling pathways in CTCL patients.¹ As part of our findings we detected a number of mutations potentially affecting JAK/STAT signaling. These findings were recently confirmed by an independent group, suggesting that mutations in this pathway may contribute as disease mechanisms in CTCL.³ Deregulated JAK/STAT signaling is involved in many types of cancer. In fact, somatically acquired genetic alterations of *JAK* or *STAT* genes that induce aberrant activation of downstream signaling, via STAT phosphorylation, have been reported in some human hematologic malignancies including T-cell lymphomas.^{4,5} We decided to explore JAK/STAT signaling as part of an intricate network of malignant signaling that controls the pathogenesis of CTCL, on the basis of the following evidence: (i) we had detected mutations in

the pseudokinase domain of *JAK1* and *JAK3* in two of 11 patients and one cell line; (ii) we had also found several mutations that can directly (i.e., IL6S/T) or indirectly (i.e., TRAF6, RELB and CARD11) activate JAK/STAT signaling; and (iii) activated STAT3 had been detected in a large proportion of patients with advanced CTCL.^{6,7}

To explore the mutational status of *JAK* genes in a larger cohort of human CTCL patients' samples and cell lines, two independent state-of-the-art ultrasequencing approaches were used: a targeted gene-enrichment kit (HaloPlex) coupled to Ion-PGM (Life Technologies) sequencing, and a specific polymerase chain reaction-based amplification protocol targeting the pseudokinase domains of *JAK1*, *JAK2* and *JAK3* genes (hereafter, referred to as PsTKd-PCR), followed by specific indexing and sequencing with MiSeq (Illumina; see the *Online Supplementary Methods* for details). These are two highly sensitive methods that can enable the detection of mutations even present at low frequencies in neoplastic cells or in minority clones which may be found in CTCL samples. Thus, taken together, the data from our series (including those already described by Vaqué *et al.*)¹ enabled us to detect and validate somatic mutations in either *JAK1* or *JAK3* genes in up to seven patients and one cell line (Table 1) from a total of 46 CTCL patients (clinical data described in *Online Supplementary Table S1*) and two cell lines. A recurrent mutation, JAK1-R659C, was found in two different samples, from patients 3 and 4 (Table 1). Most of the mutations were located within

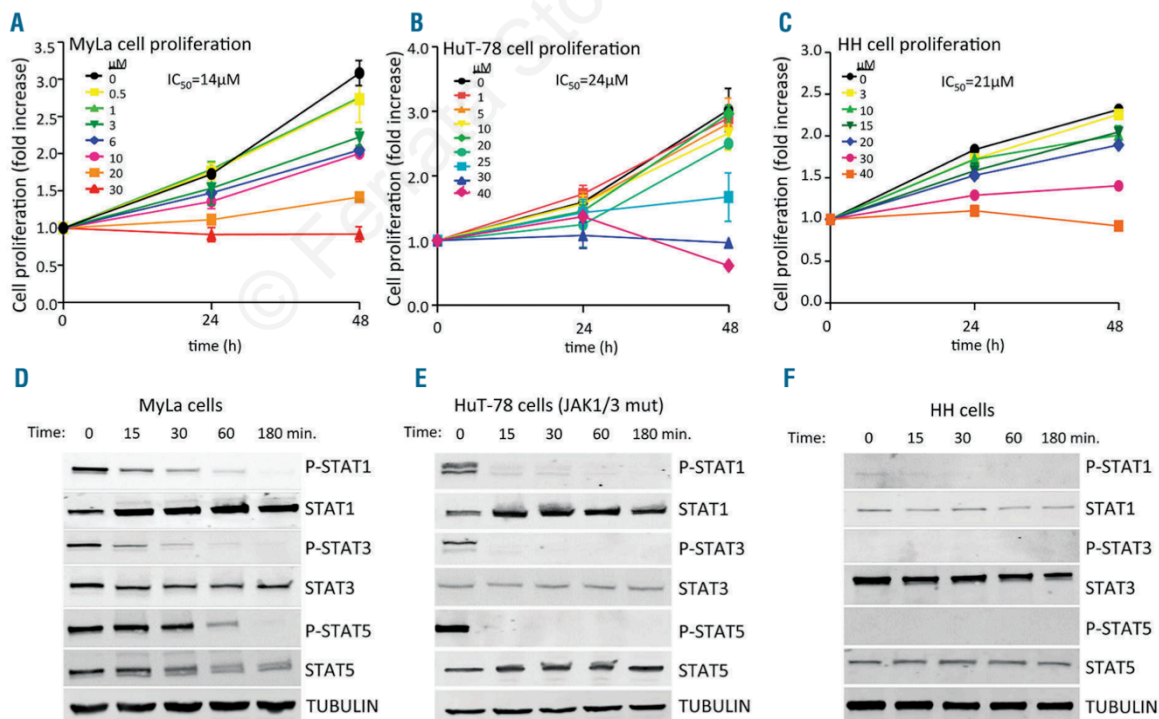


Figure 1. Treatment with ruxitinib inhibits CTCL cell proliferation and JAK/STAT activity in CTCL cell lines. Cell proliferation assay in (A) MyLa (B) HuT-78 and (C) HH cells incubated for 0, 24, or 48 h, using DMSO (control) or the indicated amount of INCB018424 (μM). $N=3$; error bars indicate SEM. (D, E) Analysis of basal STAT-1, 3 and 5 activity by western blot using total cell lysates from previously starved CTCL cell lines incubated for the indicated times with a specific JAK inhibitor (INCB018424) using the specific IC_{50} concentrations in each case.

Table 1. Somatic mutations of JAK in samples from CTCL patients and cell lines.

| Case | Gene | Position (hg19) | Ref/Alt | AA change | Pos. protein | Consequence | Primary analysis | Depth | Var. Freq. | Reference | Cosmic |
|--------|------|-----------------|--------------|-----------|--------------|------------------|------------------|-------|------------|--|---------|
| 1 | JAK1 | 1:65312365 | A/T | Y/N | 652 | Missense | HALOPLEX | 1861 | 0,4 | This study | No data |
| 2 | JAK1 | 1:65313323 | G/C | L/M | 597 | Missense | HALOPLEX | 1707 | 0,5 | This study | No data |
| 3 | JAK1 | 1:65312344 | G/A | R/C | 659 | Missense | PsTKd-PCR | 3565 | 0,3 | Vaqué JP <i>et al.</i> ¹ + this study | Cosmic |
| 7 | JAK3 | 19:17945496 | G/A | P/L | 745 | Missense | PsTKd-PCR | 295 | 0,1 | This study | No data |
| 8 | JAK3 | 19:17948745 | ATGCAGTTCT/A | KNCM/M | 563_565 | INDEL (deletion) | HALOPLEX | 995 | 0,2 | Kiel MJ <i>et al.</i> ⁴ + this study | Cosmic |
| 8 | JAK3 | 19:17948760 | T/G | K/T | 561 | Missense | HALOPLEX | 1552 | 0,1 | This study | No data |
| 4 | JAK1 | 1:65312344 | G/A | R/C | 659 | Missense | SURESELECT | N/A | N/A | Vaqué JP <i>et al.</i> ¹ | Cosmic |
| 9 | JAK3 | 19:17949108 | C/T | M/I | 511 | Missense | SURESELECT | N/A | N/A | Vaqué JP <i>et al.</i> ⁴ | Cosmic |
| HuT-78 | JAK1 | 1:65312358 | T/A | Y/F | 654 | Missense | PsTKd-PCR | 4794 | 0,3 | Vaqué JP <i>et al.</i> ¹ + this study | Cosmic |
| HuT-78 | JAK3 | 19:17948006 | G/A | AV | 573 | Missense | PsTKd-PCR | 3308 | 1,0 | Kiel MJ <i>et al.</i> ⁴ + this study | Cosmic |

Ref/Alt: reference/alters base; AA change: amino acid change; Pos. protein: number of amino acid changed in the protein; PsTKd-PCR: specific pseudokinase domain Polymerase chain reaction based amplification protocol; Depth: total number of reads in each position; Var. Freq.: frequency of the mutated read; COSMIC: mutations can be found in the COSMIC database.

We also studied the cytotoxic effects induced by JAK inhibition, using annexin V/7AAD binding and PARP cleavage, with flow activated cell sorting (FACS) and western blot analysis, respectively. We found a moderate effect on cell death (Figure 2A-F). However, we found that incubation with INCB018424 led to a marked inhibition of cell proliferation by a mechanism that impinges on the control of DNA synthesis, as shown by the FACS analyses illustrated in Figure 2G-I. Thus, blocking JAK/STAT signaling appears to target CTCL mechanisms of malignant cell growth more efficiently than occurs by simply inducing cytotoxic effects.

In summary, we show that *JAK1* and *JAK3* somatic mutations can contribute to deregulated JAK/STAT signaling in CTCL. Our study also provides new information that could help the development of new tools for molecular diagnosis (i.e., JAK mutations or STAT activation) as well as novel targets for therapy using specific JAK inhibitors.

Cristina Pérez,¹ Julia González-Rincón,² Arantza Onaindia,³ Carmen Almaráz,¹ Nuria García-Díaz,¹ Helena Pisonero,¹ Soraya Curiel-Olmo,¹ Sagrario Gómez,³ Laura Cereceda,¹ Rebeca Madureira,¹ Mercedes Hospital,³ Dolores Suárez-Massa,³ José L. Rodríguez-Peralto,⁶ Concepción Postigo,⁷ Alicia Leon-Castillo,³ Carmen González-Vela,³ Nerea Martínez,¹ Pablo Ortiz-Romero,^{7*} Margarita Sánchez-Beato,^{2*} Miguel Á. Piris,^{1,3*} and José P. Vaqué^{1,3**}

¹Cancer Genomics Laboratory Instituto de Investigación Maques de Valdecilla, IDIVAL, Santander; ²Lymphoma Research Group (Medical Oncology Service) Oncohematology Area, Instituto Investigación Sanitaria Puerta de Hierro-Majadahonda (IDIPHIM), Madrid; ³Pathology Department, Hospital Universitario Marqués de Valdecilla, Santander; ⁴Dermatology Service, Hospital Universitario Puerta de Hierro-Majadahonda, Madrid; ⁵Pathology Department, Hospital Universitario Puerta de Hierro-Majadahonda, Madrid; ⁶Pathology Department, Institute i+12, Medical School, Universidad Complutense de Madrid; ⁷Dermatology Service, Institute i+12, Medical School, Universidad Complutense de Madrid; ⁸and Instituto de Biomedicina y Biotecnología de Cantabria, IBBTEC (CSIC, Universidad de

Cantabria), Departamento de Biología Molecular, Universidad de Cantabria, Santander, Spain

*Senior authors

**Corresponding author

Acknowledgments: we are indebted to the patients who contributed to this study. We especially thank José Revert and Carolina Santa Cruz from IDIVAL (Santander, Spain), and the staff members of the Biobank and the Pathology service at HUMV (Santander, Spain) for their exceptional work.

