

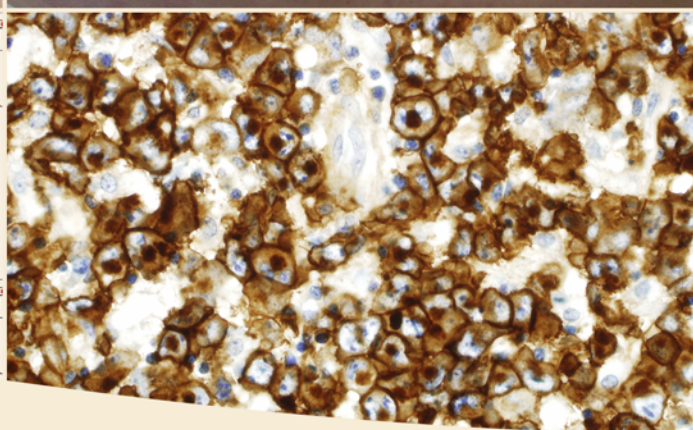
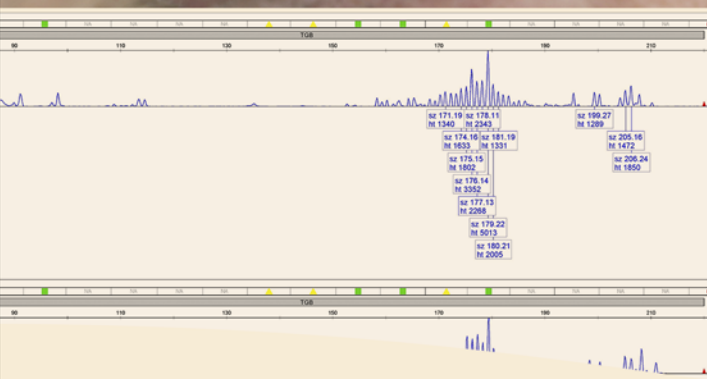
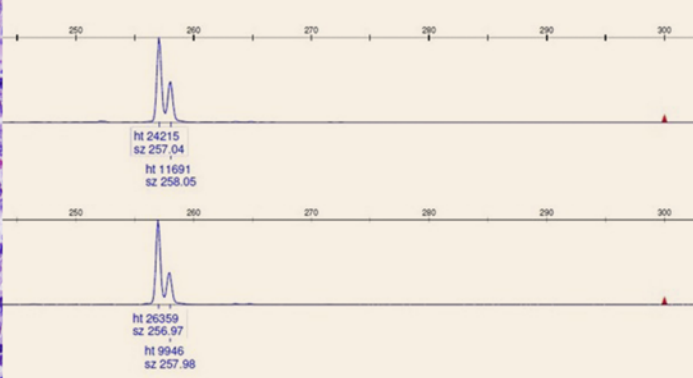
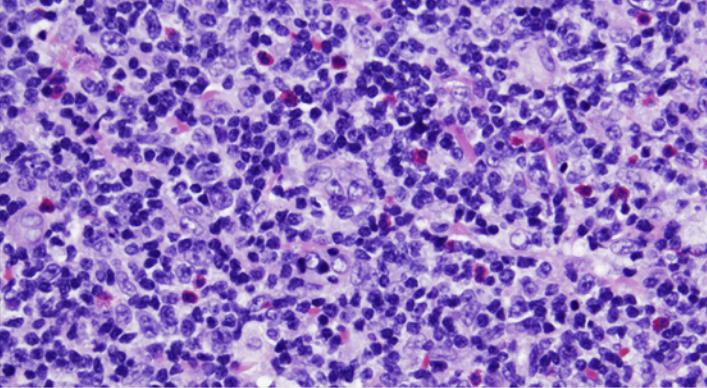


Universitat Autònoma de Barcelona

**ADVERTIMENT.** L'accés als continguts d'aquesta tesi queda condicionat a l'acceptació de les condicions d'ús establertes per la següent llicència Creative Commons:  [http://cat.creativecommons.org/?page\\_id=184](http://cat.creativecommons.org/?page_id=184)

**ADVERTENCIA.** El acceso a los contenidos de esta tesis queda condicionado a la aceptación de las condiciones de uso establecidas por la siguiente licencia Creative Commons:  <http://es.creativecommons.org/blog/licencias/>

**WARNING.** The access to the contents of this doctoral thesis it is limited to the acceptance of the use conditions set by the following Creative Commons license:  <https://creativecommons.org/licenses/?lang=en>



# VALOR DIAGNÒSTIC I PRONÒSTIC DE L'ANÀLISI GENOTÍPICA ALS LIMFOMES CUTANIS PRIMARIS UTILITZANT ELS PROTOCOLS DE REACCIÓ EN CADENA DE LA POLIMERASA BIOMED-2

Tesi Doctoral  
Daniel López Aventín

Directors  
Dr. Fernando Gallardo Hernández  
Dra. Beatriz Bellosillo Paricio  
Dr. Ramon Maria Pujol Vallverdú

2021

Tutor  
Dr. Ramon Maria Pujol Vallverdú





**Universitat Autònoma  
de Barcelona**

Programa de Doctorat en Medicina, Departament de Medicina

**VALOR DIAGNÒSTIC I PRONÒSTIC DE L'ANÀLISI  
GENOTÍPICA ALS LIMFOMES CUTANIS PRIMARIS  
UTILITZANT ELS PROTOCOLS DE REACCIÓ EN CADENA  
DE LA POLIMERASA BIOMED-2**

Tesi doctoral presentada per Daniel López Aventín per obtenir el títol de Doctor  
per la Universitat Autònoma de Barcelona

**Directors**

Dr. Fernando Gallardo Hernández

Dra. Beatriz Bellosillo Paricio

Dr. Ramon Maria Pujol Vallverdú

**Tutor**

Dr. Ramon Maria Pujol Vallverdú

Barcelona, 2021



*"Thus, in the immune system, organisms have exploited two major processes for modification of DNA, recombination and mutation, as means to diversify somatically the limited amount of inherited genetic information in order to cope with the vastly diverse antigen universe."*

**SOMATIC GENERATION OF IMMUNE DIVERSITY**

Conferència dels Premis Nobel, 8 de desembre de 1987

SUSUMU TONEGAWA



## AGRAÏMENTS

---

Aquest estudi no hauria estat possible sense l'enorme feina realitzada des de l'any 2004 per l'Ester Moragón Massey i la María Carmen Vela Ortiz, tècniques del Laboratori de Diagnòstic Molecular del Servei de Patologia de l'Hospital del Mar de Barcelona, que han dut a terme centenars i centenars de proves de PCR BIOMED-2 per analitzar els reordenaments gènics del receptor de la cèl·lula T i de la immunoglobulina. Aquest reconeixement i agraïment el vull fer extensiu també a la resta de professionals del Laboratori.

Dono les gràcies a la Dra. Ana Ferrer del Álamo del Laboratori de Citologia Hematològica de l'Hospital del Mar per aclarir els dubtes sorgits durant l'avaluació dels resultats morfològics i immunofenotípics a les mostres de sang perifèrica.

Agraeixo a la Dra. Maria Estela Martínez Escala que l'any 2010, quan era resident al Servei de Dermatologia de l'Hospital del Mar, iniciés un estudi morfològic, immunofenotípic i molecular de la població limfoide a la sang perifèrica als pacients amb limfoma cutani, que ha estat un punt de partida important per una part d'aquest treball.

L'anàlisi estadística de les dades ha estat possible gràcies a l'ajuda del Dr. Xavier Duran Jordà, responsable de l'Assessoria metodològica i Bioestadística (AMIB) de l'Institut Hospital del Mar d'Investigacions Mèdiques (IMIM).

Vull agrair als meus directors de tesi, la Dra. Beatriz Bellosillo Paricio, el Dr. Fernando Gallardo Hernández i el Dr. Ramon M. Pujol Vallverdú les revisions crítiques i els seus suggeriments a fi de millorar el present estudi.

També vull donar les gràcies als amics d'aquest viatge a la recerca científica, doctorands del programa de Doctorat en Medicina de la UAB, la Laia, en Nacho i la Irene per haver-nos ajudat i recolzat mútuament davant les dificultats que es presentaven.

Agraeixo a tots els companys i companyes del Servei de Dermatologia de l'Hospital del Mar, amb els que he coincidit al llarg de la residència i també durant els primers anys com a metge adjunt, per ensenyar-me tant i despertar-me l'interès en la recerca.



Moltes gràcies a tota la meva família i als meus amics propers. Als meus pares, Montse i Daniel, als meus germans, Nona, Marc i Laia, als meus nebots, Jan i Gil, al meu cunyat, Jordi i, als meus avis, Roser i Jacinto. Així com, molt especialment a la meva parella, la Carolina Xipell i Badals. Tots ells m'han donat el suport, els ànims i l'empenta que necessitava en tot moment, sobretot durant aquells dies en què la meta d'aquest camí semblava més lluny.

Moltíssimes gràcies a totes i a tots!





## LLISTA D'ABREVIACIONS

<b>ADN</b>	àcid desoxiribonucleic	<b>EORTC</b>	<i>European Organisation for Research and Treatment of Cancer</i>
<b>AFF</b>	anàlisi fragments fluorescents	<b>F</b>	femení
<b>AGGE</b>	electroforesi en gel d'agarosa	<b><sup>18</sup>F-FDG-PET</b>	fluor-18 fluorodesoxiglucosa - tomografia per emissió de positrons
<b>AH</b>	anàlisi d'heterodúplex	<b>FOXP1</b>	<i>forhead box P1</i>
<b>ALK</b>	<i>anaplastic lymphoma kinase</i>	<b>FR</b>	<i>framework region</i>
<b>ARNm</b>	àcid ribonucleic missatger	<b>HLC</b>	hiperplàsia limfoide cutània
<b>BCL</b>	<i>B-cell lymphoma</i>	<b>HR</b>	<i>Hazard ratio</i>
<b>BCR</b>	<i>B-cell receptor</i>	<b>HTLV-1</b>	<i>human T-cell leukaemia virus type 1</i>
<b>BSA</b>	<i>Body Surface Area</i>	<b>HTS</b>	<i>high-throughput sequencing</i>
<b>C</b>	regió constant	<b>IARC</b>	<i>International Agency for Research on Cancer</i>
<b>CCR</b>	<i>chemokine receptor</i>	<b>IC 95%</b>	interval de confiança del 95%
<b>CD</b>	<i>cluster of differentiation</i>	<b>ICD-O</b>	<i>International Classification of Diseases for Oncology</i>
<b>CDR3</b>	<i>complementary determining region 3</i>	<b>IF</b>	immunofenotip
<b>CLA</b>	<i>cutaneous lymphocyte antigen</i>	<b>IG</b>	immunoglobulina
<b>CXCL13</b>	<i>C-X-C Motif Chemokine Ligand 13</i>	<b>IGH</b>	cadena pesada de les immuno- globulines
<b>CXCR3</b>	<i>C-X-C Motif Chemokine Receptor 3</i>	<b>IGK</b>	cadena lleugera kappa
<b>D</b>	segment diversity	<b>IGL</b>	cadena lleugera lambda
<b>DGGE</b>	electroforesi en gel de gradient desnaturalitzant	<b>IRF4/MUM1</b>	<i>interferon regulatory factor 4/multiple myeloma 1</i>
<b>dNTP</b>	desoxiribonucleòtids trifosfat	<b>ISCL</b>	<i>International Society for Cutaneous Lymphomas</i>
<b>DRESS</b>	<i>Drug Reaction with Eosinophilia and Systemic Symptoms</i>	<b>J</b>	segment joining
<b>DUSP22</b>	<i>dual specificity phosphatase 22</i>		
<b>E</b>	especificitat		
<b>EBER</b>	<i>Epstein-Barr virus encoded small RNA</i>		
<b>EDTA</b>	etilendiaminotetracetat		
<b>EMA</b>	<i>epithelial membrane antigen</i>		