Funding: This work was supported by grants from the Instituto de Salud Carlos III of the Spanish Ministry of Economy and Competence (MINECO and RTIC) to MAP (SAF2013-47416-R and RD06/0020/0107-RD012/0036/0060) and from ISCIII-MINECO-AES-FEDER to JPV, MSB and POR (Plan Nacional I+D+I: 2012-2015-PI12/00357, 2011-2014-CP11/00018), and 2014-2017-FIS PI14/01784) and the Asociación Española Contra el Cáncer to MAP. CP is a recipient of a Sara Borrel contract from MINECO (CD13/00088). JG-R is a recipient of an iPFIS fellowship (IF114/00003) from ISCIII-MINECO-AES-FEDER (P.E.I+D+I 2013-2016). Salary support to SG was provided by CP11/00018, from ISCIII-MINECO-AES-FEDER (P.N.I+D+I 2008-2011). MSB currently holds a Miguel Servet contract (CP11/00018) from the ISCIII-MINECO-AES-FEDER (P.N.I+D+I 2008-2011), Spain. JPV is partially supported by SODERCAN and is now supported by a Ramón y Cajal research program (RYC-2013-14097).

Correspondence: vaquej@unican.es
doi:10.3324/haematol.2015.132837

Key words: JAK mutations, CTCL, ruxolitinib, JAK/STAT, targeted therapy, molecular diagnostics

Information on authorship, contributions, and financial & other disclosures was provided by the authors and is available with the online version of this article at www.haematologica.org.

References

- Vaqué JP, Gómez-López G, Monsálvez V, et al. PLCG1 mutations in cutaneous T-cell lymphomas. *Blood*. 2014;123(13):2034-2043.
- Kiessling MK, Oberholzer PA, Mondal C, et al. High-throughput mutation profiling of CTCL samples reveals KRAS and NRAS mutations sensitizing tumors toward inhibition of the RAS/RAF/MEK signaling cascade. *Blood*. 2011;117(8):2483-2440.

3. McGirt LY, Jia P, Baerenwald DA, et al. Whole genome sequencing reveals oncogenic mutations in mycosis fungoides. *Blood*. 2015;126(4):508-519.
4. Kiel MJ, Velusamy T, Rolland D, et al. Integrated genomic sequencing reveals mutational landscape of T-cell prolymphocytic leukemia. *Blood*. 2014;124(9):1460-1472.
5. Crescenzo R, Abate F, Lasorsa E, et al. Convergent mutations and kinase fusions lead to oncogenic STAT3 activation in anaplastic large cell lymphoma. *Cancer Cell*. 2015;27(4):516-532.
6. Netchiporouk E, Litvinov IV, Moreau L, Gilbert M, Sasseville D, Duvic M. Deregulation in STAT signaling is important for cutaneous T-cell lymphoma (CTCL) pathogenesis and cancer progression. *Cell Cycle*. 2014;13(21):3331-3335.
7. Sommer VH, Clemmensen OJ, Nielsen O, et al. In vivo activation of STAT3 in cutaneous T-cell lymphoma. Evidence for an anti-apoptotic function of STAT3. *Leukemia*. 2004;18(7):1288-1295.
8. Flex E, Petrangeli V, Stella L, et al. Somatic acquired JAK1 mutations in adult acute lymphoblastic leukemia. *J Exp Med*. 2008;205(4):751-758.
9. Xiang Z, Zhao Y, Mitaksov V, et al. Identification of somatic JAK1 mutations in patients with acute myeloid leukemia. *Blood*. 2008;111(9):4809-4812.
10. Bergmann AK, Schneppenheim S, Seifert M, et al. Recurrent mutation of JAK3 in T-cell prolymphocytic leukemia. *Genes Chromosomes Cancer*. 2014;53(4):309-316.
11. Lupardus PJ, Ultsch M, Wallweber H, Bir Kohli P, Johnson AR, Eigenbrot C. Structure of the pseudokinase-kinase domains from protein kinase TYK2 reveals a mechanism for Janus kinase (JAK) autoinhibition. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2014;111(22):8025-8030.

© Ferrata Storti Foundation

IV. RESUMEN Y DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS

Los resultados obtenidos a partir de los tres trabajos publicados permiten confirmar la hipótesis inicialmente establecida: las distintas entidades clínico-patológicas estudiadas presentan alteraciones moleculares y marcadores específicos, y por lo tanto la aplicación de terapias específicas.

- 1) El reordenamiento de 6p25.3 se encuentra presente en diferentes entidades clínico-patológicas que comparten rasgos histológicos.
- 2) La mayoría de los PTCLs expresan CD30 de forma variable, con una buena correlación con los niveles de mRNA, y son por lo tanto potenciales candidatos para el tratamiento con Brentuximab Vedotin.
- 3) Las mutaciones de *JAK* son frecuentes en los CTCLs, y potencialmente susceptibles de inhibición con ruxolitinib.

TRABAJO 1: Marcadores histológicos y moleculares que permiten el diagnóstico diferencial entre el Linfoma Anaplásico de Células grandes cutáneo primario y la afectación cutánea por un Linfoma Anaplásico sistémico

Los desórdenes linfoproliferativos cutáneos primarios CD30+ comprenden un grupo de entidades con diferente significado pronóstico y presentación clínica, entre los cuales se incluyen la Papulosis linfomatoide (LyP) y el Linfoma Anaplásico primario-cutáneo (cALCL), cuyo diagnóstico diferencial puede ser dificultoso debido al solapamiento de las características histológicas que estas entidades presentan.

El cALCL se define como un linfoma de célula grande CD30-positivo, primariamente originado en la piel, con buen pronóstico y respuesta a la terapia excisional. Clínicamente, se presentan en adultos, en forma de nódulos únicos, ulcerados que pueden regresar parcialmente, aunque no se resuelven totalmente de forma espontánea, a diferencia de lo que ocurre en la LyP, caracterizada por la presencia de lesiones papulosas autolimitadas. Esta

entidad puede recidivar, y la diseminación sistémica se da hasta en el 10% de los casos, en los ganglios linfáticos regionales preferentemente (2).

El cALCL debe distinguirse del Linfoma anaplásico de célula grande sistémico (ALCLs) con afectación cutánea, que es una entidad diferente, con diferentes características citogenéticas, moleculares y pronósticas. El tratamiento del cALCL en caso de presentación en forma de nódulo único consiste en la excisión quirúrgica y/o radioterapia local, mientras que en caso de presentación multifocal, deben emplearse terapias sistémicas bien en monoterapia (metotrexato) o en combinación (CHOP). El pronóstico es excelente, remisiones espontáneas del 40% y remisiones completas del 90% en aquellos pacientes con afectación multifocal o sistémica y regímenes quimioterápicos (89). Sin embargo, los pacientes con ALCLs ALK- son tratados de entrada de la misma manera que los linfomas T agresivos, con regímenes basados en CHOP o en CHOP + etopósido, obteniendo tasas de supervivencia global a los tres años del 69% en comparación con el 89% en los casos ALK+ (90). En ocasiones estos pacientes se benefician del trasplante de médula ósea de progenitores hematopoyéticos, como muestran los resultados de ensayos clínicos en fase 2, en los cuales se evidencian supervivencias globales a los 5 años del 70% y supervivencias libres de progresión del 61%) (91).

Tabla 3. Características principales de los desórdenes linfoproliferativos CD30-positivos

| | Linfoma Anaplásico de Células Grandes Primario cutáneo | Linfoma Anaplásico sistémico de Células Grandes ALK-negativo | Papulosis linfomatoide con reordenamiento de 6p25.3 |
|----------------------|---|---|---|
| Presentación clínica | Nódulos únicos solitarios (>2 cm), frecuentemente ulcerados v con | Estadios avanzados (III ó IV) | Pequeñas lesiones pápulo-nodulares autoinvolutivas |
| | Lesiones multifocales en el 20% | | Ausencia de enfermedad diseminada |
| | Afectación ganglionar locorregional en el 10% | | |
| Tratamiento | Excisión ± radioterapia | Quimioterapia sistémica con CHOP, CHOP+etopósido, trasplante de progenitores hematopoyéticos frecuentemente | "Wait and see" |
| Pronóstico | Recidivas frecuentes | Supervivencia a los 5 años del 15-45%. | Regresión espontánea |
| | Pronóstico favorable: supervivencia del 90% a los 10 años. | | |

De esta manera, un problema clínico relevante es el diagnóstico diferencial entre la infiltración ganglionar secundaria por parte de un cALCL, y la afectación ganglionar inicial de un ALCLs, punto crítico hoy en día en la rutina diagnóstica.

A este respecto, el estudio del reordenamiento de 6p25.3 mediante FISH que afecta al locus *DUSP22-IRF4* FISH fue descrito recientemente como una herramienta de utilidad en la distinción de estos dos procesos(92, 93), identificándose en el 20-57% de los casos de cALCL, con una especificidad del 99% y un valor predictivo positivo del 90% (22). Esta translocación afecta al locus de *DUSP22* (*dual specificity phosphatase 22 promoter*) en 7q32.3, que se encuentra adyacente a *IRF4* (*multiple myeloma oncogene-1/interferon regulatory factor-4*), conduciendo a una disminución de la expresión de *DUSP22* y a una sobrerregulación de la expresión de *MIR29A* en el cromosoma 7q. Estudios posteriores han demostrado una alta frecuencia de esta translocación en linfomas anaplásicos sistémicos (93-95).

Ninguno de los estudios mencionados encontró diferencias morfológicas entre los casos de ALCL primario cutáneos o sistémicos con o sin presencia de esta traslocación. Sin embargo, nosotros describimos los casos de tres casos de pacientes con C-ALCL, con traslocaciones del locus que afecta a *DUSP22-IRF4*, todos ellos con una presentación clínica similar y características histológicas distintivas, e idénticas a las descritas en los casos de LyP descritos por Karai (34).

Los tres pacientes, dos varones y una mujer de edades comprendidas entre 49 y 69 años, presentaron lesiones nodulares y solitarias, de localización facial, de entre 0,6 y 3 cm de diámetro máximo, que fueron tratadas mediante excisión quirúrgica sin evidencia de recidivas ni diseminación a distancia tras un periodo máximo de 9 meses de seguimiento. La concurrencia de un proceso sistémico de tipo ALCLs ALK- fue excluida mediante el estudio clínico apropiado y pruebas de imagen en los tres pacientes.

Histológicamente, las tres lesiones presentaban un patrón bifásico caracterizado por un infiltrado dérmico nodular compuesto por células de gran tamaño, con núcleos abigarrados e hiper cromáticos, y presencia de abundantes células de tipo “hallmark” o en herradura, mitosis y apoptosis, además de un marcado componente epidermotrópico compuesto por

linfocitos atípicos de pequeño tamaño. Inmunohistoquímicamente, las células neoplásicas en ambos componentes, tanto dérmico como intraepidérmico, mostraban en los tres casos una intensa positividad par CD30, como exige la definición de esta entidad, negatividad para ALK y positividad para al menos un marcador T (TCR-bF y/CD3). Los estudios mediante FISH del locus *DUSP22-IRF4* localizado en 6p25.3 demostraron en los tres casos una señal anormal de separación o “break-apart”, indicando el reordenamiento de 6p25.3.

El patrón histológico bifásico presente en los casos de cALCL de este trabajo es idéntico al descrito en la serie de casos de LyP de Karai (23, 34). Así, el diagnóstico diferencial entre los casos de cALCL con reordenamiento de 6p25.3 y este nuevo tipo de LyP podría realizarse únicamente de forma clínica, al caracterizarse la LyP por la presentación de pápulas múltiples autolimitadas y autoinvolutivas, por oposición a las masa tumorales del cALCL, que deben ser tratadas mediante escisión quirúrgica y/radioterapia.

De esta forma, en este estudio recogemos tres casos de biopsias cutáneas de que muestran rasgos histológicos y fenotípicos de desórdenes T linfoproliferativos CD30-positivos, con rasgos clínicos de cALCL, y un patrón histológico bifásico con un infiltrado intraepidérmico de tipo reticulosis pagetoide y un infiltrado dérmico compuesto por células de gran tamaño., previamente descrito en los casos de LyP con reordenamiento de 6p25.3 (34).

La presencia del reordenamiento de 6p25.3 se produce en diferentes tipos de de desórdenes linfoproliferativos, como se muestra en la tabla 4.

Tabla 4. Incidencia de la traslocación *DUSP22-IRF4* translocation en diferentes tipos de desórdenes T linfoproliferativos.

| Estudio | S-ALCL | C-ALCL | LyP |
|---------------------------------------|---------------|---------------|---------------|
| Feldman <i>et al</i> (93) | 1/23 | 8/14 (57%) | No estudiados |
| Pham-Ledard <i>et al.</i> (37) | No estudiados | 6/23 (26%) | 0/7 |
| Wada <i>et al.</i> (22) | 0/7 | 9/45 (20%) | 1/32 (3%) |
| Karai <i>et al.</i> (34) | No estudiados | No estudiados | 11/11 (100%) |
| Parrilla Castellar <i>et al.</i> (23) | 22/73 (30%) | No estudiados | No estudiados |
| Onaindia <i>et al.</i> (96) | No estudiados | 3/3 (100%) | No estudiados |

S-ALCL, Linfoma anaplásico de células grandes sistémico; C-ALCL, Linfoma anaplásico de células grandes primario cutáneo; LyP, Papulosis Linfomatoide.

Feldman (95) describió en el año 2011 este reordenamiento como la primera translocación recurrente descrita el ALCLs ALK-, mediante “Next Generation Sequencing”, identificando t(6;7)(p25.3;q32.3) que lleva a la fusión de *DUSP22* en 6p25.3 y *FRA7H* en 7q32.3 (confirmada por FISH) en el 23% de su serie, incluyendo en el 18% de los casos de ALCLs, ALK-. Encontró 12 casos de PTCLs con la traslocación *DUSP22-IRF4* en una cohorte de 155 casos (8%), así como en uno de los 23 casos de ALCLs, ALK- y 14 de los cALCLs (57%)(93); el grupo de Pham-Ledard (37) identificó esta alteración en el 26% de su serie de cALCL, y el grupo de Wada (22) en el 5% de su serie de 182 pacientes, entre ellos 9 casos cALCL (20%) y en uno de los 32 casos de LyP (3%).

Vasmatzis(97) describió en el año 2012 la presencia de reordenamientos en *TP63* inv(3)(q26q28), afectando a *TP63* y *TBL1XR1* (63.6%), mutuamente excluyentes con el reordenamiento de ALK, y asociados con un peor pronóstico con respecto a otros PTCLs (17.9 vs 33.4 meses). Recientemente, Parilla-Castelar (23) encontró reordenamientos de *DUSP22-IRF4*, hasta en el 30% de ALCLs-ALK-, demostrando la asociación de la traslocación que afecta al locus de *DUSP22* con una mayor supervivencia global (OS) con respecto a otros subtipos de ALCLs ALK- (OS del 90% a los 5 años con respecto al 85% en los ALCLs, ALK+, 42% en los ALCL triple negativos, y el 17% en aquellos con reordenamiento de *TP63* (Figura 4).

En resumen, nuestros resultados confirman que la traslocación DUSP22-IRF4 puede presentarse en diferentes entidades clínico-patológicas como LyP, cALCL y ALCLs, ALK-. En los desórdenes linfoproliferativos primarios cutáneos el reordenamiento de 6p25.3 podría traducirse morfológicamente con este patrón bifásico característico, independientemente de su presentación clínica en forma de LyP o cALCL, constituyendo así un marcador histológico de esta alteración molecular. Un estudio más profundo de los procesos biológicos desencadenados por esta traslocación podría determinar las bases biológicas para la selección de terapias dirigidas.

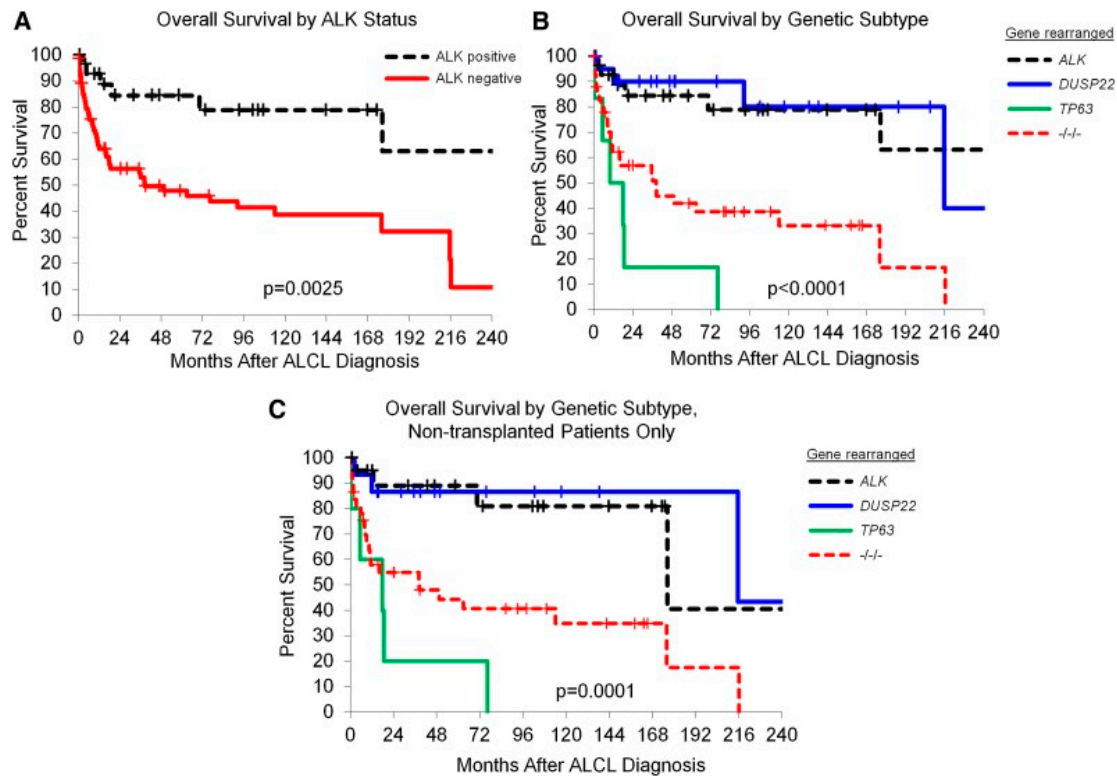


Figura 4. **Pronóstico de los pacientes con ALCL en función del subtipo genético.** (A) Supervivencia global de los pacientes con sALCL en función del estado de ALK (ALK positivos, N = 29; ALK negativos, N = 67). (B) Supervivencia global de los pacientes con sALCL, estratificados en función de la presencia de reordenamientos de *ALK* (N = 29), *DUSP22* (N = 21), *TP63* (N = 6). *-/-*, casos triple-negativos sin ninguno de los reordenamientos mencionados (N = 40). (C) Supervivencia global de los pacientes con sALCL que no fueron sometidos a transplante, en función de la presencia de reordenamientos de *ALK* (N = 21), *DUSP22* (N = 15), y *TP63* (N = 5). *-/-*, N = 34.

TRABAJO 2: Expresión de CD30 en Linfomas T angioinmunoblásticos y Linfomas T periféricos sin otra especificación y terapia dirigida con anti-CD30.

Los linfomas T Angioinmunoblásticos (AITL) y Linfomas T Periféricos sin otra especificación (PTCL-NOS), consituyen uno de los subtipos más frecuentes de PTCLs (hasta el 20%), y presentan un pronóstico ominoso con los tratamientos clásicos quimioterápicos combinados basados en la antraciclina, con tasas de respuesta del 39%-84% en pacientes recién diagnosticados, y 5,5 meses de supervivencia global en pacientes refractarios o en recaída *MAK*(10). Hasta la fecha, únicamente han sido aprobados tres fármacos por la FDA para el tratamiento de las recurrencias o PTCL refractarios: pralatrexato, romidepsina y brentuximab

vedotin (BV). Este último se reserva para aquellos pacientes con ALCL CD30-positivos refractarios o recidivados, con tasas de remisión completa de hasta el 86% (11-13).

Clásicamente se describe en el AITL la presencia de blastos B reactivos, EBV-positivos y CD30-positivos. CD30 es un receptor transmembrana de la familia del factor de necrosis tumoral, cuya expresión se encuentra limitada a las células B y T activadas de los tejidos linfoides normales (14). El interés en la expresión de CD30 por parte de este tumor deriva de la presencia de terapia dirigida contra CD30. Brentuximab Vedotin es un anticuerpo conjugado que comprende un dominio anti-CD30 y un agente citotóxico que se une a la superficie celular, induciendo la apoptosis de las células tumorales (15). El estudio clínico de Horwitz (98) en Linfomas B y T no anaplásicos, incluyendo 13 casos de AITL y 22 PTCL-NOS, evidenció tasas de respuesta de hasta el 54% (ORR) y 6,7 meses de supervivencia libre de enfermedad (PFS). Paradójicamente, el éxito de la terapia contra CD30 fue independiente en este estudio del nivel de expresión de CD30, determinado en un laboratorio de referencia, lo cual ha generado cierta controversia en cuanto a la utilidad de la inmunohistoquímica en la evaluación de la expresión proteica de CD30 en los linfomas T (98, 99).

Los datos de expresión génica en una primera cohorte de muestras de tejido congelado procedentes del banco de tumores del CNIO, compuesta por 19 PTCL-NOS, 15 AITL, y 3 ALCL, mostraron un espectro de expresión continua de *TNFRSF8*, sugiriendo que todos los PTCLs expresan CD30, si bien de forma variable. Estos datos fueron confirmados mediante el estudio inmunohistoquímico de la proteína en una segunda cohorte de muestras parafinadas (51 casos que comprendían 43 AITL y 8 PTCL-NOS). El 90% de la cohorte (46 casos) mostraban expresión de CD30 en un rango variable del 1 al 95% de las células (tumorales y micro-ambientales), con una expresión media del 27%. Cinco casos (10%) presentaron niveles de CD30 indetectables inmunohistoquímicamente, mientras que 7 casos mostraron expresión de CD30 en altos niveles (más del 50% de las células tumorales y microambientales). Los datos de expresión inmunohistoquímica presentaban una buena correlación con los niveles de mRNA en los experimentos de RT-PCR ($r = 0.65$, $P = 1.75e-7$).

La variabilidad en la expresión de CD30 se debe tanto a la presencia de CD30 en células B como en células T neoplásicas, un fenómeno observado en el 86,9% de los casos

de la serie, como pone de manifiesto el análisis de las dobles tinciones inmunohistoquímicas con PAX5/CD30 y CD3/LEF1/CD30, apoyando así los datos de Sabbattini (12), que describió la presencia de células T CD30+ con rasgos atípicos en AITL además de los característicos blastos B EBV positivos.