<b>Kde</b>	<i>kappa deleting element</i>	<b>ND</b>	no disponible
<b>κ</b>	cadena lleugera kappa	<b>NF-κB</b>	<i>Nuclear Factor kappa B</i>
<b>λ</b>	cadena lleugera lambda	<b>NGS</b>	<i>next-generation sequencing</i>
<b>LACG</b>	limfoma anaplàstic de cèl·lula gran	<b>NK</b>	<i>natural killer</i>
<b>LCACG</b>	limfoma cutani anaplàstic de cèl·lula gran	<b>NPM</b>	<i>nucleophosmin</i>
<b>LCCB</b>	limfoma cutani de cèl·lules B	<b>OMS</b>	Organització Mundial de la Salut
<b>LCCT</b>	limfoma cutani de cèl·lules T	<b>OR</b>	<i>Odds ratio</i>
<b>LCP</b>	limfomes cutanis primaris	<b>ORR</b>	<i>objective response rate</i>
<b>LCPCF</b>	limfoma cutani primari centre fol·licular	<b>P</b>	parafina
<b>LCPDCBG, TC</b>	limfoma cutani primari difús de cèl·lula B gran, tipus cama	<b>PAGE</b>	electroforesi en gel de poliacrilamida
<b>LCPZM</b>	limfoma cutani primari de la zona marginal	<b>PAX5</b>	<i>paired box 5</i>
<b>LCS</b>	limfomes cutanis secundaris	<b>PCR</b>	<i>polymerase chain reaction</i>
<b>LCSF</b>	limfoma cutani secundari fol·licular	<b>PD-1</b>	<i>programmed death 1</i>
<b>LDCBG</b>	limfoma difús de cèl·lula B gran	<b>PL</b>	papulosi limfomatoide
<b>LDH</b>	lactat deshidrogenasa	<b>PLAID</b>	<i>PLCG2-associated antibody deficiency and immune dysregulation</i>
<b>LES</b>	lupus eritematós sistèmic	<b>PROCLIPI</b>	<i>PROspective Cutaneous Lymphoma International Prognostic Index</i>
<b>LTCD30+</b>	trastorns limfoproliferatius de cèl·lules T CD30+ cutanis primaris	<b>PUVA</b>	psoralèn + radiacions ultraviolades A
<b>M</b>	masculí	<b>RAG</b>	<i>recombination activating gene</i>
<b>MALT</b>	<i>mucosa-associated lymphoid tissue</i>	<b>RC</b>	resposta completa
<b>MF</b>	micosi fungoide	<b>RP</b>	resposta parcial
<b>MFF</b>	micosi fungoide fol·liculotropa	<b>RSS</b>	<i>recombination signal sequences</i>
<b>MYD88</b>	<i>myeloid differentiation 88</i>	<b>S</b>	sensibilitat
<b>NCI</b>	<i>US National Cancer Institute</i>	<b>SB</b>	<i>Southern blotting</i>
		<b>SEM</b>	supervivència específica de la malaltia
		<b>SG</b>	supervivència global

<b>SHF</b>	síndrome hemofagocítica	<b>VIH</b>	virus de la immunodeficiència humana
<b>sp</b>	sang perifèrica	<b>VPN</b>	valor predictiu negatiu
<b>SS</b>	síndrome de Sézary	<b>VPP</b>	valor predictiu positiu
<b>SSCP</b>	anàlisi de polimorfismes conformationals de cadena simple	<b>WHO</b>	<i>World Health Organization</i>
<b>TC</b>	tomografia computada		
<b>TCR</b>	<i>T-cell receptor</i>		
<b>TCRA</b>	cadena alfa del receptor de la cèl·lula T		
<b>TCRB</b>	cadena beta del receptor de la cèl·lula T		
<b>TCRD</b>	cadena delta del receptor de la cèl·lula T		
<b>TCRG</b>	cadena gamma del receptor de la cèl·lula T		
<b>TdT</b>	desoxinucleotidil-transferasa terminal		
<b>TGGE</b>	electroforesi en gel de gradient de temperatura		
<b>TIA1</b>	<i>T-cell intracellular antigen-1</i>		
<b>TLPCP</b>	trastorn limfoproliferatiu cutani primari		
<b>TNMB</b>	<i>tumor, node, metastasis, blood</i>		
<b>TPH</b>	trasplantament de progenitors hematopoètics		
<b>USCLC</b>	<i>United States Cutaneous Lymphoma Consortium</i>		
<b>UVB</b>	radiacions ultraviolades B		
<b>V</b>	segment o regió variable		
<b>VEB</b>	virus Epstein-Barr		
<b>VHB</b>	virus hepatitis B		
<b>VHC</b>	virus hepatitis C		



## LLISTAT DE FIGURES

- 54      Figura 1. Diagnòstic dels limfomes cutanis primaris: correlació clínica-patològica-immunofenotípica i molecular
- 61      Figura 2. Generació de la diversitat a les cadenes pesades de les immunoglobulines
- 62      Figura 3. Generació de la diversitat a les cadenes lleugeres kappa i lambda de les immunoglobulines
- 62      Figura 4. Generació de la diversitat a les cadenes alfa i beta del receptor de cèl·lules T
- 63      Figura 5. Generació de la diversitat a les cadenes gamma i delta del receptor de cèl·lules T
- 83      Figura 6. Exemples dels resultats de clonalitat del TCR/IG obtinguts mitjançant (A) l'anàlisi de fragments fluorescents per electroforesi capil·lar (GeneScan) i (B) l'anàlisi d'heterodúplexs
- 111     Figura 7. Distribució dels casos de trastorns limfoproliferatius de cèl·lules T CD30+ cutanis primaris
- 114     Figura 8. Distribució dels casos diagnosticats d'altres limfomes cutanis de cèl·lules T diferents a la micosi fungoide, la síndrome de Sézary i els trastorns limfoproliferatius de cèl·lules T CD30+ cutanis primaris
- 115     Figura 9. Distribució dels casos de limfomes cutanis de cèl·lules B en funció del diagnòstic específic
- 121     Figura 10. Distribució de les proves de clonalitat del protocol BIOMED-2 realitzades a les biòpsies cutànies en funció del diagnòstic final
- 123     Figura 11. Resultats de clonalitat amb l'ús de les proves TCRG i TCRB a les biòpsies cutànies amb infiltrats limfoides T
- 125     Figura 12. Resultats de clonalitat amb l'ús de les proves IGH (VH-JH) i IGH (DH-JH) a les biòpsies de pell amb infiltrats limfoides B
- 126     Figura 13. Resultats de clonalitat amb l'ús de les proves IGH (VH-JH) i IGK a les biòpsies cutànies amb infiltrats limfoides B
- 135     Figura 14. Associació entre la detecció de clonalitat a les biòpsies cutànies dels pacients amb papulosi limfomatoide i el desenvolupament d'una segona neoplàsia limfoide
- 136     Figura 15. Evolució dels processos limfoproliferatius cutanis de cèl·lules B respecte al diagnòstic
- 137     Figura 16. Evolució dels processos limfoproliferatius cutanis de cèl·lules B respecte a la detecció de clonalitat a les biòpsies de pell



- 138 | Figura 17. Distribució de les proves de clonalitat del protocol BIOMED-2 realitzades a les mostres de sang perifèrica en funció del diagnòstic final
- 139 | Figura 18. Resultats de clonalitat T/B a les mostres de sang perifèrica i comparació dels clons amb els identificats a les biòpsies cutànies
- 140 | Figura 19. Representació gràfica de la mediana d'edat (anys) a la primera visita segons la presència o absència de clonalitat a la sang perifèrica
- 141 | Figura 20. Representació en diagrames de caixes de l'edat a la primera visita segons la presència o absència de clonalitat a la sang perifèrica
- 143 | Figura 21. Supervivència específica de la malaltia als pacients diagnosticats de limfoma cutani de cèl·lules T en funció dels resultats de clonalitat a la pell i a la sang perifèrica
- 143 | Figura 22. Supervivència específica de la malaltia als pacients diagnosticats de micosi fungoide / síndrome de Sézary en funció dels resultats de clonalitat a la pell i a la sang perifèrica
- 144 | Figura 23. Supervivència específica de la malaltia als pacients diagnosticats de micosi fungoide segons els resultats de clonalitat a la pell i a la sang perifèrica
- 244 | Figura suplementària 1. Supervivència global dels pacients diagnosticats de limfoma cutani de cèl·lules T atenent l'estatus clonal a la pell i a la sang perifèrica
- 245 | Figura suplementària 2. Supervivència global dels pacients diagnosticats de micosi fungoide / síndrome de Sézary atenent l'estatus clonal a la pell i a la sang perifèrica
- 245 | Figura suplementària 3. Supervivència global dels pacients diagnosticats de micosi fungoide en funció de l'estatus clonal a la pell i a la sang perifèrica





## LLISTAT DE TAULES

- 34 Taula 1. Freqüència relativa i pronòstic dels limfomes cutanis primaris inclosos en l'actualització de l'any 2018 de la classificació WHO-EORTC
- 37 Taula 2. Estadificació de la micosi fungoide i la síndrome de Sézary d'acord amb la *International Society for Cutaneous Lymphomas (ISCL)* i la *cutaneous lymphoma task force of the European Organisation for Research and Treatment of Cancer (EORTC)*
- 44 Taula 3. Papulosi limfomatoide: tipus histològics i diagnòstics diferencials
- 47 Taula 4. Característiques clíniques, histopatològiques, fenotípiques, genètiques, pronòstiques i terapèutiques dels altres limfomes cutanis primaris de cèl·lules T
- 55 Taula 5. Procés diagnòstic i d'estadificació inicial dels pacients amb limfomes cutanis primaris
- 56 Taula 6. Algoritme diagnòstic de la MF en estadi inicial (*International Society for Cutaneous Lymphomas*)\*
- 60 Taula 7. Segments gènics variables (V), *diversity* (D) i *joining* (J) dels gens de les immunoglobulines i del receptor de la cèl·lula T
- 66 Taula 8. Protocol BIOMED-2: tubs de PCR múltiplex, nombre d'encebadors i mides dels productes de PCR
- 81 Taula 9. Protocol estandarditzat de PCR BIOMED-2
- 87 Taula 10. Sistema EuroClonality / BIOMED-2 per interpretar i emetre informes de clonalitat del TCR/IG davant una sospita de síndrome limfoproliferativa
- 94 Taula 11. Casos d'infiltrats limfoides T/B cutanis benignes utilitzats com a controls sans a l'avaluació de les proves diagnòstiques
- 99 Taula 12. Resum del nombre de biòpsies cutànies i de mostres de sang perifèrica incloses a l'estudi en funció del diagnòstic final
- 100 Taula 13. Diagnòstics dels Limfomes cutanis primaris
- 101 Taula 14. Diagnòstics dels Limfomes cutanis secundaris
- 102 Taula 15. Resum de les característiques dels pacients amb limfomes cutanis primaris i secundaris
- 105 Taula 16. Característiques dels pacients amb limfomes cutanis de cèl·lules T i B
- 107 Taula 17. Estadificació dels casos de micosi fungoide i síndrome de Sézary
- 108 Taula 18. Característiques dels pacients amb micosi fungoide i síndrome de Sézary
- 112 Taula 19. Característiques principals dels pacients amb trastorns limfoproliferatius de cèl·lules T CD30+ cutanis primaris

- 116 Taula 20. Característiques principals dels pacients diagnosticats de limfomes cutanis de cèl·lules B de curs indolent
- 118 Taula 21. Distribució dels casos de dermatosis inflamatòries benignes
- 119 Taula 22. Casos de dermatosis no limfomes amb clonalitat a la pell
- 128 Taula 23. Concordança entre els resultats de clonalitat a les biòpsies de pell obtinguts mitjançant diferents proves del protocol de PCR BIOMED-2
- 129 Taula 24. Mesures de precisió diagnòstica de les proves TCRG i TCRB als limfomes cutanis de cèl·lules T
- 130 Taula 25. Mesures de precisió diagnòstica de les proves TCRG i TCRB a la micosi fungoide
- 131 Taula 26. Paràmetres de validació dels tests diagnòstics TCRG i TCRB als estadis inicials de la micosi fungoide (estadis IA-IIA)
- 133 Taula 27. Mesures de precisió diagnòstica de les proves IGH (VH-JH), IGH (DH-JH) i IGK als limfomes cutanis de cèl·lules B
- 145 Taula 28. Anàlisi multivariable de factors amb possible significació pronòstica per a la supervivència global i la supervivència específica de la malaltia
- 152 Taula 29. Resum dels valors mitjans de sensibilitat i especificitat de les proves de PCR pel TCRG i el TCRB al diagnòstic dels LCCT vs. dermatosis inflamatòries
- 153 Taula 30. Resum dels valors mitjans de sensibilitat i especificitat de les proves de PCR pel TCRG i el TCRB al diagnòstic de la MF vs. dermatosis inflamatòries
- 154 Taula 31. Resum dels valors mitjans de sensibilitat i especificitat de les proves de PCR pel TCRG i el TCRB al diagnòstic de la MF en estadi inicial (IA-IIA) vs. dermatosis inflamatòries
- 227 Taula suplementària 1. Resum de les característiques dels pacients amb altres limfomes cutanis de cèl·lules T
- 229 Taula suplementària 2. Resum de les característiques principals dels casos amb dermatosis no limfomes
- 231 Taula suplementària 3. Mesures de precisió diagnòstica de les proves IGH (VH-JH), IGH (DH-JH) i IGK als limfomes cutanis primaris de la zona marginal
- 232 Taula suplementària 4. Mesures de precisió diagnòstica de les proves IGH (VH-JH), IGH (DH-JH) i IGK als limfomes cutanis primaris centre fol·liculars
- 233 Taula suplementària 5. Supervivència global i supervivència específica de la malaltia segons els resultats de clonalitat a les biòpsies cutànies i a les mostres de sang perifèrica dels pacients amb limfomes cutanis de cèl·lules T