Nuestros resultados son consistentes con los datos publicados por otros grupos, que muestran el amplio rango de expresión de CD30 en los PTCLs. Karube (100) estudió 319 casos de pacientes con linfomas de células T/NK, encontrando niveles de expresión de CD30 de entre 0 a 64%, incluyendo casos de AITL y PTCL-NOS. Del mismo modo, Rodríguez Pinilla (101) estudió una serie de 89 AITLs y 104 PTCL-NOSs, encontrando expresión de CD30 en el 24%: 17 AITLs y 19 PTCL-NOSs presentaban bajos niveles de expresión de CD30, mientras que 10 casos de PTCL-NOS mostraban niveles de expresión en más del 80% de las células tumorales y del microambiente.

En el estudio de Horwitz (98) en una serie de PTCLs CD30+, la expresión de CD30 variaba entre 0 y 95%, incluyendo 6 pacientes (17%) con niveles indetectables de CD30, que sin embargo respondieron al tratamiento con terapia dirigida anti-CD30. Esto podría sugerir una posible limitación de los métodos inmunohistoquímicos a la hora de determinar correctamente los niveles e expresión de CD30, como ya había sido también mencionado previamente en el estudio de Krathen (99) en de una serie de Micosis Fungoides, en la cual la respuesta a la terapia era independiente de los niveles de CD30. También podría argumentarse la inconsistencia de las técnicas usadas por Horwitz, ya que los pacientes del ensayo fueron seleccionados después de inmunotinción positiva para CD30 en el laboratorio de diagnóstico primario.

Así Bossard (102) demostró recientemente una estrecha correlación entre los niveles de mRNA y proteína ($r=0.8$), como también apoyan nuestros resultados, por lo que la discordancia entre los niveles de CD30 y la respuesta a terapia observada en los dos estudios anteriores (98, 99, 103) podría deberse bien a una deficiente determinación de los niveles de expresión de CD30 o bien a la expresión de CD30 por células macrofágicas (104, 105), como algunos estudios han demostrado, o bien al mecanismo de acción de Brentuximab Vedotin.

Este punto se encuentra en estudio actualmente, dados los resultados recientemente publicados por Jacobsen (106), acerca de un ensayo en fase 2 que evaluaba la eficacia de brentuximab vedotin en LNH CD30+ refractarios o recidivados. Este estudio comprendía 49 pacientes con Linfomas B Difusos de Células Grandes, con tasas de respuesta del 44% incluyendo 8 casos (17%) con remisiones completas mantenidas hasta 16,6 meses. No se observó una correlación estadísticamente significativa entre los niveles de expresión de CD30 y la respuesta a la terapia, pero todos los pacientes con respuestas terapéuticas presentaban niveles de CD30 inmunohistoquímicos detectables y cuantificables mediante técnicas computerizadas.

En resumen nuestro estudio sugiere que los pacientes con PTCLs de tipo AITL y PTCLs son candidatos a recibir terapia dirigida con anti-CD30, y la selección de éstos y la graduación de la expresión de CD30 puede hacerse en la práctica clínica mediante el empleo de técnicas inmunohistoquímicas rutinarias.

TRABAJO 3: Marcadores subrogados de mutaciones específicas o perfiles de expresión que definen rutas activadas en Linfomas T periféricos y permiten la selección de terapia: Las mutaciones en las cinasas JAK y la disregulación de la actividad de STAT son potenciales dianas terapéuticas en los Linfomas T cutáneos (CTCLs)

La identificación de los mecanismos patogénicos que contribuyen al desarrollo de los CTCL vive una fase acelerada, como consecuencia del desarrollo de nuevas tecnologías en análisis molecular.

Estudios de secuenciación masiva realizados y publicados desde HUMV/IDIVAL mostraron alteraciones específicas en las vías de señalización de RAS-MAPK, TCR-PLCG1-NFAT y JAK-STAT jugando un papel clave en la patogénesis de los CTCLs (103, 107, 108). Como hallazgo interesante en el trabajo de Vaqué et al. (107), en el cual se describen mutaciones somáticas recurrentes en genes que afectan a la señalización vía TCR, también se detectaron un número

importante de mutaciones que afectan a la vía JAK/STAT de señalización, resultados también confirmados por un grupo independiente (109).

Las mutaciones somáticas adquiridas en *JAK* o *STAT* que inducen una activación de la cascada de activación *downstream* mediante la fosforilación de STAT han sido descritas en numerosas neoplasias hematológicas incluyendo linfomas T (110, 111). Datos como la identificación de múltiples mutaciones que pueden afectar directa (*IL6S/T*) o indirectamente (*TRAF6*, *RELB* y *CARD11*) a la activación de la vía de señalización JAK/STAT, así como la identificación de la activación de STAT3 en una amplia proporción de pacientes con CTCLs avanzados(50, 112) sugieren que las alteraciones en esta vía de señalización constituyen un importante mecanismo patogénico en los CTCLs(109).

En este trabajo nos propusimos estudiar la contribución de estas mutaciones en la patogénesis de los CTCLs, así como la correlación de estas alteraciones moleculares con la expresión de marcadores subrogados, que puedan contribuir a su diagnóstico. Por otra parte, estudiamos el efecto del tratamiento con inhibidores específicos en líneas celulares con estas mutaciones, de cara a su uso potencial en la clínica en el tratamiento de estos tumores.

Los resultados de este estudio permitieron la detección y validación de mutaciones somáticas en *JAK1* o *JAK3* en 7 pacientes y una línea celular de las 46 muestras de CTCLs, así como la identificación de una mutación recurrente en dos pacientes (*JAK1-R659C*). La mayoría de ellas se encontraban localizadas en el dominio pseudocinasa de las proteínas JAK, un hallazgo que es consistente con los resultados de otros grupos que han encontrado mutaciones somáticas en los mismos dominios de las cinasas *JAK1* y *JAK3* en leucemias prolinfocíticas y otros tipos de leucemias T, incluyendo diferentes tipos de neoplasias humanas (105, 108-110, 113).

Los resultados del experimentos del estudio de la inhibición de la actividad de JAK/STAT en un panel de líneas celulares de CTCL como Myla, HuT-78 (con mutaciones en *JAK1* y *JAK3* (110), y HH, mediante su incubación con dosis crecientes de ruxolitinib (*INCB018424*), inhibidor específico de JAK empleado actualmente de forma rutinaria en el tratamiento de las neoplasias mieloproliferativas (110), mostró una inhibición decreciente de la proliferación celular, además de una disminución en los niveles de fosforilación de STAT, lo cual evidenció una activación

basal la vía de señalización JAK/STAT en las células de CTCL, que además es altamente sensible al tratamiento con inhibidores de JAK. Esta disminución de la proliferación celular se debe a un mecanismo que afecta al control de la síntesis del DNA, más que a un efecto citotóxico, mostrando que el bloqueo de la actividad de la vía de señalización JAK/STAT se encuentra dirigido a los mecanismos de control de la proliferación de células neoplásicas en CTCL más que por un efecto citotóxico únicamente.

Los resultados de nuestro estudio son consistentes con los resultados de otros grupos que han encontrado mutaciones somáticas en los mismos dominios de las cinasas JAK1 y JAK3 (105, 108-110, 113). El dominio pseudocinasa de la proteína JAK presenta una actividad auto-inhibidora, encontrándose la proteína inactiva hasta que la dimerización del receptor estimula la transición a un estado activo (114). Además, para el estudio del estado mutacional de los genes de *JAK* se emplearon dos técnicas diferentes de ultrasecuenciación: secuenciación dirigida de tipo HaloPlex junto con secuenciación Ion-PGM (Life Technologies), y amplificación dirigida mediante PCR de los dominios pseudocinasa de los genes *JAK1*, *JAK2* y *JAK3* (denominados desde este momento como PsTKd-PCR), seguido por secuenciación dirigida con MiSeq (Illumina). Estos métodos permiten la detección de mutaciones poco frecuentes presentes en las células neoplásicas así como las presentes en los clones minoritarios en las muestras de CTCL de los 46 pacientes seleccionados, aportando gran validez y fiabilidad a nuestros resultados.

En resumen, los resultados de nuestro estudio validan la presencia de mutaciones descritas en CTCL que afectan a la vía JAK/STAT, mostrando que las mutaciones somáticas en JAK1 y JAK3 contribuyen a la disregulación de la señalización vía JAK/STAT en CTCL, conduciendo a un aumento de la proliferación y actividad de la vía de señalización JAK/STAT in vitro de las células de CTCL, mediante la fosforilación de STAT3. Esta proliferación y resistencia a la apoptosis puede ser inhibida mediante el empleo de ruxolitinib, un inhibidor selectivo de la ruta. Demostramos también una buena correlación entre la presencia de estas mutaciones específicas y la expresión de marcadores subrogados potencialmente detectable mediante inmunohistoquímica.

V. CONCLUSIONES

Conclusión general: La identificación de marcadores moleculares en linfomas T periféricos permite establecer variantes clinicopatológicas y establecer dianas terapéuticas.

Conclusiones específicas:

1. La traslocación *DUSP22-IRF4* puede presentarse en diferentes entidades clínico-patológicas como LyP, cALCL y ALCLs, ALK-. La presencia de esta translocación en cALCL se asocia con un patrón histológico bifásico característico: infiltración dérmica nodular compuesta por células grandes con células de tipo *hallmark*, mitosis y figuras apoptóticas, acompañado por un infiltrado epidermotrópico de tipo reticulosis pagetoide por parte de células pequeñas con rasgos atípicos, con intensa positividad de CD30 muy marcada en ambos componentes.

2. Todos los casos de AITL y PTCL-NOS expresan CD30 (*TNFRSF8*), de forma variable y muy heterogénea, demostrable mediante PCR cuantitativa o expresión génica aunque no siempre pueda ser detectado mediante inmunohistoquímica.

Los datos de expresión génica en una serie de 37 casos mostraron un espectro de expresión continua de *TNFRSF8*, sugiriendo que todos los PTCLs expresan niveles variables de CD30. Estos datos fueron confirmados en una segunda cohorte de 51 casos, en muestras de tejido parafinado: el 90% de los casos de la serie mostraron expresión inmunohistoquímica de CD30 en un rango variable de células tumorales y micro-ambientales (1-95%), con una expresión media del 27%. Cinco casos (10%) presentaron niveles de CD30 indetectables mediante inmunohistoquímica y 7 casos mostraron expresión de CD30 en más del 50% de las células. Por otra parte, los niveles de expresión inmunohistoquímica presentaban una buena correlación con los niveles de mRNA estudiados mediante PCR cuantitativa ($r = 0.65$, $P = 1.75e-7$).

El 93% de los casos de la serie presentaban células T CD30+, con signos citológicos

atípicos de malignidad, y el 86,9% mostraron la coexistencia de células B y T CD30+.

De esta forma, nuestros datos sugieren que la heterogeneidad en la expresión de CD30 en los PTCLs se debe a la coexistencia de células B y T CD30-positivas.

3. Los resultados de nuestro estudio validan la presencia de mutaciones somáticas previamente descritas en CTCLs en *JAK1* y *JAK3*, en 7 casos de una serie de 46 CTCL y una línea celular. Mostramos que estas mutaciones contribuyen a la disregulación de la señalización vía JAK/STAT en CTCL conduciendo a un aumento de la proliferación celular in vitro y aumento de la fosforilación de STAT3, susceptible de inhibición por inhibidores de la ruta como el ruxolitinib.