- 233 Taula suplementària 6. Supervivència global i supervivència específica de la malaltia segons els resultats de clonalitat a les biòpsies cutànies i a les mostres de sang perifèrica dels pacients amb micosi fungoide / síndrome de Sézary
- 234 Taula suplementària 7. Supervivència global i supervivència específica de la malaltia atenent els resultats de clonalitat a les biòpsies cutànies i a les mostres de sang perifèrica dels pacients amb micosi fungoide
- 234 Taula suplementària 8. Anàlisi univariable de factors amb possible significació pronòstica per a la supervivència global i la supervivència específica de la malaltia
- 237 Taula suplementària 9. Resum dels resultats de clonalitat a les biòpsies cutànies de LCCT i d'infiltrats limfoides T benignes mitjançant l'anàlisi per PCR
- 242 Taula suplementària 10. Resum dels resultats de clonalitat a les biòpsies cutànies de LCCB i d'infiltrats limfoides B benignes mitjançant l'anàlisi per PCR
- 244 Taula suplementària 11. Correlació dels patrons de clonalitat i l'evolució clínica als pacients amb micosi fungoide i biòpsies cutànies múltiples (seqüencials o síncrones)



27	<b>RESUM</b>
29	<b>SUMMARY</b>
31	<b>1. INTRODUCCIÓ</b>
33	1.1. Limfomes cutanis primaris: definició i classificacions
35	1.2. Micosi fungoide
39	1.3. Variants de micosi fungoide
41	1.4. Síndrome de Sézary
42	1.5. Trastorns limfoproliferatius de cèl·lules T CD30+ cutanis primaris
47	1.6. Altres limfomes cutanis primaris de cèl·lules T
49	1.7. Limfomes cutanis de cèl·lules B
54	1.8. Diagnòstic i diagnòstics diferencials dels limfomes cutanis primaris
58	1.9. Diagnòstic molecular dels limfomes cutanis primaris
67	1.10. Justificació de l'elaboració de la tesi doctoral
69	<b>2. HIPÒTESIS</b>
73	<b>3. OBJECTIUS</b>
75	3.1. Objectiu principal
75	3.2. Objectius secundaris
77	<b>4. MATERIALS I MÈTODES</b>
79	4.1. Pacients i mostres
80	4.2. Protocol de reacció en cadena de la polimerasa (PCR)
82	4.2.1. Anàlisi de fragments fluorescents (GeneScan)
82	4.2.2. Anàlisi d'heterodúplex
83	4.3. Interpretació dels resultats del protocol de PCR EuroClonality / BIOMED-2
88	4.4. Variables d'estudi
88	4.4.1. Variables demogràfiques
88	4.4.2. Variables clíniques



90	4.4.3. Variables moleculars (proves de detecció de clonalitat)
91	4.4.4. Variables morfològiques i immunofenotípiques de les poblacions limfoides a la sang perifèrica
92	<b>4.5. Anàlisi estadística</b>
97	<b>5. RESULTATS</b>
99	<b>5.1. Estadística descriptiva</b>
100	5.1.1. Limfomes cutanis primaris vs. Limfomes cutanis secundaris
104	5.1.2. Limfomes cutanis de cèl·lules T vs. Limfomes cutanis de cèl·lules B
106	5.1.3. Micosi fungoide i síndrome de Sézary
110	5.1.4. Trastorns limfoproliferatius de cèl·lules T CD30+ cutanis primaris
114	5.1.5. Altres limfomes cutanis de cèl·lules T
115	5.1.6. Limfoma cutani primari de la zona marginal vs. Limfoma cutani primari centre fol·licular
118	5.1.7. Dermatitis inflamatòries benignes o reactives
121	<b>5.2. Concordança entre les proves del protocol de PCR BIOMED-2</b>
122	5.2.1. Concordança entre els reordenaments gènics de les cadenes gamma i beta del receptor de la cèl·lula T (TCRG - TCRB)
124	5.2.2. Concordança entre els reordenaments complets (VH-JH) i els incomplets (DH-JH) del gen IGH
125	5.2.3. Concordança entre els reordenaments complets (VH-JH) del gen IGH i els reordenaments del gen IGK (Vκ-Jκ i Vκ/intron-Kde)
127	5.2.4. Concordança de les proves de clonalitat en funció del diagnòstic
129	<b>5.3. Valor diagnòstic de les proves de detecció de clonalitat basades en el protocol de PCR BIOMED-2</b>
129	5.3.1. Limfomes cutanis de cèl·lules T vs. infiltrats limfoides T cutanis benignes
130	5.3.2. Micosi fungoide vs. infiltrats limfoides T cutanis benignes
131	5.3.3. Micosi fungoide en estadis inicials (IA - IIA) vs. infiltrats limfoides T cutanis benignes
132	5.3.4. Limfomes cutanis de cèl·lules B vs. infiltrats limfoides B cutanis benignes
134	5.3.5. Limfoma cutani primari de la zona marginal vs. infiltrats limfoides B cutanis benignes
134	5.3.6. Limfoma cutani primari centre fol·licular vs. infiltrats limfoides B cutanis benignes

135	5.4. Associacions entre la detecció de clonalitat a les biòpsies cutànies i certs esdeveniments clínics
135	5.4.1. Associació entre la detecció de clonalitat a la pell i el desenvolupament d'un segon limfoma en el context d'una papulosi limfomatoide
136	5.4.2. Evolució dels processos limfoproliferatius B cutanis respecte a la detecció de clonalitat a la pell i al diagnòstic
137	5.5. Clonalitat a la sang perifèrica
142	5.6. Valor pronòstic de l'anàlisi genotípica mitjançant PCR BIOMED-2 a les biòpsies cutànies i a les mostres de sang perifèrica de pacients amb limfomes cutanis primaris
142	5.6.1. Anàlisi de supervivència
144	5.6.2. Anàlisi de la clonalitat a la pell i a la sang perifèrica com a factor pronòstic
147	<b>6. DISCUSSIÓ</b>
150	6.1. Valor diagnòstic i pronòstic de l'anàlisi genotípica del TCR mitjançant la PCR BIOMED-2 als limfomes cutanis de cèl·lules T
157	6.2. Valor diagnòstic i pronòstic de l'anàlisi genotípica de IGH i IGK utilitzant la PCR BIOMED-2 als limfomes cutanis de cèl·lules B
160	6.3. Comparació dels clons identificats a les biòpsies cutànies múltiples (seqüencials o síncrones): patró molecular homogeni vs. patró molecular heterogeni
164	6.4. Valor diagnòstic i pronòstic de l'anàlisi genotípica a les mostres de sang perifèrica
169	6.5. Limitacions
171	<b>7. CONCLUSIONS</b>
175	<b>8. LÍNIES DE FUTUR DE LA INVESTIGACIÓ</b>
181	<b>9. BIBLIOGRAFIA</b>
225	<b>10. ANNEX</b>



## RESUM

**Introducció i Objectius:** Els protocols estandarditzats de reacció en cadena de la polimerasa (PCR) BIOMED-2 són àmpliament utilitzats per a la detecció de poblacions clonals de cèl·lules T/B i representen una eina diagnòstica important en l'avaluació dels limfomes cutanis (LC). L'objectiu d'aquest estudi va ser avaluar el valor diagnòstic i pronòstic dels resultats de l'anàlisi genotípica obtinguts a través d'aquestes tècniques en la pràctica clínica diària.

**Mètodes:** 360 mostres de pell van ser revisades retrospectivament de 149 pacients diagnosticats segons la classificació WHO-EORTC com: 114 limfomes cutanis de cèl·lules T (LCCT) i 35 limfomes cutanis de cèl·lules B (LCCB). 249 biòpsies de 180 pacients amb infiltrats limfoides cutanis benignes van servir de controls. De tots els casos es va estudiar teixit fixat en formol i inclòs en parafina, també es van analitzar mostres de sang perifèrica de 179 pacients. Es van avaluar els reordenaments gènics del receptor de la cèl·lula T i de la immunoglobulina mitjançant els protocols de PCR BIOMED-2. La mediana del seguiment va ser de 75.7 i de 45.9 mesos als subjectes amb LC i control, respectivament.

**Resultats:** El protocol de PCR BIOMED-2 és un mètode útil per distingir LCCT d'infiltrats T cutanis benignes amb alta sensibilitat (89.4%) i significativa especificitat (81.5%). També proporciona dades valuoses en el diagnòstic particularment difícil de la micosi fungoide (MF) en estadi inicial que pot imitar dermatosis inflamatòries comunes (sensibilitat = 89.1% i especificitat = 85.5%). L'anàlisi de les recombinacions d'IGH (VH-JH) també ha estat útil per diferenciar LCCB d'infiltrats B cutanis benignes amb elevada sensibilitat (85.7%) i especificitat raonable (82.4%). L'addició d'IGK a l'avaluació d'IGH va augmentar la taxa de detecció de clonalitat del 85.7% al 100%, malgrat, disminuir l'especificitat. Es va identificar heterogeneïtat clonal entre biòpsies seqüencials o de diferents localitzacions en el 14.3% dels LCCT i l'11.8% dels LCCB. La detecció d'un clon T idèntic a la pell i a la sang s'associa amb pitjor supervivència global i específica de la malaltia als pacients amb LC primaris, LCCT i MF/síndrome de Sézary.

**Conclusions:** El protocol de PCR BIOMED-2 ha demostrat ser una estratègia de diagnòstic útil combinat amb les troballes clíniques, histològiques i immunofenotípiques, amb algunes implicacions pronòstiques, per estudiar pacients amb proliferacions limfoides cutànies.



## SUMMARY

---

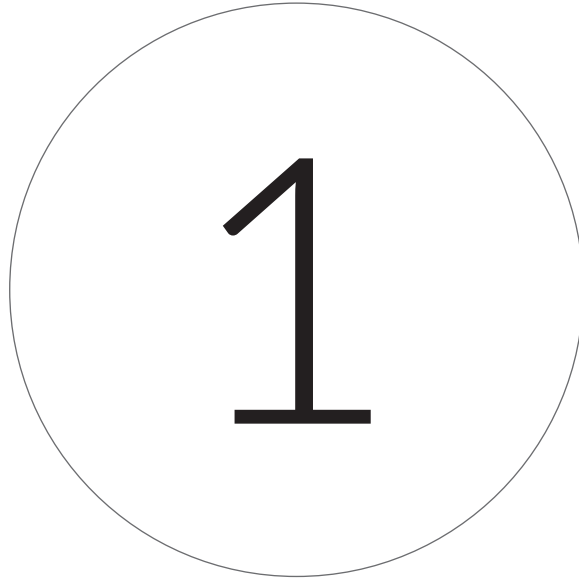
***Introduction and Objectives:*** The standardized BIOMED-2 polymerase chain reaction (PCR) protocols are widely used for detection of clonal populations of T/B-cells and represent an important diagnostic tool in the evaluation of cutaneous lymphomas (CL). The aim of this study was to assess the diagnostic and prognostic value of the genotyping results obtained by these techniques in daily clinical practice.

***Methods:*** 360 skin samples were retrospectively reviewed from 149 patients diagnosed according to the WHO-EORTC classification as: 114 cutaneous T-cell lymphomas (CTCL) and 35 cutaneous B-cell lymphomas (CBCL). 249 biopsies from 180 patients with benign cutaneous lymphoid infiltrates served as controls. From all cases formalin-fixed, paraffin-embedded tissue was studied and in 179 patients peripheral blood samples were also analyzed. T-cell receptor and immunoglobulin gene rearrangements were assessed using BIOMED-2 PCR protocols. Median follow-up was 75.7 and 45.9 months in CL and control subjects, respectively.

***Results:*** The BIOMED-2 PCR protocol is a useful method in order to distinguish CTCL from benign skin T-cell infiltrates with high sensitivity (89.4%) and meaningful specificity (81.5%). Valuable data is also provided in particularly challenging diagnosis of early-stage mycosis fungoides (MF) that may mimic common inflammatory dermatoses (sensitivity = 89.1% and specificity = 85.5%). Analysis of IGH (VH-JH) rearrangements have also been helpful in differentiating CBCL from benign cutaneous B-cell infiltrates with high sensitivity (85.7%) and reasonable specificity (82.4%). The addition of IGK to IGH assessment increased the clonality detection rate from 85.7% to 100% although decreased specificity. Clonal heterogeneity among sequential or different skin sites biopsies was identified in 14.3% of CTCL and 11.8% of CBCL. Detection of an identical T-cell clone in skin and blood is associated with worse overall and disease-specific survival rates in primary CL, CTCL and MF/Sézary syndrome patients.