VI. PERSPECTIVAS

La identificación de marcadores moleculares contribuye al reconocimiento más preciso de entidades concretas o a la estratificación de pacientes de cara a su terapia. Los datos aquí generados suponen un discreto progreso, que requiere estudios funcionales y clínicos posteriores

TRASTORNOS CON REORDENAMIENTO DE 6p25.3

Actualmente, el reordenamiento de 6p25.3 constituye un marcador en diferentes tipos de neoplasias linfoides.

El estudio de esta translocación constituye así un marcador diagnóstico, pero no se conoce con detalle la relevancia biológica de esta alteración molecular, tan sólo el hecho de que conduce a una disminución de la expresión de *DUSP22* y a una sobreexpresión del *MIR29A*, localizado en el cromosoma 7q. Este campo debe ser desarrollado en el futuro mediante el diseño de estudios que exploren la relevancia biológica de esta alteración, las cascadas de señalización activadas, así como su potencial consideración como diana terapéutica. Fármacos específicos dirigidos a esta diana terapéutica, que actualmente se encuentran en desarrollo, podrían tener una aplicación clínica (37, 115).

De esta forma, en el futuro, la clasificación de los PTCLs podría incluir un grupo denominado como “trastornos linfoproliferativos definidos por la traslocación *DUSP22-IRF4*”, en base al diferente curso clínico y características pronósticas que presentan, y a la existencia de terapias dirigidas.

LINFOMAS T PERIFÉRICOS Y TERAPIA DIRIGIDA CON ANTICUERPOS MONOCLONALES E INMUNOTERAPIA

A pesar de la ausencia de correlación entre la expresión de CD30 y la respuesta a la terapia con Brentuximab evidenciada en determinados estudios (98), nuestros resultados muestran una buena correlación entre los niveles de expresión proteica y los niveles de mRNA, con lo cual estudios posteriores deberían ser llevados a cabo estudiando la correlación entre la

respuesta a la terapia antiCD30 y el nivel de expresión de CD30, determinado mediante IHQ o RT-PCR, medido tanto en células T como B.

Por otra parte, dadas las espectaculares respuestas del HL al tratamiento con Brentuximab y PD1, esta nueva combinación podría analizarse como primera línea de terapia en ensayos clínicos con HL o PTCLs.

INHIBICIÓN DE LA VÍA JAK/STAT EN CTCLs

Dado que nuestros resultados validan la presencia de mutaciones somáticas previamente descritas en CTCLs en *JAK1* y *JAK3*, en el futuro sería de interés el estudio de estas alteraciones en una serie mayor de pacientes, así como la puesta en marcha de estudios biológicos que permitan estudiar los mecanismos en esta vía de señalización. Sería de interés el desarrollo de ensayos clínicos que permitieran estudiar la correlación entre la presencia de estas mutaciones con diferentes parámetros clínicos, así como evaluar la sensibilidad a distintos inhibidores de la ruta de JAK/STAT

VII. PROCEDIMIENTOS Y MÉTODOS

A continuación se enumeran los pacientes, materiales y métodos utilizados en el desarrollo del cuerpo de esta tesis doctoral. Se puede encontrar el detalle en los tres manuscritos originales anexos.

1. MUESTRAS TISULARES

Todas las muestras tisulares de pacientes han sido colectadas del biobanco de tejidos del Hospital Universitario MARqués de Valdecilla en colaboración con otros hospitales y con el Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas (CNIO, Madrid). En el primer artículo se recogieron tres muestras parafinadas de pacientes con Linfomas Anaplásicos de Células Grandes primarios cutáneos procedentes del biobanco del HUMV; en el segundo se emplearon por una parte 37 muestras de tejido congelado de Linfomas T Periféricos procedentes del CNIO (19 PTCL-NOS, 15 AITL, y 3 ALCL), y una serie de 51 casos de muestras parafinadas del biobanco del HUMV/IDIVAL que comprendían 43 casos de AITL y 8 PTCL-NOS. Cuarenta-y-nueve muestras correspondían a ganglios linfáticos, una a un bazo con infiltración por parte de AITL, y otra a una muestra cutánea también con infiltración por AITL. En el tercer artículo se estudiaron muestras de 46 pacientes con diagnóstico de Micosis Fungoides (MF) y Síndrome de Sézary. Todos los criterios diagnósticos fueron revisados en base a la clasificación de la Organización Mundial de la Salud, y el diseño de los estudios fue aprobado por el Comité Ético de cada hospital, y revisado por el Comité Ético del HUMV. Los estudios se realizaron siguiendo los principios de la declaración de Helsinki.

2. LÍNEAS CELULARES

En el tercer trabajo se emplearon líneas celulares de linfomas T cutáneos procedentes de la “American Type Culture Collection” (ATCC, Rockville, MD, USA) HuT-78, y HH, y una línea celular, Myla, procedente de la “European Collection of Cell Cultures “ (ECACC, Wiltshire, UK).

Todas las líneas crecieron en un medio de cultivo RPMI 1640, con un 10% de suero bovino fetal inactivado por calor, y un 1% de penicilina/streptomina (Invitrogen Corporation, USA), en una atmósfera humidificada a 37°C con un 5% de CO₂.

3. ESTUDIO DEL REORDENAMIENTO DE 6P25.3 MEDIANTE FISH O “HIBRIDACIÓN IN SITU MEDIANTE INMUNOFLUORESCENCIA”

Se realizaron estudios del estado del locus 6p25.3 mediante experimentos de FISH, empleando sondas comerciales de separación para el locus IRF4-DUSP22 (6p25.3) break-apart probe (KBI-10613; Kreatech, Leica, Spain), siguiendo los protocolos convencionales. Se contaron 100 núcleos en cada preparación.

4. TÉCNICAS BASADAS EN PROTEÍNAS

Inmunohistoquímica

Las tinciones inmunohistoquímicas se realizaron en el Servicio de Anatomía Patológica del HUMV, sobre cortes de tejido parafinado, en muestras de 4mm siguiendo el método Envision FLEX de Dako (Glostrup, Dinamarca) y un sistema de detección basado en avidina/biotina peroxidase, empleando diaminobenzidina como cromógeno, en un inmunotendador de (Dako). En el primer estudio se emplearon una serie de anticuerpos dirigidos contra CD30 (Ber-H2, RTU; Dako), TCR-bF1 (8A3, dilución 1/40; Thermo Scientific, Fremont, CA, USA), TCR-c (G3-20, dilución 1/50; Thermo Scientific), CD3 (rabbit poly-clonal, RTU; Dako), CD4 (4B12, RTU; Dako), CD8 (C8/144B, RTU; Dako), CD20 (L26, RTU; Dako), Ki-67 (MIB1, RTU; Dako) and ALK (ALK-1, RTU; Dako).

En el segundo estudio se empleó el mismo método con otra serie de anticuerpos que se detalla en la siguiente tabla:

| Anticuerpo | Clon/Referencia | Origen/urce | Método de visualización | Dilución |
|------------|-------------------|-------------------------|-------------------------|----------|
| CD20 | L26/IR604 | Dako, Glostrup, Denmark | Citrate pH 6/FLEX Dako | RTU |
| CD30 | Ber-H2/IR602 | Dako | Citrate pH 6/FLEX Dako | RTU |
| CD3 | IR503 | Dako | Citrate pH 6/FLEX Dako | RTU |
| PD1 | NAT105C/E3 | CNIO, Madrid, Spain | Citrate pH 6/FLEX Dako | 1/100 |
| PAX5 | DAK-PAX5/IR650 | Dako | Citrate pH 6/FLEX Dako | RTU |
| LEF1 | EPR2029Y/ab137872 | Abcam, Cambridge, UK | Citrate pH 6/FLEX Dako | 1/100 |
| Ki 67 | MIB-1/IR626 | Dako | Citrate pH 6/FLEX Dako | RTU |

El proceso de las dobles tinciones inmunohistoquímicas realizadas en el segundo trabajo para el estudio del inmunofenotipo de las células CD30-positivas se hizo como sigue. Tras la desparafinización de las laminillas, rehidratación y recuperación antigénica con 10mM de citrato (pH 6.5), las laminillas se calentaron en el horno a 770W durante 14 minutos, atemperaron a temperatura ambiente y lavaron con agua destilada. Posteriormente se tiñeron en el Autostainer de Dako (Dako Autostainer Link 48). Tras el bloqueo de la actividad de la peroxidase endógena (EnVision Flex; Dako) durante cinco minutos y un breve lavado, las secciones histológicas se incubaron primero con PAX5 durante 20 minutos, 30 minutos con LEF1 o 20 minutos con CD3. Después se añadió un linker o amplificador de ratón durante 15 minutos. Posteriormente las secciones se incubaron durante 20 minutos con el agente de detección Dako EnVision Flex/HRP, y diaminobenzidina durante 10 minutos. Tras el lavado, las secciones se incubaron con el Segundo anticuerpo anti-CD30 durante 20 minutos, y se añadió Rabbit/mouse (LINK) (EnVision G12 System/AP; Dako), con un Segundo potenciador (Enhancer; Dako), durante 30 minutos. El Segundo cromógeno, rojo permanente, se añadió durante 10 minutos, y se empleó hematoxilina-eosina como contra-tinción.

Estudio de la presencia del virus Epstein-Bar mediante hibridación in situ según los protocolos convencionales.

Western blot

Las células fueron lisadas y sometidas a un SDS-PAGE con 10% de acrilamida, empleando las técnicas estándares, y transferidas a una membrana de soporte de tipo nitrocelulosa

(Immobilon, Millipore) y western blot. Todos los anticuerpos primarios fueron diluidos al 1/1000 y los secundarios al 1/20000. Se emplearon los siguientes anticuerpos: anti- α -tubulin (sc-23948, Santa Cruz), monoclonal, anti-fosfo-STAT1 (Tyr701) (58D6) monoclonal de ratón (Ref.9167, Cell Signaling), anti-fosfo STAT3 (Tyr705) (D3A7) XP[®] monoclonal de ratón mAb (Ref.9145, Cell Signaling), anti-fosfo -STAT5 (Tyr694) (C11C5) monoclonal de ratón mAb (Ref.9359, Cell Signaling), anti-STAT1(Ref.9172, Cell Signaling), anti-STAT3 (Ref.4904, Cell Signaling), anti-STAT5 (Ref.9358, Cell Signaling), anti-PARP (H250, sc-7150, Santa Cruz), anticuerpos anti-ratón de cabra anti- IgG,DylightTM800 y anticuerpos anti IgG de ratón (cabra) IgG, DylightTM800 (Thermo scientific). Los datos fueron obtenidos empleando el sistema de infrarrojos Odyssey (Li-Cor).

Análisis mediante citometría de flujo

La distribución de las células en las distintas fases del ciclo celular se evaluó usando yoduro de propidio (PI, Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) y Click-iT[®] EdU Alexa Fluor[®] 488 Flow Cytometry Assay Kit (Technologies-Thermo Fisher Scientific), de acuerdo a las instrucciones del fabricante. La inducción de la apoptosis se evaluó mediante el empleo de FlowCellelect Annexin Red Kit (EMD Millipore Corporation, Billerica, MA, USA), también de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Los datos fueron recogidos empleando un FACSCalibur flow cytometer (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA) y analizados usando el software CellQuest Pro software (BD Biosciences).