***Conclusions:*** The BIOMED-2 PCR protocol has proved to be a useful diagnostic strategy combined with clinical, histologic and immunophenotypic findings, with some prognostic implications, for studying patients with skin lymphoid proliferations.





# INTRODUCCIÓ





### 1.1. Limfomes cutanis primaris: definició i classificacions

Els limfomes cutanis primaris (LCP) són un grup heterogeni de processos limfoproliferatius malignes que es presenten a la pell sense evidència de malaltia extracutània en el moment del diagnòstic.(1,2) Són el segon grup més freqüent de limfomes no-Hodgkin extranodals, després dels gastrointestinals. Tot i així, els LCP són neoplàsies poc freqüents amb una incidència anual estimada de 1:100.000.(2,3) Els LCP es divideixen en funció del seu origen cel·lular, en limfomes cutanis de cèl·lules T (LCCT) i limfomes cutanis de cèl·lules B (LCCB). Als països occidentals, els LCCT constitueixen entre el 75% i 80% del total de LCP, i els LCCB el 20%-25%.(1,2)

Els diferents tipus de LCCT i LCCB presenten trets clinicopatològics molt característics, sovint un comportament clínic i pronòstic completament diferents comparats amb limfomes nodals morfològicament similars que poden afectar la pell secundàriament (limfomes cutanis secundaris) i que requereixen un tractament diferent. És per això que, els LCP han estat inclosos com entitats diferenciades en les darreres classificacions dels limfomes. L'any 2005 es va publicar la classificació dels limfomes cutanis fruit d'un consens entre experts de la *World Health Organization* (WHO) i de l'*European Organisation for Research and Treatment of Cancer* (EORTC). Aquesta classificació definia i individualitzava les diverses entitats tenint en compte aspectes clínics, histopatològics, immunofenotípics, genotípics, pronòstics i terapèutics, servint com a *gold standard* pel diagnòstic i la classificació dels LCP.(2) L'esmentada classificació va ser incorporada majoritàriament en successives edicions del llibre blau de l'Organització Mundial de la Salut (OMS) – *International Agency for Research on Cancer* (IARC) de classificació dels tumors dels teixits limfoides i hematopoètics.(4,5) Al setembre de l'any 2018 es va publicar una versió actualitzada de la classificació WHO-EORTC a la 4a edició del llibre blau de l'OMS de classificació dels tumors de la pell.(6)

Des de la publicació de la primera classificació WHO-EORTC s'han produït progressos significatius en diferents àrees del coneixement dels LCP, que s'han traduït en algunes modificacions a la darrera classificació WHO-EORTC (taula 1).

**Taula 1.** Freqüència relativa i pronòstic dels limfomes cutanis primaris inclosos en l'actualització de l'any 2018 de la classificació WHO-EORTC

Classificació WHO-EORTC 2018	Freqüència, %*	SEM als 5 anys, %*
<b>LCCT</b>		
MF	39	88
Variants de MF		
MF fol·liculotropa	5	75
Reticulosi pagetoide	<1	100
Pell laxa granulomatosa	<1	100
SS	2	36
Leucèmia/limfoma de cèl·lules T de l'adult	<1	ND
Trastorns limfoproliferatius de cèl·lules T CD30+ cutanis primaris		
Limfoma anaplàstic de cèl·lules grans cutani primari	8	95
Papulosi limfomatoide	12	99
Limfoma de cèl·lules T subcutani similar a panniculitis	1	87
Limfoma de cèl·lules NK/T extranodal, tipus nasal	<1	16
Infecció crònica activa per VEB	<1	ND
Limfomes cutanis primaris de cèl·lules T perifèriques, subtipus rars		
Limfoma cutani primari de cèl·lules T $\gamma/\delta$	<1	11
Limfoma cutani primari de cèl·lules T CD8 <sup>+</sup> citotòxic epidermotrop agressiu (provisional)	<1	31
Trastorn limfoproliferatiu cutani primari de cèl·lules T CD4 <sup>+</sup> petites/mitjanes (provisional)	6	100
Limfoma cutani primari de cèl·lules T CD8 <sup>+</sup> acral (provisional)	<1	100
Limfoma cutani primari de cèl·lules T perifèriques, no específicat	2	15
<b>LCCB</b>		
Limfoma cutani primari de la zona marginal	9	99
Limfoma cutani primari centre fol·licular	12	95
Limfoma cutani primari difús de cèl·lula gran, tipus cama	4	56
Úlcera mucocutània VEB <sup>+</sup> (provisional)	<1	100
Limfoma de cèl·lules B grans intravascular	<1	72

CD, *cluster of differentiation*; EORTC, *European Organisation for Research and Treatment of Cancer*; LCCB, limfomes cutanis de cèl·lules B; LCCT, limfomes cutanis de cèl·lules T; MF, micosi fungoide; ND, no disponible; NK, *natural killer*; SEM, supervivència específica de la malaltia; SS, síndrome de Sézary; VEB, virus Epstein-Barr; WHO, *World Health Organization*.

\*Basades en les dades incloses en els registres de limfomes cutanis holandès i austríac del 2002 al 2017.

Adaptada de R. Willemze *et al.* (1)

## 1.2. Micosi fungoide

La micosi fungoide (MF) (codi ICD-O 9700/3) és un LCP epidermotrop de limfòcits T petits-mitjans amb nucli cerebriforme. El terme MF s'hauria de reservar pels casos de presentació clàssica, caracteritzats per l'evolució de màcules, plaques i tumors, o per les variants amb un curs clínic similar.(6,7)

La MF és el tipus més freqüent i representa un 60% dels LCCT i gairebé el 50% del total de LCP.(1,2) És més habitual en pacients adults i ancians amb una ràtio de sexe masculí: femení de 2:1, però també es pot observar a la infància i adolescència.(2,6-8)

La MF habitualment té un curs clínic indolent, amb una progressió lenta al llarg dels anys o, fins i tot, dècades des de màcules a plaques cada vegada més infiltrades i eventualment tumors. En els estadis inicials, la MF en la seva forma clàssica es presenta amb màcules eritematoses, de mides variables i predilecció per les zones de pell no fotoexposada. Les plaques de MF són lesions infiltrades, irregulars, més o menys des-camatives i amb un color eritematós o marronós. En els pacients amb MF en estadi tumoral sovint s'observa una combinació de màcules, plaques i tumors, freqüentment ulcerats. En alguns casos, es pot presentar una eritrodèrmia (MF eritrodèrmica), tanmateix, l'afectació de la sang perifèrica absent o mínima (B0/B1) permet distingir-la d'una síndrome de Sézary (SS).(6,7,9)

La histopatologia de les lesions cutànies de MF varia amb l'estadi de la malaltia. Les màcules inicials mostren un infiltrat en banda superficial, majoritàriament constituït per limfòcits i macròfags a una dermis papil·lar fibròtica. Els limfòcits atípics, petits o mitjans, amb un nucli hipercromàtic cerebriforme i envoltats per un petit halo clar alineats al llarg de la capa basal epidèrmica (epidermotropisme basal) i els múltiples limfòcits intraepidèrmics sense espongiós (epidermotropisme 'desproporcionat') representen troballes histopatològiques útils. Tot i així, les biòpsies dels estadis inicials de la MF poden ser inespecífiques fent necessària la realització de múltiples biòpsies fins a assolir el diagnòstic definitiu.(6,7,9,10) A les plaques de MF, l'epidermotropisme és més pronunciat. La presència de col·leccions intraepidèrmiques de limfòcits atípics (microabscessos de Pautrier) és una troballa molt característica, però només s'observa en una minoria dels casos. Amb la progressió a l'estadi tumoral, els infiltrats dèrmics

esdevenen més monomorfs, difusos i profunds i es pot perdre l'epidermotropisme. Els limfòcits tumorals augmenten en nombre i mida, observant proporcions variables de cèl·lules petites, mitjanes i grans amb nuclis pleomòrfics o blàstics. La transformació a cèl·lula gran es defineix per la presència de > 25% de limfòcits grans (4 vegades la mida d'un limfòcit normal) en els infiltrats de la dermis o disposats en nòduls.(11) Aquestes cèl·lules grans poden ser positives o negatives amb la tinció immunohistoquímica per CD30.(6,7)

Els limfòcits neoplàstics de la MF típicament mostren un immunofenotip T col·laborador de memòria  $\alpha/\beta$  (CD2+, CD3+, TCR $\beta$ +, CD5+, CD4+, CD45RO+, CD8- i TCR $\gamma$ -). La pèrdua d'expressió de CD7 és freqüent en tots els estadis de la malaltia. Altres pèrdues d'expressió d'antígens de cèl·lula T (CD2, CD3, CD5) es poden detectar, especialment en estadis avançats.(6,7) S'han descrit múltiples variants immunofenotípiques de MF: casos amb un fenotip citotòxic (CD4- i CD8+), fenotips T CD4-/CD8- o CD4+/CD8+ i, rarament, CD56+ o un fenotip T  $\gamma/\delta$ .(6,7,12) Malgrat tota aquesta possible diversitat immunofenotípica, en els casos de MF en estadi inicial, no s'ha demostrat que tingui cap significació pronòstica independent.(13)

Des del punt de vista genotípic, els gens del receptor de cèl·lules T (TCR, *T-cell receptor*) presenten un reordenament clonal a la majoria dels casos de MF, però el percentatge de casos positius depèn de l'estadi de la malaltia i del mètode de detecció seleccionat.(6,7,14-16)

El factor pronòstic més important a la MF és l'extensió de la malaltia cutània i extracutània, reflectida en l'estadi clínic (taula 2).(17,18)

El tractament de la MF depèn significativament de l'estadi de la malaltia amb les teràpies dirigides a la pell (corticoesteroides tòpics, UVB de banda estreta, PUVA o mostassa nitrogenada) com a principals tractaments dels estadis inicials i les teràpies sistèmiques (retinoide/rexinoide, quimioteràpia, teràpies biològiques o dirigides) pels estadis avançats.(19-21) Els pacients amb una malaltia limitada generalment presenten un pronòstic excel·lent, amb una supervivència similar a la de la població general. A la MF en estadis avançats (IIB-IV), en canvi, el pronòstic sovint és dolent amb tendència a la disseminació extracutània.(6,7,20) L'edat al diagnòstic > 60 anys,

els valors elevats de lactat deshidrogenasa (LDH) en sèrum, la transformació histològica a cèl·lula gran i l'estadi IV s'han identificat com a factors pronòstics independents d'una pitjor supervivència.(22) Actualment està en marxa un estudi prospectiu multicèntric de col·laboració internacional (PROCLIP, *PROspective Cutaneous Lymphoma International Prognostic Index*) amb l'objectiu de desenvolupar un índex pronòstic per a la MF/SS, similar al que ja des de fa anys s'utilitza en diversos limfomes no hodgkinians sistèmics per estratificar els pacients i prendre decisions terapèutiques.(23,24)

**Taula 2. Estadificació de la micosi fungoide i la síndrome de Sézary d'acord amb la *International Society for Cutaneous Lymphomas (ISCL)* i la *cutaneous lymphoma task force of the European Organisation for Research and Treatment of Cancer (EORTC)***

Estadis TNMB	
<b>Pell (T)</b>	
T1	Màcules, pàpules i/o plaques limitades que cobreixen < 10% de la superfície cutània. Es pot estratificar encara més en T1a (només màcules) vs T1b (plaques ± màcules)
T2	Màcules, pàpules o plaques limitades que cobreixen ≥ 10% de la superfície cutània. Es pot estratificar encara més en T2a (només màcules) vs T2b (plaques ± màcules)
T3	Un o més tumors (≥ 1 cm de diàmetre)
T4	Eritrodèrmia (confluència d'eritema que cobreix ≥ 80% de la superfície corporal)
<b>Ganglis limfàtics (N)</b>	
N0	No ganglis limfàtics perifèrics clínicament anormals <sup>§</sup> ; biòpsia no requerida.
N1	Ganglis limfàtics perifèrics clínicament anormals; histopatologia Dutch grau 1 o NCI LN0-2 N1a: Clon negatiu <sup>#</sup> N1b: Clon positiu <sup>#</sup>
N2	Ganglis limfàtics perifèrics clínicament anormals; histopatologia Dutch grau 2 o NCI LN3 N2a: Clon negatiu <sup>#</sup> N2b: Clon positiu <sup>#</sup>
N3	Ganglis limfàtics perifèrics clínicament anormals; histopatologia Dutch graus 3-4 o NCI LN4; clon positiu o negatiu