5. TÉCNICAS BASADAS EN RNA

Estudios de expresión génica

Se realizó la extracción de RNA de las 37 muestras de tejido congelado procedentes del CNIO (19 PTCL-NOS, 15 AITL, y 3 ALCL), empleando Trizol (Invitrogen, Carlsbad, CA), según las instrucciones del fabricante. Los estudios de expression genetica se hicieron empleando un “Whole Human Genome Oligo Microarray (4 x44K format), según las intrucciones del

fabricante, (Agilent Technologies Inc., Santa Clara, CA), empleando ganglios linfáticos y amígdalas reactivas como controles. Los resultados se encuentran disponibles en la base de datos “Gene Expression Omnibus” con el código de acceso GSE36172.

PCR cuantitativa a tiempo real

Se realizó extracción de RNA de las 51 muestras parafinadas del Segundo trabajo, empleando RNeasy Mini Kit (Qiagen, Valencia, CA). Se sintetizó cDNA a partir de RNA tratado con 500 mg de DNaseI-t, y SuperScript II Reverse Transcriptasa (Invitrogen). Para la detección de CD30 (TNFRSF8) se emplearon las siguientes sondas Taqman: TNFRSF8 Hs01114493_m1 Taqman probe (Life Technologies, FosterCity, CA) was used. La expresión génica fue analizada en un aparato de 7900HT, de PCR a tiempo real Applied Biosystems), empleando GAPDH como control endógeno, y las líneas celulares HUT78 y MYLA fueron empleadas como controles CD30-positivos. Se emplearon los valores $-\Delta Ct$ para el análisis posterior.

6. TÉCNICAS BASADAS EN DNA

Test de la calidad del DNA

Extracción de DNA según métodos estándares. Estudio de su cuantificación, integridad y pureza mediante cuantificación fluorométrica Qubit 2.0 (Life Technologies) empleando Qubit® dsDNA BR Assay Kit (Life Technologies) y electroforesis capilar en un 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies Inc., Santa Clara, CA, USA) usando High Sensitivity DNA reagents and chip kits (Agilent Technologies), según las instrucciones del fabricante.

Secuenciación:

Se obtuvieron datos mediante dos técnicas independientes de ultrasecuenciación: 1) Ampliación mediante PCR específica de los dominios pseudokinasa de JAK1, JAK2 y JAK3 genes (PsTKd-PCR), seguido de secuenciación con MiSeq (Illumina), y 2) empleo de un kit de

enriquecimiento dirigido (HaloPlex, Agilent Technologies), combinado con secuenciación de tipo Ion Torrent.)

7. VIABILIDAD CELULAR

Para los experimentos de toxicidad farmacológica en las líneas celulares, las líneas celulares de CTCL fueron sembradas en placas de 96 pocillos a una densidad de 10.000 células por pocillo , y el inhibidor INCB018424 se añadió en dosis crecientes durante 48 horas empleando dimetilsulfóxido (DMSO) como control, alcanzando concentraciones máximas de 20 µl/ml. La viabilidad celular se midió en forma de contenido en ATP intracelular , empleando el CellTiter-Glo Luminescent Cell Viability Assay (Promega). Todos los experimentos se realizaron por triplicado.

8. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Se empleó la correlación de Spearman para estudiar la asociación entre los niveles de CD30 inmunohistoquímicos y los niveles de mRNA. En el tercer trabajo se empleó GraphPad.

VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Vose J, Armitage J, Weisenburger D, Project IT-CL. International peripheral T-cell and natural killer/T-cell lymphoma study: pathology findings and clinical outcomes. *J Clin Oncol.* 2008;26(25):4124-30.
2. SHCE S. WHO classification of Tumours and Haematopoietic and Lymphoid Tissues. In: Harris NL PS, Stein H, Thiele J, Vardiman JW, editor. Lyon, France.: IARC; 2008.
3. Weisenburger DD, Savage KJ, Harris NL, Gascoyne RD, Jaffe ES, MacLennan KA, et al. Peripheral T-cell lymphoma, not otherwise specified: a report of 340 cases from the International Peripheral T-cell Lymphoma Project. *Blood.* 2011;117(12):3402-8.
4. Gallamini A, Stelitano C, Calvi R, Bellei M, Mattei D, Vitolo U, et al. Peripheral T-cell lymphoma unspecified (PTCL-U): a new prognostic model from a retrospective multicentric clinical study. *Blood.* 2004;103(7):2474-9.
5. Gutiérrez-García G, García-Herrera A, Cardesa T, Martínez A, Villamor N, Ghita G, et al. Comparison of four prognostic scores in peripheral T-cell lymphoma. *Ann Oncol.* 2011;22(2):397-404.
6. Armitage JO. The aggressive peripheral T-cell lymphomas: 2012 update on diagnosis, risk stratification, and management. *Am J Hematol.* 2012;87(5):511-9.
7. Iqbal J, Weisenburger DD, Greiner TC, Vose JM, McKeithan T, Kucuk C, et al. Molecular signatures to improve diagnosis in peripheral T-cell lymphoma and prognostication in angioimmunoblastic T-cell lymphoma. *Blood.* 2010;115(5):1026-36.
8. Iqbal J, Wright G, Wang C, Rosenwald A, Gascoyne RD, Weisenburger DD, et al. Gene expression signatures delineate biological and prognostic subgroups in peripheral T-cell lymphoma. *Blood.* 2014;123(19):2915-23.
9. O'leary H, Savage KJ. The spectrum of peripheral T-cell lymphomas. *Curr Opin Hematol.* 2009;16(4):292-8.
10. Frizzera G, Moran EM, Rappaport H. Angio-immunoblastic lymphadenopathy with dysproteinaemia. *Lancet.* 1974;1(7866):1070-3.
11. Laurent C, Fazilleau N, Brousset P. A novel subset of T-helper cells: follicular T-helper cells and their markers. *Haematologica.* 2010;95(3):356-8.
12. Sabbatini E, Pizzi M, Tabanelli V, Baldin P, Sacchetti CS, Agostinelli C, et al. CD30 expression in peripheral T-cell lymphomas. *Haematologica.* 2013;98(8):e81-2.
13. de Leval L, Rickman DS, Thielen C, Reynies A, Huang YL, Delsol G, et al. The gene expression profile of nodal peripheral T-cell lymphoma demonstrates a molecular link between angioimmunoblastic T-cell lymphoma (AITL) and follicular helper T (TFH) cells. *Blood.* 2007;109(11):4952-63.
14. Piccaluga PP, Agostinelli C, Califano A, Carbone A, Fantoni L, Ferrari S, et al. Gene expression analysis of angioimmunoblastic lymphoma indicates derivation from T follicular helper cells and vascular endothelial growth factor deregulation. *Cancer Res.* 2007;67(22):10703-10.

15. Palomero T, Couronné L, Khiabani H, Kim MY, Ambesi-Impiombato A, Perez-Garcia A, et al. Recurrent mutations in epigenetic regulators, RHOA and FYN kinase in peripheral T cell lymphomas. *Nat Genet.* 2014;46(2):166-70.
16. Sakata-Yanagimoto M, Enami T, Yoshida K, Shiraishi Y, Ishii R, Miyake Y, et al. Somatic RHOA mutation in angioimmunoblastic T cell lymphoma. *Nat Genet.* 2014;46(2):171-5.
17. Yoo HY, Sung MK, Lee SH, Kim S, Lee H, Park S, et al. A recurrent inactivating mutation in RHOA GTPase in angioimmunoblastic T cell lymphoma. *Nat Genet.* 2014;46(4):371-5.
18. Cairns RA, Iqbal J, Lemonnier F, Kucuk C, de Leval L, Jais JP, et al. IDH2 mutations are frequent in angioimmunoblastic T-cell lymphoma. *Blood.* 2012;119(8):1901-3.
19. Gambacorti-Passerini C, Messa C, Pogliani EM. Crizotinib in anaplastic large-cell lymphoma. *N Engl J Med.* 2011;364(8):775-6.
20. Coppo P, Gouilleux-Gruart V, Huang Y, Bouhlal H, Bouamar H, Bouchet S, et al. STAT3 transcription factor is constitutively activated and is oncogenic in nasal-type NK/T-cell lymphoma. *Leukemia.* 2009;23(9):1667-78.
21. Agnelli L, Mereu E, Pellegrino E, Limongi T, Kwee I, Bergaggio E, et al. Identification of a 3-gene model as a powerful diagnostic tool for the recognition of ALK-negative anaplastic large-cell lymphoma. *Blood.* 2012;120(6):1274-81.
22. Wada DA, Law ME, Hsi ED, Dicaudo DJ, Ma L, Lim MS, et al. Specificity of IRF4 translocations for primary cutaneous anaplastic large cell lymphoma: a multicenter study of 204 skin biopsies. *Mod Pathol.* 2011;24(4):596-605.
23. Parilla Castellar ER JE, Said JW, Swerdlow SH, Ketterling RP, Knudson RA, Sidhu JS, Hsi ED, Karikehalli S, Jiang L, Vasmatzis G, Gibson SE, Ondrejka S, Nicolae A, Grogg KL, Allmer C, Ristow KM, Wilson WH, Macon WR, Law ME, Cerhan JR, Habermann TM, Ansell SM, Dogan A, Maurer MJ, Feldman AL. ALK-negative anaplastic large cell lymphoma is a genetically heterogeneous disease with widely disparate clinical outcomes.: *Blood;* 2014.
24. Usui T, Preiss JC, Kanno Y, Yao ZJ, Bream JH, O'Shea JJ, et al. T-bet regulates Th1 responses through essential effects on GATA-3 function rather than on IFNG gene acetylation and transcription. *J Exp Med.* 2006;203(3):755-66.
25. Lazarevic V, Glimcher LH, Lord GM. T-bet: a bridge between innate and adaptive immunity. *Nat Rev Immunol.* 2013;13(11):777-89.
26. Duvic M. CD30+ neoplasms of the skin. *Curr Hematol Malig Rep.* 2011;6(4):245-50.
27. Cheson BD, Horwitz SM, Weisenburger DD. Peripheral T-cell lymphomas: diagnosis and treatment options. Proceedings from a live roundtable, August 17, 2011, Kauai, Hawaii. *Clin Adv Hematol Oncol.* 2011;9(11 Suppl 26):1-14; quiz 5-6.
28. Pongpruttipan T, Sukpanichnant S, Assanasen T, Wannakrairot P, Boonsakan P, Kanoksil W, et al. Extranodal NK/T-cell lymphoma, nasal type, includes cases of natural killer cell and $\alpha\beta$, $\gamma\delta$, and $\alpha\beta/\gamma\delta$ T-cell origin: a comprehensive clinicopathologic and phenotypic study. *Am J Surg Pathol.* 2012;36(4):481-99.
29. Benner MF, Jansen PM, Vermeer MH, Willemze R. Prognostic factors in transformed mycosis fungoides: a retrospective analysis of 100 cases. *Blood.* 2012;119(7):1643-9.
30. Ralfkiaer E, Bosq J, Gatter KC, Schwarting R, Gerdes J, Stein H, et al. Expression of a Hodgkin and Reed-Sternberg cell associated antigen (Ki-1) in cutaneous lymphoid infiltrates. *Arch Dermatol Res.* 1987;279(5):285-92.