Nx	Ganglis limfàtics perifèrics clínicament anormals, no confirmació histopatològica			
<b>Visceral (M)</b>				
M0	No afectació d'òrgans viscerals			
M1	Afectació visceral (ha de tenir confirmació patològica <sup>¶</sup> i s'ha d'especificar l'òrgan implicat)			
<b>Sang (B)</b>				
B0	Absència d'afectació significativa a la sang: $\leq 5\%$ dels limfòcits de la sang perifèrica són cèl·lules atípiques (cèl·lules de Sézary) <sup>  </sup> B0a: Clon negatiu <sup>#</sup> B0b: Clon positiu <sup>#</sup>			
B1	Càrrega tumoral baixa a la sang: $> 5\%$ dels limfòcits de la sang perifèrica són cèl·lules atípiques (cèl·lules de Sézary) però no compleix els criteris de B2 B1a: Clon negatiu <sup>#</sup> B1b: Clon positiu <sup>#</sup>			
B2	Càrrega tumoral alta a la sang: evidència d'un clon de cèl·lules T positiu <sup>#</sup> més un dels següents: (1) $\geq 1000/\mu\text{L}$ cèl·lules de Sézary (2) $\text{r}\grave{\text{a}}\text{t}\text{i}\text{o}$ CD4/CD8 $\geq 10$ (3) cèl·lules CD4+CD7- $\geq 40\%$ o CD4+CD26- $\geq 30\%$			
<b>Estadi</b>	<b>T</b>	<b>N</b>	<b>M</b>	<b>B</b>
IA	T1	N0	M0	B0, B1
IB	T2	N0	M0	B0, B1
IIA	T1, T2	N1, N2	M0	B0, B1
IIB	T3	N0, N1, N2	M0	B0, B1
IIIA	T4	N0, N1, N2	M0	B0
IIIB	T4	N0, N1, N2	M0	B1
IVA1	T1-T4	N0, N1, N2	M0	B2
IVA2	T1-T4	N3	M0	B0-B2
IVB	T1-T4	N0, N1, N2, N3	M1	B0-B2

LN, lymph nodes; NCI, US National Cancer Institute; TNMB, tumor, node, metastasis, blood.

<sup>§</sup> Els gangli(s) limfàtics perifèrics anormals indiquen qualsevol gangli limfàtic perifèric palpable que a l'exploració física sigui dur, irregular, agrupat, fix o de  $\geq 1.5$  cm de diàmetre. Els territoris ganglionars explorats a l'examen físic inclouen: cervical, supraclavicular, epitroclear, axil·lar i inguinal.

<sup>¶</sup> L'afectació esplènica i hepàtica pot ser diagnosticada amb proves d'imatge.

<sup>||</sup> Les cèl·lules de Sézary es defineixen com limfòcits amb nuclis hiperconvolutos cerebriformes.

<sup>#</sup> Un clon de cèl·lules T es defineix per l'anàlisi del gen del TCR mitjançant PCR o Southern blot.

Adaptada d'E. Olsen *et al.* (18)

### 1.3. Variants de micosi fungoide

S'han descrit múltiples variants clinicopatològiques de MF (hipopigmentada, hiperpigmentada, ampul·lar/vesiculosa, ictiosiforme, etc.) que poden simular una àmplia varietat de malalties inflamatòries de la pell però que tenen un curs clínic similar a la MF clàssica, motiu pel qual no es consideren separatament a les classificacions actuals. (12,25–27) Contràriament, la MF fol·liculotropa (MFF), la reticulosi pagetoide i la pell laxa granulomatosa (GSS, *granulomatous slack skin*) mostren unes característiques clinicopatològiques distintives i pronòstics diferents que justifiquen una consideració separada a la classificació de la WHO-EORTC.(1,6)

La MFF (codi ICD-O 9700/3) és una variant de MF (10% del total de casos) caracteritzada per infiltrats fol·liculotrops, sovint amb molt poca afectació de l'epidermis interfol·licular, i unes lesions cutànies que es localitzen preferentment a la regió del cap i coll i que associen freqüentment alopecia.(6,12)

Els pacients mostren màcules, pàpules fol·liculars agrupades, plaques infiltrades o tumors. Les lesions poden adoptar un patró acneïforme (comedons, quists i pústules) o tipus queratosi pilar/liquen espinulós i sovint s'acompanyen d'alopecia. Excepcionalment pot presentar-se com una lesió solitària (MFF unilesional) o amb una eritrodèrmia.(6,12,28)

Des del punt de vista histopatològic, la MFF es caracteritza per infiltrats limfoides T perifol·liculars CD4+. L'epidermis interfol·licular sovint està respectada. Molts casos mostren degeneració mucinosa dels fol·licles pilosos (mucinosi fol·licular). Ocasionalment s'acompanya d'infiltració de les glàndules sudorípares ecrines (siringotropisme). La destrucció de l'epiteli dels fol·licles pilosos pot donar lloc a una reacció granulomatosa a cos estrany. Amb la progressió, els infiltrats dèrmics es tornen més difusos i poden contenir un nombre creixent de cèl·lules d'aspecte blàstic. La transformació a cèl·lula gran s'ha descrit en més d'un 20% dels casos de MFF. Els limfòcits neoplàstics tenen un fenotip T CD3+/CD4+/CD8-. La majoria de casos presenten un reordenament clonal dels gens del TCR.(6,12,29)



El pronòstic de la MFF ha estat objecte d'estudi i debat en diversos treballs amb resultats controvertits. Les primeres publicacions suggerien un pitjor pronòstic en comparació amb la MF clàssica, equiparable a la MF en estadi tumoral.(30,31) Tanmateix, articles recents diferencien dos subgrups, un de curs indolent (estadi inicial de MFF) i l'altre amb un curs agressiu (estadi avançat de MFF).(32,33) Els individus amb una MFF en estadi inicial presenten un curs indolent i es poden beneficiar de teràpies dirigides a la pell no agressives.(34)

La reticulosi pagetoide (codi ICD-O 9700/3) és una variant rara de MF caracteritzada per una proliferació intraepidèrmica de cèl·lules T neoplàstiques.(2,6,12,35)

Els pacients amb reticulosi pagetoide característicament es presenten amb una màcula o placa solitària, psoriasiforme o hiperqueratòtica, de creixement lent i habitualment localitzada a les zones acrals de les extremitats, mans o peus.

Les mostres de biòpsia cutània ensenyen una hiperplàsia epidèrmica amb una infiltració marcada per limfòcits atípics petits o mitjans amb uns nuclis cerebriformes i un fenotip CD4-/CD8+ o, amb menor freqüència, CD4+/CD8- o CD4-/CD8-. A més a més, sovint es demostra expressió de CD30. Els gens del TCR estan reordenats clonalment a la majoria dels casos.(6,12,35)

El pronòstic de la reticulosi pagetoide és excel·lent. A diferència de la MF clàssica, no s'han descrit casos de disseminació extracutània o morts relacionades amb la malaltia.(2) Les modalitats de tractament preferides són la radioteràpia local o l'exèresi quirúrgica.

La pell laxa granulomatosa (codi ICD-O 9700/3) és una variant extremadament rara de MF que es caracteritza pel desenvolupament d'uns plecs cutanis pènduls amb un infiltrat granulomatós i cèl·lules T clonals.(2,36) Les lesions inicials són màcules i plaques típiques de la MF clàssica però que evolucionen a uns plecs cutanis pènduls i redundants amb pell atròfica a les aixelles i engonals. Aproximadament una tercera part dels pacients associen un altre limfoma maligne, especialment la MF i el limfoma de Hodgkin.(36)

Des del punt de vista histopatològic, destaca un infiltrat granulomatós a la dermis i que s'estén al teixit subcutani. Aquest infiltrat està compost per cèl·lules T CD4+ clonals mesclades amb abundants macròfags. La presència de cèl·lules gegants multinucleades, l'elastofagocitosi i la pèrdua de fibres elàstiques són troballes característiques. (36,37) Els gens del TCR presenten un reordenament clonal en la majoria dels casos. (6,12,38)

La pell laxa granulomatosa mostra un curs clínic indolent i lentament progressiu, no obstant, respon escassament als tractaments convencionals. Tenint en compte el risc augmentat d'un segon limfoma maligne, és necessari un seguiment a llarg termini d'aquests pacients.(12,36,38)

#### 1.4. Síndrome de Sézary

La SS (codi ICD-O 9701/3) es defineix clàssicament per la tríada d'eritrodèrmia, limfadenopaties generalitzades i la presència de cèl·lules T neoplàstiques amb relació clonal i nucli cerebriforme (cèl·lules de Sézary) a la pell, als ganglis limfàtics i a la sang perifèrica.(1,6) La SS i la MF són neoplàsies estretament relacionades, però són considerades entitats separades en base a diferències en el curs clínic i les cèl·lules d'origen. (6) Estudis moleculars han demostrat que les cèl·lules tumorals a la SS deriven de cèl·lules T de memòria centrals, en canvi, a la MF són cèl·lules T de memòria efectores residents a la pell.(39,40)

És una malaltia rara, representant < 5% del total de LCCT. Apareix en adults, típicament de més de 60 anys, i té una predominança pel gènere masculí.(6,41) La majoria de pacients es presenten amb una eritrodèrmia (definida per un eritema generalitzat que afecta  $\geq 80\%$  de la superfície corporal), sovint exfoliativa i intensament pruriginosa. Les limfadenopaties ( $\geq 1.5$  cm de mida) són habituals. La queratodèrmia palmoplantar, les distròfies unguials, l'ectropi i l'alopecia són altres manifestacions clíniques freqüents.(6,41,42)

Les troballes histopatològiques de la SS poden ser similars a les de la MF. Tanmateix, els infiltrats perivasculars superficials o en banda poden ser escassos, l'epidermotropisme pot ser mínim o absent i, fins en un terç de les biòpsies cutànies de pacients, la

histopatologia pot resultar inespecífica.(6,41,43) Alguns marcadors immunohistoquímics, com ara l'expressió de *programmed death 1* (PD-1 o CD279), la pèrdua d'expressió de CD7, els nombres baixos de limfòcits T CD8+ i l'increment de limfòcits proliferants (Ki-67+) poden ser útils en el diagnòstic diferencial histopatològic.(44,45)

El diagnòstic de SS requereix la demostració d'un clon de limfòcits a la sang perifèrica més un dels següents criteris hematològics: un recompte absolut de cèl·lules de Sézary  $\geq 1000/\mu\text{L}$ , una expansió de la població de cèl·lules T CD4+ resultant en una ràtio CD4/CD8  $\geq 10$ , o una pèrdua d'un o més antígens de cèl·lules T (CD4+CD7-  $\geq 40\%$  i/o CD4+CD26-  $\geq 30\%$ ). (18,46) De fet, la forma més acurada de definir i categoritzar l'afectació a la sang perifèrica (classe B de la classificació TNMB; taula 2) està sent motiu de debat des de fa anys. L'any 2018 l'EORTC va proposar definir les diferents categories d'afectació hemoperifèrica (B0, B1 i B2) segons els recomptes absoluts de les cèl·lules T CD4+CD7- o CD4+CD26- utilitzant la citometria de flux. D'acord amb aquestes recomanacions, la classe B2, definitiva de la SS, presenta xifres de cèl·lules CD4+CD7- o CD4+CD26-  $\geq 1000/\mu\text{L}$  més la demostració d'un clon de cèl·lules T a la sang perifèrica.(47) És una àrea en la qual la recerca està dirigida des de fa anys a identificar nous biomarcadors (CD158k/KIR3DL2, receptors de quimiocines CCR4 i CCR7, alteracions en l'expressió gènica de *PLS3*, *TWIST1*, *DNM3* o *STAT4*, etc.) i criteris que siguin rellevants pel diagnòstic, el tractament i el pronòstic.(48-53)

La SS és una malaltia agressiva, amb una mediana de supervivència després del diagnòstic de 4 anys i una supervivència global als 5 anys del 42.3%.(42) La majoria de pacients moren d'infeccions oportunistes, raó per la qual s'ha d'intentar prioritzar aquells tractaments que preservin la immunitat de l'individu en comptes d'agreuja la immunosupressió inherent a la neoplàsia.(6,41)

### 1.5. Trastorns limfoproliferatius de cèl·lules T CD30+ cutanis primaris

Els trastorns limfoproliferatius de cèl·lules T CD30+ cutanis primaris (LTCD30+) són el segon grup més comú de LCCT, representant aproximadament el 25-30% dels casos. Aquest grup inclou un espectre d'entitats entre les quals trobem la papulosi limfomatoide (PL), el limfoma anaplàstic de cèl·lules grans cutani primari (LCACG), i casos *borderline*.(1,2,6) La característica fenotípica distintiva comuna a tots ells és

l'expressió de CD30 als limfòcits T atípics. El CD30 és un receptor de citocina que pertany a la superfamília de receptors del factor de necrosi tumoral i que està implicat en el control del creixement de les cèl·lules neoplàstiques.(54-56) Tot i que la PL, el LCACG i les lesions *borderline* exhibeixen un solapament histopatològic i fenotípic; la presentació clínica i el curs clínic permeten, a la majoria dels casos, establir un diagnòstic definitiu.(1,6,57,58)