31. Jaffe ES, Nicolae A, Pittaluga S. Peripheral T-cell and NK-cell lymphomas in the WHO classification: pearls and pitfalls. *Mod Pathol*. 2013;26 Suppl 1:S71-87.
32. Saggini A, Gulia A, Argenyi Z, Fink-Puches R, Lissia A, Magaña M, et al. A variant of lymphomatoid papulosis simulating primary cutaneous aggressive epidermotropic CD8+ cytotoxic T-cell lymphoma. Description of 9 cases. *Am J Surg Pathol*. 2010;34(8):1168-75.
33. Berti E, Tomasini D, Vermeer MH, Meijer CJ, Alessi E, Willemze R. Primary cutaneous CD8-positive epidermotropic cytotoxic T cell lymphomas. A distinct clinicopathological entity with an aggressive clinical behavior. *Am J Pathol*. 1999;155(2):483-92.
34. Karai LJ, Kadin ME, Hsi ED, Sluzevich JC, Ketterling RP, Knudson RA, et al. Chromosomal rearrangements of 6p25.3 define a new subtype of lymphomatoid papulosis. *Am J Surg Pathol*. 2013;37(8):1173-81.
35. Kadin ME. Pathobiology of CD30+ cutaneous T-cell lymphomas. *J Cutan Pathol*. 2006;33 Suppl 1:10-7.
36. Chott A, Vonderheid EC, Olbricht S, Miao NN, Balk SP, Kadin ME. The dominant T cell clone is present in multiple regressing skin lesions and associated T cell lymphomas of patients with lymphomatoid papulosis. *J Invest Dermatol*. 1996;106(4):696-700.
37. Pham-Ledard A, Prochazkova-Carlotti M, Laharanne E, Vergier B, Jouary T, Beylot-Barry M, et al. IRF4 gene rearrangements define a subgroup of CD30-positive cutaneous T-cell lymphoma: a study of 54 cases. *J Invest Dermatol*. 2010;130(3):816-25.
38. Hallermann C, Niermann C, Schulze HJ. Regulatory T-cell phenotype in association with large cell transformation of mycosis fungoides. *Eur J Haematol*. 2007;78(3):260-3.
39. Prochazkova M, Chevret E, Mainhaguet G, Sobotka J, Vergier B, Belaud-Rotureau MA, et al. Common chromosomal abnormalities in mycosis fungoides transformation. *Genes Chromosomes Cancer*. 2007;46(9):828-38.
40. Berger CL, Tigelaar R, Cohen J, Mariwalla K, Trinh J, Wang N, et al. Cutaneous T-cell lymphoma: malignant proliferation of T-regulatory cells. *Blood*. 2005;105(4):1640-7.
41. Campbell JJ, Clark RA, Watanabe R, Kupper TS. Sezary syndrome and mycosis fungoides arise from distinct T-cell subsets: a biologic rationale for their distinct clinical behaviors. *Blood*. 2010;116(5):767-71.
42. de Leval L, Gaulard P. Pathobiology and molecular profiling of peripheral T-cell lymphomas. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2008:272-9.
43. Chiarle R, Podda A, Prolla G, Gong J, Thorbecke GJ, Inghirami G. CD30 in normal and neoplastic cells. *Clin Immunol*. 1999;90(2):157-64.
44. Woitas RP, Lechmann M, Jung G, Kaiser R, Sauerbruch T, Spengler U. CD30 induction and cytokine profiles in hepatitis C virus core-specific peripheral blood T lymphocytes. *J Immunol*. 1997;159(2):1012-8.
45. Fattovich G, Vinante F, Giustina G, Morosato L, Alberti A, Ruol A, et al. Serum levels of soluble CD30 in chronic hepatitis B virus infection. *Clin Exp Immunol*. 1996;103(1):105-10.
46. Zinzani PL, Pileri S, Bendandi M, Buzzi M, Sabattini E, Ascani S, et al. Clinical implications of serum levels of soluble CD30 in 70 adult anaplastic large-cell lymphoma patients. *J Clin Oncol*. 1998;16(4):1532-7.
47. Nadali G, Vinante F, Stein H, Todeschini G, Tecchio C, Morosato L, et al. Serum levels of the soluble form of CD30 molecule as a tumor marker in CD30+ anaplastic large-cell lymphoma. *J Clin Oncol*. 1995;13(6):1355-60.

48. Kadin ME, Pavlov IY, Delgado JC, Vonderheid EC. High soluble CD30, CD25, and IL-6 may identify patients with worse survival in CD30+ cutaneous lymphomas and early mycosis fungoides. *J Invest Dermatol.* 2012;132(3 Pt 1):703-10.
49. Hsu FY, Johnston PB, Burke KA, Zhao Y. The expression of CD30 in anaplastic large cell lymphoma is regulated by nucleophosmin-anaplastic lymphoma kinase-mediated JunB level in a cell type-specific manner. *Cancer Res.* 2006;66(18):9002-8.
50. Sommer VH, Clemmensen OJ, Nielsen O, Wasik M, Lovato P, Brender C, et al. In vivo activation of STAT3 in cutaneous T-cell lymphoma. Evidence for an antiapoptotic function of STAT3. *Leukemia.* 2004;18(7):1288-95.
51. Huang Y, de Leval L, Gaulard P. Molecular underpinning of extranodal NK/T-cell lymphoma. *Best Pract Res Clin Haematol.* 2013;26(1):57-74.
52. Atsaves V, Lekakis L, Drakos E, Leventaki V, Ghaderi M, Baltatzis GE, et al. The oncogenic JUNB/CD30 axis contributes to cell cycle deregulation in ALK+ anaplastic large cell lymphoma. *Br J Haematol.* 2014;167(4):514-23.
53. Horie R, Watanabe M, Ishida T, Koiwa T, Aizawa S, Itoh K, et al. The NPM-ALK oncoprotein abrogates CD30 signaling and constitutive NF-kappaB activation in anaplastic large cell lymphoma. *Cancer Cell.* 2004;5(4):353-64.
54. Falini B, Bolognesi A, Flenghi L, Tazzari PL, Broe MK, Stein H, et al. Response of refractory Hodgkin's disease to monoclonal anti-CD30 immunotoxin. *Lancet.* 1992;339(8803):1195-6.
55. Deng C, Pan B, O'Connor OA. Brentuximab vedotin. *Clin Cancer Res.* 2013;19(1):22-7.
56. Fanale MA, Horwitz SM, Forero-Torres A, Bartlett NL, Advani RH, Pro B, et al. Brentuximab vedotin in the front-line treatment of patients with CD30+ peripheral T-cell lymphomas: results of a phase I study. *J Clin Oncol.* 2014;32(28):3137-43.
57. Heidegger S, Beer AJ, Geissinger E, Rosenwald A, Peschel C, Ringshausen I, et al. Combination therapy with brentuximab vedotin and cisplatin/cytarabine in a patient with primarily refractory anaplastic lymphoma kinase positive anaplastic large cell lymphoma. *Oncotargets Ther.* 2014;7:1123-7.
58. Boyton RJ, Altmann DM. Is selection for TCR affinity a factor in cytokine polarization? *Trends Immunol.* 2002;23(11):526-9.
59. dos Santos NR, Rickman DS, de Reynies A, Cormier F, Williams M, Blanchard C, et al. Pre-TCR expression cooperates with TEL-JAK2 to transform immature thymocytes and induce T-cell leukemia. *Blood.* 2007;109(9):3972-81.
60. Kelly JA, Spolski R, Kovanen PE, Suzuki T, Bollenbacher J, Pise-Masison CA, et al. Stat5 synergizes with T cell receptor/antigen stimulation in the development of lymphoblastic lymphoma. *J Exp Med.* 2003;198(1):79-89.
61. Geissinger E, Sadler P, Roth S, Grieb T, Puppe B, Müller N, et al. Disturbed expression of the T-cell receptor/CD3 complex and associated signaling molecules in CD30+ T-cell lymphoproliferations. *Haematologica.* 2010;95(10):1697-704.
62. Ambrogio C, Martinengo C, Voena C, Tondat F, Riera L, di Celle PF, et al. NPM-ALK oncogenic tyrosine kinase controls T-cell identity by transcriptional regulation and epigenetic silencing in lymphoma cells. *Cancer Res.* 2009;69(22):8611-9.
63. Turner SD, Yeung D, Hadfield K, Cook SJ, Alexander DR. The NPM-ALK tyrosine kinase mimics TCR signalling pathways, inducing NFAT and AP-1 by RAS-dependent mechanisms. *Cell Signal.* 2007;19(4):740-7.

64. Pechloff K, Holch J, Ferch U, Schwenecker M, Brunner K, Kremer M, et al. The fusion kinase ITK-SYK mimics a T cell receptor signal and drives oncogenesis in conditional mouse models of peripheral T cell lymphoma. *J Exp Med*. 2010;207(5):1031-44.
65. Dierks C, Adrian F, Fisch P, Ma H, Maurer H, Herchenbach D, et al. The ITK-SYK fusion oncogene induces a T-cell lymphoproliferative disease in mice mimicking human disease. *Cancer Res*. 2010;70(15):6193-204.
66. Kim EJ, Hess S, Richardson SK, Newton S, Showe LC, Benoit BM, et al. Immunopathogenesis and therapy of cutaneous T cell lymphoma. *J Clin Invest*. 2005;115(4):798-812.
67. Wilcox RA, Feldman AL, Wada DA, Yang ZZ, Comfere NI, Dong H, et al. B7-H1 (PD-L1, CD274) suppresses host immunity in T-cell lymphoproliferative disorders. *Blood*. 2009;114(10):2149-58.
68. Yamaguchi S, Kitagawa M, Inoue M, Tomizawa N, Kamiyama R, Hirokawa K. Cell dynamics and expression of tumor necrosis factor (TNF)-alpha, interleukin-6, and TNF receptors in angioimmunoblastic lymphadenopathy-type T cell lymphoma. *Exp Mol Pathol*. 2000;68(2):85-94.
69. Fehniger TA, Suzuki K, Ponnappan A, VanDeusen JB, Cooper MA, Florea SM, et al. Fatal leukemia in interleukin 15 transgenic mice follows early expansions in natural killer and memory phenotype CD8+ T cells. *J Exp Med*. 2001;193(2):219-31.
70. Francisco JA, Cerveny CG, Meyer DL, Mixan BJ, Klussman K, Chace DF, et al. cAC10-vcMMAE, an anti-CD30-monomethyl auristatin E conjugate with potent and selective antitumor activity. *Blood*. 2003;102(4):1458-65.
71. Majhail NS, Weisdorf DJ, Defor TE, Miller JS, McGlave PB, Slungaard A, et al. Long-term results of autologous stem cell transplantation for primary refractory or relapsed Hodgkin's lymphoma. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2006;12(10):1065-72.
72. Younes A, Bartlett NL, Leonard JP, Kennedy DA, Lynch CM, Sievers EL, et al. Brentuximab vedotin (SGN-35) for relapsed CD30-positive lymphomas. *N Engl J Med*. 2010;363(19):1812-21.
73. Younes A, Gopal AK, Smith SE, Ansell SM, Rosenblatt JD, Savage KJ, et al. Results of a pivotal phase II study of brentuximab vedotin for patients with relapsed or refractory Hodgkin's lymphoma. *J Clin Oncol*. 2012;30(18):2183-9.
74. Younes A, Connors JM, Park SI, Fanale M, O'Meara MM, Hunder NN, et al. Brentuximab vedotin combined with ABVD or AVD for patients with newly diagnosed Hodgkin's lymphoma: a phase 1, open-label, dose-escalation study. *Lancet Oncol*. 2013;14(13):1348-56.
75. Pro B, Advani R, Brice P, Bartlett NL, Rosenblatt JD, Illidge T, et al. Brentuximab vedotin (SGN-35) in patients with relapsed or refractory systemic anaplastic large-cell lymphoma: results of a phase II study. *J Clin Oncol*. 2012;30(18):2190-6.
76. Merli M, Ferrario A, Maffioli M, Arcaini L, Passamonti F. Investigational therapies targeting lymphocyte antigens for the treatment of non-Hodgkin's lymphoma. *Expert Opin Investig Drugs*. 2015;24(7):897-912.
77. Ansell SM, Hurvitz SA, Koenig PA, LaPlant BR, Kabat BF, Fernando D, et al. Phase I study of ipilimumab, an anti-CTLA-4 monoclonal antibody, in patients with relapsed and refractory B-cell non-Hodgkin lymphoma. *Clin Cancer Res*. 2009;15(20):6446-53.