La PL (codi ICD-O 9718/1) va ser descrita per primera vegada per Warren L. Macaulay com una erupció cutània papulonodular, crònica, recurrent i autoinvolutiva amb trets histològics d'un limfoma maligne.(59) Des de llavors s'ha mantingut el debat sobre si la PL representa un trastorn limfoproliferatiu benigne o si s'hauria de considerar un limfoma maligne de baix grau. L'etiopatogènia de la PL és en gran part desconeguda.(54,55)

La PL es presenta més sovint en adults (mediana d'edat: 45 anys) amb una ràtio masculí: femení entre 2-3:1.(6,57,60) La PL es manifesta clínicament amb pàpules i petits nòduls, que freqüentment afecten el tronc i les extremitats. Característicament, coexisteixen lesions cutànies en diversos estadis evolutius. El nombre de lesions és variable i les lesions individuals regressen espontàniament en poques setmanes o mesos. A vegades les lesions s'ulceren i deixen cicatrius discròmiques varioliformes després de la regressió. L'afectació de la mucosa oral és poc habitual.(61) La duració de la malaltia és molt variable, des d'algunes setmanes a anys o, fins i tot, dècades. Alguns pacients amb PL desenvolupen una segona neoplàsia limfoide, particularment una MF, un limfoma de Hodgkin, o limfomes anaplàstics de cèl·lules grans cutanis o nodals. La prevalença d'aquests limfomes associats a PL descrita a la bibliografia varia àmpliament de 0-62% dels pacients.(62)

Des del punt de vista histopatològic, es reconeixen cinc variants histològiques (tipus A-E) i un tipus genotípic de PL amb reordenament a 6p25.3 (taula 3).(63) Cal tenir en compte que diversos tipus histològics poden estar presents sincrònicament en un mateix individu i que cap tipus de PL ha demostrat tenir una significació pronòstica o terapèutica.(64) No obstant, és important conèixer la diversitat histopatològica de la PL per evitar errors diagnòstics i possibles confusions amb limfomes cutanis agressius.(65,66)

Taula 3. Papulosi limfomatoide: tipus histològics i diagnòstics diferencials

Tipus histològic de PL (freqüència relativa)	Histologia	Fenotip predominant	Diagnòstics diferencials principals
A (>80%)	Infiltrat dèrmic en falca. Limfòcits grans atípics CD30+ dispersos o en petits cúmuls. Histïocits, eosinòfils i neutròfils barrejats.	CD4+, CD8-	MF transformada a cèl·lula gran Limfoma Hodgkin Picades d'artròpodes Pitiriasi liquenoide
B (<5%)	Infiltrat epidermotrop de limfòcits petits-mitjans amb expressió variable de CD30.	CD4+, CD8-	MF en estadi de plaques
C (~10%)	Infiltrat nodular cohesiu de limfòcits grans atípics CD30+. Escasses cèl·lules reactives.	CD4+, CD8-	LACG cutani primari o secundari MF transformada i CD30+
D (<5%)	Epidermotropisme prominent de limfòcits atípics amb expressió de CD8 i CD30.	CD4-, CD8+	Limfoma cutani primari de cèl·lules T CD8+ citotòxic epidermotrop agressiu
E (<5%)	Infiltrat angioinvasor de limfòcits atípics CD30+. Hemorràgia, necrosi i ulceració.	CD4-, CD8+	Limfoma cutani primari de cèl·lules T $\gamma/\delta$ Limfoma de cèl·lules NK/T extranodal, tipus nasal
<i>amb reordenament DUSP22-IRF4</i> (<5%)	Patró bifàsic: epidermotropisme extens de limfòcits T petits-mitjans (similar a la reticulosi pagetoide) i limfòcits grans atípics CD30+ a la dermis.	CD4-, CD8+ CD4-, CD8-	MF transformada

DUSP22, *dual specificity phosphatase 22*; IRF4, *interferon regulatory factor 4/multiple myeloma 1* (IRF4/MUM1); LACG, limfoma anaplàstic de cèl·lula gran; MF, micosi fungoide; PL, papulosi limfomatoide.

Adaptada de R. Willemze *et al.* (1) i W. Kempf *et al.* (54)

Alguns autors han proposat un esquema de terminologia descriptiva basant-se en la informació histològica, fenotípica, genotípica i de presentació clínica de cada cas de PL.(67)

Les cèl·lules limfoides atípiques de la PL exhibeixen un fenotip de cèl·lules T col·laboradores activades CD30+. Aquestes cèl·lules CD30+ expressen majoritàriament CD4. Tanmateix, s'observa un fenotip CD8+ en tots els casos de PL tipus D, en la majoria dels casos del tipus E, i sovint en les PL de la infància.(65,66,68)

El reordenament monoclonal dels gens del TCR es detecta en un 40%-90% dels casos de PL.(69) A més a més, s'han demostrat reordenaments idèntics en alguns casos de limfomes associats a la PL.(70-72)

La immensa majoria de pacients amb PL tenen un pronòstic excel·lent, motiu pel qual es pot optar per una conducta expectant. En els casos amb lesions de PL nombroses, disseminades o estigmatitzants, la fototeràpia o el metotrexat a dosis baixes són els tractaments de primera elecció. Tenint en compte el risc incrementat de desenvolupar una segona neoplàsia limfoide, es recomana fer un seguiment dels pacients amb PL a llarg termini.(58)

El LCACG (codi ICD-O 9718/3) està constituït per infiltrats de cèl·lules T grans amb un pleomorfisme nuclear prominent i que expressen majoritàriament l'antigen CD30. (2,6) L'etiologia del LCACG és desconeguda.

El LCACG es manifesta majoritàriament en homes en la sisena dècada de la vida com un tumor solitari de creixement ràpid o nòduls agrupats amb tendència a la ulceració. Aproximadament un 20% dels pacients presenten lesions multifocals a diferents localitzacions anatòmiques. Es pot observar regressió tumoral espontània parcial o completa, similar a la PL, en un 10%-42% dels LCACG.(57,58) Tot i així, les recurrències cutànies d'aquest limfoma són freqüents. La disseminació extracutània ocorre en un 10%-12% dels casos, i principalment afecta els ganglis limfàtics regionals.(57,73,74)

Des del punt de vista histopatològic, el LCACG mostra infiltrats nodulars cohesius de cèl·lules limfoides grans que s'estenen a la dermis profunda o teixit subcutani. Les cèl·lules tumorals exhibeixen una morfologia pleomòrfica, anaplàstica o immunoblàstica amb nuclis rodons irregulars i citoplasma pàl·lid abundant. A la majoria dels casos, s'observen escasses cèl·lules reactivas com neutròfils o eosinòfils acompanyants. Les cèl·lules tumorals tenen un fenotip de cèl·lula T CD4+ activada, amb pèrdua variable de CD2, CD3, CD5 i CD7. L'expressió de proteïnes citotòxiques (granzima B, *T-cell intracellular antigen-1* (TIA1) i perforina) és freqüent. Alguns casos poden tenir un fenotip de cèl·lula T CD4-/CD8+ o CD4+/CD8+. Per definició, l'expressió de CD30 es demostra en >75% de les cèl·lules neoplàstiques. A diferència dels limfomes anaplàstics de cèl·lules grans (LACG) sistèmics, la majoria dels LCACG expressen el *cutaneous lymphocyte antigen* (CLA), però no expressen *epithelial membrane antigen* (EMA) o *anaplastic lymphoma kinase* (ALK).(6,54) El reordenament monoclonal dels gens del TCR es detecta en un 90% dels casos.(75) La translocació t(2;5)(p23;q35) que implica els gens *ALK/nucleophosmin* (*NPM*), identificada en aproximadament el 60% dels LACG sistèmics, habitualment no està present en els LCACG.(76) No obstant, recentment s'han descrit alguns casos poc freqüents de LCACG ALK+.(77) És fonamental davant un LCACG ALK(+) realitzar un estudi d'extensió complet a fi de descartar un limfoma cutani secundari.(78) Els reordenaments de *DUSP22-IRF4* al locus 6p25.3 es troben en un 25% dels casos de LCACG.(79,80)

La majoria de pacients amb LCACG presenten un pronòstic favorable amb una taxa de supervivència als 10 anys del 90%.(6,54,57,73)

L'exèresi quirúrgica i la radioteràpia són els tractaments de primera línia pels LCACG solitaris o agrupats i el metotrexat per les lesions multifocals.(58) La quimioteràpia basada en antraciclina s'ha utilitzat per aquells casos amb disseminació extracutània més enllà dels ganglis limfàtics locoregionals. Tanmateix, en els últims anys, s'han publicat diversos estudis sobre un anticòs monoclonal anti-CD30, el brentuximab vedotin, amb resultats terapèutics prometedors en diferents limfomes sistèmics CD30+ i també en LCP CD30+, entre els quals s'inclouen pacients amb LCACG.(74,81)

## 1.6. Altres limfomes cutanis primaris de cèl·lules T

Els altres LCCT diferents a la MF, la SS i els LTCD30+ representen, en conjunt, menys del 10% dels LCCT.(1,2) Les característiques clíniques, histopatològiques, immuno-fenotípiques, genètiques, així com, el pronòstic i tractament d'aquests altres tipus de LCCT estan resumits a la taula 4.

Taula 4. Característiques clíniques, histopatològiques, fenotípiques, genètiques, pronòstiques i terapèutiques dels altres limfomes cutanis primaris de cèl·lules T

LCCT (codi ICD-O)	Clínica	Histopatologia	Immunofenotip	Anàlisi genotípica	Pronòstic Tractament
<b>Limfoma de cèl·lules T subcutani similar a panniculitis (9708/3)</b>	F > M Associació amb malalties autoimmunes (LES): ≤ 20% Nòduls o plaques subcutanis Extremitats i tronc Lipoatròfia (invulsió) Síntomes sistèmics: ≤ 50% SHF: 15% - 20% (82,83)	Infiltrats als lòbuls del teixit adipós subcutani Epidermis i dermis respectades Limfòcits atípics, pleomorfisme nuclear, al voltant dels adipòcits "rimming" Macròfags vacuolars, absència de cèl·lules plasmàtiques i cèl·lules dendrítiques plasmocitoides (82-87)	CD3+, CD4-, CD8+ βF1+, TCRγ-, TCRδ- proteïnes citotòxiques (granzima B / TIA1 / perforina)+ Ki-67 elevat a les cèl·lules atípiques CD56-, CD123-, EBER- (82,83,85,86)	Reordenament TCR monoclonal (86,88,89)	Supervivència global als 5 anys: 80% SHF: pronòstic dolent (83,84)  Immunosupressors (ciclosporina, prednisona, etc.) (6,83,90)
<b>Limfoma de cèl·lules NK/T extranodal, tipus nasal (9719/3)</b>	M > F, adults Àsia, Amèrica central i del sud Nòduls i plaques ± ulceració, lesions similars a abscessos o cel·lulitis, màcules eritematoses o purpúriques Tronc i extremitats Síntomes sistèmics SHF Afectació extracutània (tracte aerodigestiu superior) (2,6,91-96)	Infiltrat a la dermis ± hipodermis ± epidermis Angioinvasió, destrucció vascular i necrosi extensa Cèl·lules mitjanes > grans o petites, nuclis irregulars (2,6,93,95)	CD3ε citoplasmàtic+, proteïnes citotòxiques+, CD56+ i EBER+ CD3 superfície-, CD4-, CD8-, CD5- ~10% casos: CD8+ o CD4+, TCR+ (origen cèl·lula T) (93,95,97)	TCR sovint en configuració germinal, però alguns casos són monoclonals (2,6,95)	Curs molt agressiu Supervivència global als 5 anys: 26% Afectació extracutània: pronòstic dolent (6,92-94,98)  Quimioteràpia (L-asparaginasa, platins), radioteràpia, TPH (99,100)
<b>Limfoma cutani primari de cèl·lules T γ/δ (9726/3)</b>	M = F, adults Presentació variable: màcules, plaques, tumors ± ulceració Generalitzat, extremitats Disseminació a mucoses i altres localitzacions extranodals Síntomes B SHF freqüent: 50% (2,6,83,101-104)	3 patrons: epidermotrop, dèrmic i subcutani (combinacions) Cèl·lules neoplàstiques mitjanes o grans Angioinvasió i necrosi (2,6,83,101-103,105,106)	CD3+, CD2+, CD4-, CD8±, CD5-, CD7±, CD56+ i EBER- βF1-, TCRγ+, TCRδ+ i proteïnes citotòxiques+ (2,6,83,89,95,102,103)	Reordenament clonal dels gens del TCRG i TCRD (2,6,101,103)	Curs agressiu Supervivència mediana de 12 mesos Pitjor pronòstic: patró subcutani (6,83,102)  Quimioteràpia sistèmica, TPH (2,83,95,103)



<b>Limfoma cutani primari de cèl·lules T CD8<sup>+</sup> citotòxic epidermotrop agressiu (9709/3)</b>	M > F, adults Pàpules, plaques, nòduls o tumors amb necrosi central (ulceració) i crostes hemorràgiques Ràpida progressió Difuses o localitzades, mucoses Disseminació visceral (pulmons, testicles, sistema nerviós central) (6,95,107-110)	Epidermotropisme marcat Limfòcits atípics petits, mitjans o grans Necrosi epidermica Siringotropisme i fol·liculotropisme (6,95,107,108,110,111)	CD3+, CD8+, $\beta$ F1+, CD45RA+, proteïnes citotòxiques+ i Ki-67 elevat CD2-, CD4-, CD5- CD7 $\pm$ , CD30-, CD56- i EBER- (2,6,95,107,108,111)	Reordenament clonal dels gens del TCR (2,6,108,111)	Curs agressiu Supervivència mediana de 12 mesos (6,108,110)  Quimioteràpia sistèmica, TPH (95,110)
<b>Trastorn limfoproliferatiu cutani primari de cèl·lules T CD4<sup>+</sup> petites/mitjanes (9709/1)</b>	Nòdul, placa o tumor solitari Cara, coll o tronc superior Absència de màcules o plaques típiques de MF (1,6,112-115)	Infiltrat dens, difús o nodular a la dermis amb tendència a infiltrar el teixit cel·lular subcutani Epidermotropisme focal Cèl·lules T pleomòrfiques petites o mitjanes < 30% cèl·lules pleomòrfiques grans Cèl·lules acompanyants: limfòcits T CD8+ petits reactius, limfòcits B, cèl·lules plasmàtiques i histiòcits (inclòs cèl·lules gegants multinucleades) (1,6,112-114,116)	CD3+, CD4+, CD8-, CD30-, marcadors de cèl·lules T col·laboradores fol·liculars (PD-1/CD279, BCL6 i CXCL13)+, Ki-67 baix (<20%), proteïnes citotòxiques-, CD56- i EBER- (1,6,112,113,116,117)	Reordenament clonal dels gens del TCR en la majoria dels casos (6,112-117)	Pronòstic excel·lent  Radioteràpia local, cirurgia o corticosteroides intralesionals Possibilitat de remissió espontània post-biòpsia (6,112, 113, 115,117)
<b>Limfoma cutani primari de cèl·lules T CD8<sup>+</sup> acral (9709/3)</b>	M > F, adults Pàpula o nòdul eritematos solitari Orelles, nas i extremitats inferiors Creixement lent en setmanes o mesos (1,6,118-121)	Proliferació monòtona difusa a la dermis i teixit cel·lular subcutani, zona de Grenz Limfòcits atípics mitjans amb nuclis irregulars i nuclèols petits Agregats de limfòcits B reactius Ocasional epidermotropisme mínim (1,6,118,120)	CD3+, CD8+, TIA1+, $\beta$ F1+, CD68+ CD4-, CD2 $\pm$ , CD5 $\pm$ , CD7 $\pm$ , granzima B-, perforina-, CD56-, CD30-, CD10-, BCL6-, PD-1-, CXCL13-, EBER- Ki-67 baix (<10%) (1,6,120,122,123)	Reordenament clonal dels gens del TCR en la majoria dels casos (1,6,118-123)	Molt bon pronòstic  Cirurgia o radioteràpia local Possibles recidives cutànies (1,6,118, 120,122,123)
<b>Limfoma cutani primari de cèl·lules T perifèriques, no especificat<sup>§</sup></b>	M > F, adults Variable Nòduls, plaques o tumors $\pm$ ulceració Generalitzats > solitari o localitzats Progressió ràpida No MF prèvia o sincrona (2,124-130)	Infiltrats nodulars o difusos dèrmics i subcutanis Cèl·lules pleomòrfiques mitjanes o grans Cèl·lules neoplàstiques grans > 30% de l'infiltrat Epidermotropisme lleu o absent (2,124)	CD3+, CD4 $\pm$ , CD8 $\pm$ , CD30- o restringit a escasses cèl·lules tumorals disperses $\beta$ F1+, CD56 $\pm$ , proteïnes citotòxiques $\pm$ i EBER- Ki-67 elevat (2,124,125)	Reordenament clonal dels gens del TCR en alguns casos (129,130)	Curs generalment agressiu Supervivència específica de la malaltia als 5 anys: 15%  Quimioteràpia sistèmica, TPH, radioteràpia (1, 2, 124,127, 128, 130)

BCL6, *B-cell lymphoma 6*; CD, *cluster of differentiation*; CXCL13, *C-X-C Motif Chemokine Ligand 13*; EBER, *Epstein-Barr virus encoded small RNA*; F, femení; ICD-O, *International Classification of Diseases for Oncology*; LCCT, limfoma cutani de cèl·lules T; LES, lupus eritematos sistèmic; M, masculí; MF, micosi fungoide; PD-1, *programmed death 1*; SHF, síndrome hemofagocítica; TCR, *T-cell receptor*; TCRD, *T-cell receptor delta*; TCRG, *T-cell receptor gamma*; TPH, trasplantament de progenitors hematopoètics.

<sup>§</sup> Diagnòstic d'exclusió reservat per aquells casos de LCCT que no compleixen els criteris necessaris per ser inclosos en una categoria ben definida de LCCT de la classificació actual WHO-EORTC pel limfomes cutanis primaris. (2,6)

## 1.7. Limfomes cutanis de cèl·lules B

Els LCCB són un grup de neoplàsies de limfòcits B que es presenten a la pell sense evidència de malaltia extracutània en el moment del diagnòstic. Els LCCB representen, en els països occidentals, el 20%-25% dels LCP. A la classificació de la WHO-EORTC dels LCP actual (taula 1) es reconeixen cinc entitats diferents en els LCCB, entre les quals en destaquen tres. El limfoma cutani primari de la zona marginal (LCPZM) i el limfoma cutani primari centre fol·licular (LCPCF) com a LCCB de curs indolent. Per altra banda, el limfoma cutani primari difús de cèl·lules B grans, tipus cama (LCPDCBG, TC) com a LCCB de curs clínic agressiu.(1,2,131,132) El LCPZM és el més freqüent al nostre entorn (50%), seguit pel LCPCF (45'7%) i, finalment el LCPDCBG, TC (3'3%).(133)

El LCPZM (codi ICD-O 9699/3) afecta principalment adults en la cinquena o sisena dècada de la vida amb un predomini en el sexe masculí.(6,134,135)

Des del punt de vista etiopatogènic, el LCPZM pot desenvolupar-se com a resultat d'una estimulació antigènica crònica (tatuatges, vacunes, infecció per *Borrelia burgdorferi* a zones endèmiques d'Europa).(136,137)

Clínicament el LCPZM es presenta com a pàpules, plaques o nòduls eritematosos o violacis, multifocals o solitaris, localitzats preferentment al tronc i les extremitats superiors.(135) Recentment s'ha descrit en els pacients amb LCPZM una elevada associació amb trastorns gastrointestinals i malalties autoimmunes.(138)

La histopatologia del LCPZM es caracteritza per infiltrats nodulars o difusos a la dermis, sovint disposats al voltant dels vasos o els annexes, i que poden estendre's al teixit cel·lular subcutani.(139) Aquests infiltrats estan constituïts per limfòcits petits, cèl·lules plasmàtiques i fol·licles amb centres germinals reactius. Les cèl·lules plasmàtiques típicament es troben a la perifèria de l'infiltrat i a la zona subepidèrmica. Habitualment s'observa una zona de Grenz que separa l'infiltrat dèrmic de l'epidermis suprajacent. Les cèl·lules neoplàstiques expressen marcadors de cèl·lules B incloent el CD19, CD20, CD79a i *paired box* (PAX) 5. També són positives pel *B-cell lymphoma* 2 (BCL2), però negatives pel CD5, CD10, BCL6 i ciclina D1. Les cèl·lules plasmàtiques mostren majoritàriament expressió monotípica de cadenes lleugeres kappa ( $\kappa$ ) o lamb-

da ( $\lambda$ ) de les immunoglobulines (IG) mitjançant tècniques immunohistoquímiques o d'hibridació in situ (definida per una ràtio  $\kappa : \lambda > 5$  o  $< 0.5$ ).<sup>(140)</sup> Les cèl·lules T reactives poden ser prominents.<sup>(6,131,141-143)</sup> Estudis recents suggereixen l'existència de dos tipus de LCPZM.<sup>(144,145)</sup> Un subtipus amb canvi d'isotip/classe de la cadena pesada de les IG caracteritzat per l'expressió de IgG, IgA o IgE i un nombre elevat de cèl·lules T, i un subtipus menys freqüent sense canvi de classe de la cadena pesada de les IG que mostra una proliferació de limfòcits B neoplàstics que expressen IgM i sovint *C-X-C Motif Chemokine Receptor 3* (CXCR3). Aquest segon grup comparteix moltes característiques amb els limfomes MALT (*mucosa-associated lymphoid tissue*) d'altres localitzacions extranodals.<sup>(1,141,145)</sup>

Es detecta un clon de cèl·lules B a la majoria dels LCPZM.<sup>(146)</sup> Ocasionalment, es poden detectar clons diferents en biòpsies cutànies obtingudes de localitzacions diferents o en diferents moments de l'evolució de la malaltia.<sup>(147,148)</sup>

El pronòstic del LCPZM és favorable, amb una taxa de supervivència específica de la malaltia als 5 anys del 99%.<sup>(1)</sup> Les recurrències cutànies són habituals (aproximadament el 40% dels casos), contràriament, la disseminació extracutània succeeix rarament i sol observar-se en pacients amb malaltia multifocal de llarga evolució, en LCPZM del subtipus IgM+ i en aquells casos amb transformació a limfoma de cèl·lula gran.<sup>(6,135,143,145)</sup>

Des del punt de vista del tractament, per les lesions solitàries o localitzades de LCPZM es recomanen com a primera elecció la radioteràpia local o l'exèresi quirúrgica. El rituximab intralesional també pot ser una bona alternativa terapèutica.<sup>(149)</sup> En els casos de LCPZM multifocal es pot optar per una actitud expectant, o bé radioteràpia local d'aquelles lesions més simptomàtiques, o el rituximab per via intravenosa. En els pacients amb LCPZM solitari o multifocal i evidència d'infecció per *Borrelia burgdorferi* es recomana l'ús d'antibiòtics actius enfront aquest patògen.<sup>(150)</sup>

El LCPCF (codi ICD-O 9597/3) és l'altre tipus de LCCB de curs indolent. És una neoplàsia de cèl·lules del centre fol·licular, incloent els centròcits i números variables de centroblasts, amb un patró de creixement fol·licular, difús o mixt (fol·licular i difús).<sup>(2,6)</sup>

Clínicament el LCPCF es presenta amb pàpules, plaques, nòduls o tumors, eritematosos o violacis i de mida variable. Les lesions cutànies poden ser solitàries o agrupades i es localitzen preferentment a la regió cefàlica o al tronc.(2,6,142) Aproximadament el 5% dels casos es presenten amb lesions cutànies a les cames i el 15% amb lesions cutànies multifocals.(134,151,152) El LCPCF afecta principalment adults de mitjana edat (mediana d'edat al diagnòstic de 60 anys) amb una ràtio masculí : femení de 1.5:1. (6,134,142,152)

Des del punt de vista histopatològic, el LCPCF es caracteritza per una proliferació limfoide dèrmica amb freqüent extensió al teixit cel·lular subcutani. Els infiltrats de les lesions inicials poden tenir una distribució perivascular i periannexial, donant lloc a possibles confusions amb infiltrats limfocítics reactius.(142) A diferència de les hiperplàsies fol·liculars cutànies (pseudolinfomes de cèl·lules B nodulars), els LCPCF amb un patró fol·licular mostren sovint uns fol·licles limfoides mal definits i de diferents mides, amb una proliferació de cèl·lules BCL6+ del centre germinal immerses en unes malles irregulars de cèl·lules dendrítiques fol·liculars CD21+/CD23+/CD35+, sense macròfags amb cossos tingibles, amb una zona del mantell atenuada o absent i un índex proliferatiu (Ki-67+) moderat, tot i que, sense restricció als centres germinals. (6,139,153) En els LCPCF amb un patró difús s'observa una població monòtona de centròcits grans i centroblasts. L'índex de proliferació en els casos difusos és generalment alt.(6)