78. Prieto PA, Yang JC, Sherry RM, Hughes MS, Kammula US, White DE, et al. CTLA-4 blockade with ipilimumab: long-term follow-up of 177 patients with metastatic melanoma. *Clin Cancer Res.* 2012;18(7):2039-47.
79. Ansell SM, Lesokhin AM, Borrello I, Halwani A, Scott EC, Gutierrez M, et al. PD-1 blockade with nivolumab in relapsed or refractory Hodgkin's lymphoma. *N Engl J Med.* 2015;372(4):311-9.
80. Pardoll DM. The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy. *Nat Rev Cancer.* 2012;12(4):252-64.
81. Pennock GK, Chow LQ. The Evolving Role of Immune Checkpoint Inhibitors in Cancer Treatment. *Oncologist.* 2015;20(7):812-22.
82. Green MR, Monti S, Rodig SJ, Juszczynski P, Currie T, O'Donnell E, et al. Integrative analysis reveals selective 9p24.1 amplification, increased PD-1 ligand expression, and further induction via JAK2 in nodular sclerosing Hodgkin lymphoma and primary mediastinal large B-cell lymphoma. *Blood.* 2010;116(17):3268-77.
83. Green MR, Rodig S, Juszczynski P, Ouyang J, Sinha P, O'Donnell E, et al. Constitutive AP-1 activity and EBV infection induce PD-L1 in Hodgkin lymphomas and posttransplant lymphoproliferative disorders: implications for targeted therapy. *Clin Cancer Res.* 2012;18(6):1611-8.
84. **Lesokhin A, Ansell S, Armand P, Scott E, Halwani A, Gutierrez M,** et al. Preliminary Results of a Phase I Study of Nivolumab (BMS-936558) in Patients with Relapsed or Refractory Lymphoid Malignancies. *Blood;* 2014. p. 291-.
85. Moskowitz CH, Ribrag V, Michot JM. PD-1 blockade with the monoclonal antibody pembrolizumab (MK-3475) in patients with classical Hodgkin lymphoma after brentuximab vedotin failure: Preliminary results from a phase 1b study (KEYNOTE-013). *ASH Annual Meeting 2014.* p. Abstract 290.
86. Carbone A, Gloghini A, Castagna L, Santoro A, Carlo-Stella C. Primary refractory and early-relapsed Hodgkin's lymphoma: strategies for therapeutic targeting based on the tumour microenvironment. *J Pathol.* 2015;237(1):4-13.
87. T.J. P, A. F-T, Sher T. M, C.S. D, M. T, P.A. S, et al. Interim analysis of a phase I study of INCB040093, a PI3K δ inhibitor, alone or in combination with INCB039110, a selective JAK1 inhibitor, in patients (pts) with relapsed or refractory (r/r) B-cell malignancies. *J Clin Oncol* 2015.
88. A. F-T, P.M. B, C.S. MD, T. S, R. S, L. Z, et al. A phase 1 study of INCB040093, a PI3K δ inhibitor, alone or in combination with INCB039110, a selective JAK1 inhibitor: Interim results from patients (pts) with relapsed or refractory (r/r) classical Hodgkin lymphoma (cHL). *J Clin Oncol* 2015.
89. Kempf W, Pfaltz K, Vermeer MH, Cozzio A, Ortiz-Romero PL, Bagot M, et al. EORTC, ISCL, and USCLC consensus recommendations for the treatment of primary cutaneous CD30-positive lymphoproliferative disorders: lymphomatoid papulosis and primary cutaneous anaplastic large-cell lymphoma. *Blood.* 2011;118(15):4024-35.
90. Schmitz N, Trümper L, Ziepert M, Nickelsen M, Ho AD, Metzner B, et al. Treatment and prognosis of mature T-cell and NK-cell lymphoma: an analysis of patients with T-cell lymphoma treated in studies of the German High-Grade Non-Hodgkin Lymphoma Study Group. *Blood.* 2010;116(18):3418-25.

91. d'Amore F, Relander T, Lauritzsen GF, Jantunen E, Hagberg H, Anderson H, et al. Up-front autologous stem-cell transplantation in peripheral T-cell lymphoma: NLG-T-01. *J Clin Oncol.* 2012;30(25):3093-9.
92. Kiran T, Demirkesen C, Eker C, Kumusoglu H, Tuzuner N. The significance of MUM1/IRF4 protein expression and IRF4 translocation of CD30(+) cutaneous T-cell lymphoproliferative disorders: a study of 53 cases. *Leuk Res.* 2013;37(4):396-400.
93. Feldman AL, Law M, Remstein ED, Macon WR, Erickson LA, Grogg KL, et al. Recurrent translocations involving the IRF4 oncogene locus in peripheral T-cell lymphomas. *Leukemia.* 2009;23(3):574-80.
94. Parrilla Castellar ER, Jaffe ES, Said JW, Swerdlow SH, Ketterling RP, Knudson RA, et al. ALK-negative anaplastic large cell lymphoma is a genetically heterogeneous disease with widely disparate clinical outcomes. *Blood.* 2014;124(9):1473-80.
95. Feldman AL, Dogan A, Smith DI, Law ME, Ansell SM, Johnson SH, et al. Discovery of recurrent t(6;7)(p25.3;q32.3) translocations in ALK-negative anaplastic large cell lymphomas by massively parallel genomic sequencing. *Blood.* 2011;117(3):915-9.
96. Onaindia A, Montes-Moreno S, Rodríguez-Pinilla SM, Batlle A, González de Villambrosía S, Rodríguez AM, et al. Primary cutaneous anaplastic large cell lymphomas with 6p25.3 rearrangement exhibit particular histological features. *Histopathology.* 2015;66(6):846-55.
97. Vasmatazis G, Johnson SH, Knudson RA, Ketterling RP, Braggio E, Fonseca R, et al. Genome-wide analysis reveals recurrent structural abnormalities of TP63 and other p53-related genes in peripheral T-cell lymphomas. *Blood.* 2012;120(11):2280-9.
98. Horwitz SM, Advani RH, Bartlett NL, Jacobsen ED, Sharman JP, O'Connor OA, et al. Objective responses in relapsed T-cell lymphomas with single-agent brentuximab vedotin. *Blood.* 2014;123(20):3095-100.
99. Krathen M, Sundram U, Bashey S. Brentuximab vedotin demonstrates significant clinical activity in relapsed or refractory mycosis fungoides with variable CD30 expression [abstract]. *Blood* 2012. p. Abstract 797.
100. Karube K, Aoki R, Nomura Y, Yamamoto K, Shimizu K, Yoshida S, et al. Usefulness of flow cytometry for differential diagnosis of precursor and peripheral T-cell and NK-cell lymphomas: analysis of 490 cases. *Pathol Int.* 2008;58(2):89-97.
101. Rodríguez-Pinilla SM, Sánchez ME, Rodríguez J, García JF, Sánchez-Espiridión B, Lamana LF, et al. Loss of TCR-beta F1 and/or EZRIN expression is associated with unfavorable prognosis in nodal peripheral T-cell lymphomas. *Blood Cancer J.* 2013;3:e111.
102. Bossard C, Dobay MP, Parrens M, Lamant L, Missiaglia E, Haioun C, et al. Immunohistochemistry as a valuable tool to assess CD30 expression in peripheral T-cell lymphomas: high correlation with mRNA levels. *Blood.* 2014;124(19):2983-6.
103. Kiessling MK, Oberholzer PA, Mondal C, Karpova MB, Zipser MC, Lin WM, et al. High-throughput mutation profiling of CTCL samples reveals KRAS and NRAS mutations sensitizing tumors toward inhibition of the RAS/RAF/MEK signaling cascade. *Blood.* 2011;117(8):2433-40.
104. Oflazoglu E, Stone IJ, Gordon KA, Grewal IS, van Rooijen N, Law CL, et al. Macrophages contribute to the antitumor activity of the anti-CD30 antibody SGN-30. *Blood.* 2007;110(13):4370-2.
105. Flex E, Petrangeli V, Stella L, Chiaretti S, Hornakova T, Knoops L, et al. Somatically acquired JAK1 mutations in adult acute lymphoblastic leukemia. *J Exp Med.* 2008;205(4):751-8.

106. Jacobsen ED, Sharman JP, Oki Y, Advani RH, Winter JN, Bello CM, et al. Brentuximab vedotin demonstrates objective responses in a phase 2 study of relapsed/refractory DLBCL with variable CD30 expression. *Blood*. 2015;125(9):1394-402.
107. Vaqué JP, Gómez-López G, Monsálvez V, Varela I, Martínez N, Pérez C, et al. PLCG1 mutations in cutaneous T-cell lymphomas. *Blood*. 2014;123(13):2034-43.
108. Bergmann AK, Schneppenheim S, Seifert M, Betts MJ, Haake A, Lopez C, et al. Recurrent mutation of JAK3 in T-cell prolymphocytic leukemia. *Genes Chromosomes Cancer*. 2014;53(4):309-16.
109. McGirt LY, Jia P, Baerenwald DA, Duszynski RJ, Dahlman KB, Zic JA, et al. Whole-genome sequencing reveals oncogenic mutations in mycosis fungoides. *Blood*. 2015;126(4):508-19.
110. Kiel MJ, Velusamy T, Rolland D, Sahasrabudhe AA, Chung F, Bailey NG, et al. Integrated genomic sequencing reveals mutational landscape of T-cell prolymphocytic leukemia. *Blood*. 2014;124(9):1460-72.
111. Crescenzo R, Abate F, Lasorsa E, Tabbo' F, Gaudiano M, Chiesa N, et al. Convergent mutations and kinase fusions lead to oncogenic STAT3 activation in anaplastic large cell lymphoma. *Cancer Cell*. 2015;27(4):516-32.
112. Netchiporouk E, Litvinov IV, Moreau L, Gilbert M, Sasseville D, Duvic M. Deregulation in STAT signaling is important for cutaneous T-cell lymphoma (CTCL) pathogenesis and cancer progression. *Cell Cycle*. 2014;13(21):3331-5.
113. Xiang Z, Zhao Y, Mitaksov V, Fremont DH, Kasai Y, Molitoris A, et al. Identification of somatic JAK1 mutations in patients with acute myeloid leukemia. *Blood*. 2008;111(9):4809-12.
114. Lupardus PJ, Ultsch M, Wallweber H, Bir Kohli P, Johnson AR, Eigenbrot C. Structure of the pseudokinase-kinase domains from protein kinase TYK2 reveals a mechanism for Janus kinase (JAK) autoinhibition. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2014;111(22):8025-30.
115. Shaffer AL, Emre NC, Romesser PB, Staudt LM. IRF4: Immunity. Malignancy! Therapy? *Clin Cancer Res*. 2009;15(9):2954-61.