Les cèl·lules neoplàstiques generalment expressen un immunofenotip CD20+, CD79a+, PAX5+, BCL6+, BCL2- amb expressió variable de CD10.(142,154) El CD10 pot ser positiu en els casos amb un patró de creixement fol·licular, no obstant, és habitualment negatiu en els casos amb un patró difús.(134,151,155)

Els gens de les IG mostren un reordenament clonal amb hipermutacions somàtiques a la majoria dels casos.(146,148,156)

Ateses les diferències significatives en el curs clínic, pronòstic i tractament, és important distingir els LCPCF dels casos en els que un limfoma fol·licular sistèmic afecta secundàriament la pell (limfoma cutani secundari fol·licular, (LCSF)). La presentació clínica i la histopatologia poden resultar indistingibles i, per això, la diferenciació es

basarà en l'estudi d'extensió complet i l'ajuda d'algunes tècniques immunohistoquímiques. Estudis inicials indicaven que els LCPCF, a diferència dels LCSF, majoritàriament no expressaven BCL2 i que la translocació t(14;18)(IGH;BCL2) era negativa. (2,142,153,154,157,158) No obstant, altres estudis han demostrat nivells d'expressió de BCL2 variables i la presència de la translocació t(14;18)(IGH;BCL2) en alguns casos de LCPCF.(155,159-164)

Una altra diferenciació important és entre el LCPCF amb un patró de creixement difús i el LCPDCBG, TC donat que tenen un pronòstic clarament diferent i requereixen un abordatge terapèutic distint.(1) En aquest sentit, les tincions negatives per IRF4/MUM1, *forhead box P1* (FOXP1) i IgM juntament amb l'absència de la mutació *myeloid differentiation 88* (MYD88) c.818T>C (p.L265P) recolzen el diagnòstic de LCPCF enfront del de LCPDCBG, TC.(1,6,134,142,151,165-167)

El LCPCF té un pronòstic excel·lent amb una taxa de supervivència als 5 anys superior al 95%.(1,6,134,152) La localització a les cames ha estat identificada com un factor de pronòstic advers en els LCPCF.(134,151)

En els pacients amb lesions solitàries o localitzades de LCPCF, habitualment s'opta per la radioteràpia local o la cirurgia.(150) L'ús de l'anticòs monoclonal, rituximab, pot ser per via intralesional en casos amb un nombre limitat de lesions o intravenosa en els casos amb lesions multifocals extenses.(149) Les recidives cutànies són freqüents, aproximadament en un 30% dels casos, però no indiquen progressió de la malaltia, tanmateix la disseminació extracutània és infreqüent (al voltant d'un 10% dels casos).(134,152)

El LCPDCBG, TC (codi ICD-O 9680/3) és un limfoma cutani primari difús de cèl·lules B grans compost exclusivament per centroblasts i immunoblasts que més habitualment apareix a les cames.

El LCPDCBG, TC típicament afecta a dones d'edat avançada (mediana d'edat al diagnòstic de 76 anys).(6,142,168) Clínicament es presenta amb tumors de creixement ràpid, eritematosos o violacis, afectant una o ambdues cames. Malgrat la denominació d'aquesta neoplàsia, un 10% - 15% dels casos apareixen a altres localitzacions anatòmiques.(6,134,142,151,152)

Des del punt de vista histopatològic, el LCPDCBG, TC consisteix en un infiltrat difús, confluent, monòton i no epidermotrop de centroblasts i immunoblasts.(6,168) Les figures de mitosi són freqüents. Les cèl·lules T reactives són escasses i sovint limitades als espais perivasculars. Les cèl·lules neoplàstiques expressen CD20, CD79a i PAX5. A diferència dels LCPCF, els LCPDCBG, TC habitualment expressen intensament BCL2, IRF4/MUM1, FOXP1, MYC i IgM citoplasmàtica amb coexpressió de IgD a la meitat dels casos.(151,154,165,166,169) L'índex proliferatiu és elevat. El marcador de centre germinal BCL6 és positiu en la majoria dels casos, però també pot estar disminuït, mentre que la tinció per CD10 és negativa.(154)

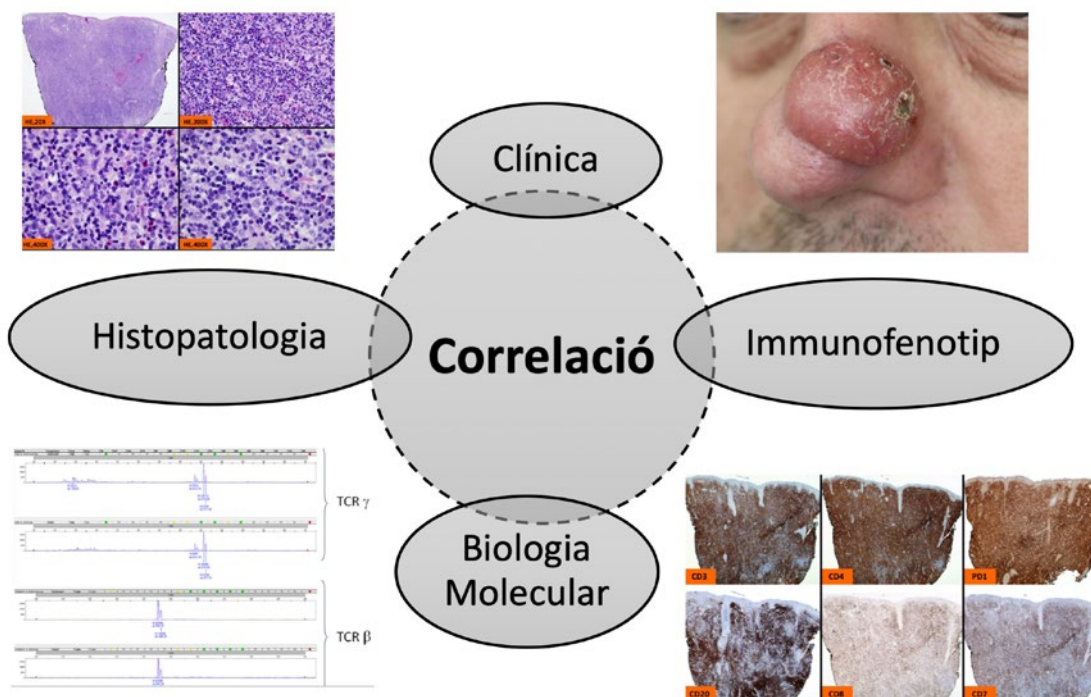
El LCPDCBG, TC presenta moltes similituds amb limfomes difusos de cèl·lules B grans (LDCBG) d'altres localitzacions com ara el sistema nerviós central i els testicles, en canvi, mostra diferències marcades amb el LCPCF amb una proliferació difusa de cèl·lules B grans.(6,170) El LCPDCBG, TC té el perfil d'expressió gènica dels LDCBG nodals de cèl·lules B activades.(171) Les mutacions c.818T>C (p.L265P) del gen *MYD88*, trobades en dos terços dels pacients, juntament amb altres mutacions menys freqüents que afecten diversos gens implicats en la via de senyalització del receptor de la cèl·lula B (*CARD11*, *CD79B*, *TNFAIP3/A20*) suggereixen una activació constitutiva de la via nuclear factor kappa B (NF-κB).(172–174) L'estudi mutacional mitjançant *next-generation sequencing* (NGS) a les mostres dels pacients amb LCPDCBG, TC podria tenir implicacions en la predicció de resposta als tractaments i en la selecció de les teràpies dirigides.(175)

El LCPDCBG, TC és un limfoma cutani primari de curs agressiu, amb una taxa de supervivència als 5 anys d'aproximadament el 50%.(1,168,176) La disseminació extracutània és freqüent en aquesta neoplàsia. Aquells pacients en els quals l'edat i les comorbiditats no contraindiquen l'ús de rituximab intravenós i règims de poliquimoteràpia presenten millors resultats clínics.(177) Les lesions múltiples en el moment del diagnòstic, la inactivació del gen *CDKN2A* observada en un 67% dels casos ja sigui per deleció de 9p21.3 o per hipermetilació del promotor i la mutació *MYD88* c.818T>C (p.L265P) han estat identificades com a factors pronòstics adversos.(134,176,178–180)

## 1.8. Diagnòstic i diagnòstics diferencials dels limfomes cutanis primaris

El diagnòstic dels LCP es fonamenta en una integració acurada de les dades clíniques i patològiques, incloent la informació dels estudis immunofenotípics i moleculars (figura 1). A la taula 5 s'especifiquen els aspectes de la història clínica, l'exploració física i les proves complementàries a tenir en consideració pel diagnòstic i l'estadificació inicial dels pacients amb sospita d'un LCP.(18,181-185) Malgrat l'esforç en establir una bona correlació clinicopatològica, en alguns casos, només l'evolució ens confirmarà el diagnòstic, motiu pel qual el seguiment d'aquests pacients resulta fonamental.(139,186)

Figura 1. Diagnòstic dels limfomes cutanis primaris: correlació clínica-patològica-immunofenotípica i molecular



Taula 5. Procés diagnòstic i d'estadificació inicial dels pacients amb limfomes cutanis primaris

<b>Història clínica i exploració física completa</b>	Síntomes B Tipus de lesions cutànies: màcules, pàpules, plaques, nòduls, tumors, eritrodèrmia Superfície corporal afectada (BSA, %) Ulceració Palpació dels territoris ganglionars perifèrics Palpació de l'abdomen per descartar organomegàlies
<b>Anatomia patològica</b>	Biòpsia(es) de pell: preferentment punch $\geq 4$ mm o fus de la zona més infiltrada Patró de creixement: epidermotrop, nodular, difús, subcutani, angiocèntric/angiodestructiu i intravascular Citomorfologia: limfòcits petits, mitjans o grans Altres: annexotropisme, infiltrats granulomatosos, etc. Biòpsia ganglionar: si gangli clínicament o radiològicament sospitosos ( $\geq 1.5$ cm si MF/SS o $> 1$ cm en altres LCP) <sup>†</sup> Biòpsia de medul·la òssia: en LCP de curs clínic intermedi o agressiu, valorar en LCPCF <sup>†</sup>
<b>Immunofenotip<sup>†</sup></b>	CD2, CD3, CD4, CD5, CD7, CD8, CD20, CD30 CD79a, CD10, BCL2, BCL6, Ki-67, $\kappa/\lambda$ , IRF4/MUM1 $\beta$ F1, TCR $\gamma$ , TCR $\delta$ , CD56, EBER, TIA1, granzima B, perforina, CD3 $\epsilon$ , PD-1, CXCL13, CD45RA, CD45RO, ALK, EMA, PAX5, CD21, CD23, CD35, IgM, FOXP1, ciclina D1
<b>Biologia Molecular<sup>†</sup></b>	Estudi dels reordenaments dels gens del TCR i/o IGH a les biòpsies de pell, ganglionars i mostres de sang perifèrica Estudi de translocacions: t(2;5)(p23;q35) <i>ALK/NPM</i> , t(14;18)(q32;q21) <i>IGH/BCL2</i> , 6p25.3 <i>DUSP22/IRF4</i> Estudi de mutacions o delecions: MYD88 L265P, 9p21
<b>Laboratori<sup>†</sup></b>	Hemograma, bioquímica general, LDH $\beta$ 2-microglobulina, VIH, VHB, VHC, HTLV-1, proteïnograma, serologia <i>Borrelia burgdorferi</i> , prova d'embaràs Estudi morfològic (cèl·lules de Sézary) i citometria de flux dels limfòcits de la sang perifèrica: ràtio CD4/CD8, CD4+CD7-, CD4+CD26-
<b>Radiologia<sup>†</sup></b>	Radiografia de tòrax Ecografia dels grups ganglionars perifèrics TC amb contrast de tòrax, abdomen, pelvis $\pm$ coll <sup>18</sup> F-FDG-PET/TC del cos sencer

ALK, *anaplastic lymphoma kinase*; BCL, *B-cell lymphoma*; BSA, *Body Surface Area*; CD, *cluster of differentiation*; CXCL13, *C-X-C Motif Chemokine Ligand 13*; DUSP22, *dual specificity phosphatase 22*; EBER, *Epstein-Barr virus encoded small RNA*; EMA, *epithelial membrane antigen*; <sup>18</sup>F-FDG-PET, fluor-18 fluorodesoxiglucosa - tomografia per emissió de positrons; FOXP1, *forhead box P1*; HTLV-1, *human T-cell leukaemia virus type 1*; IGH, cadena pesada de les immunoglobulines; IRF4/MUM1, *interferon regulatory factor 4/multiple myeloma 1*;  $\kappa/\lambda$ , cadenes lleugeres kappa/lambda; LCP, limfomes cutanis primaris; LCPCF, limfoma cutani primari centre fol·licular; LDH, lactat deshidrogenasa; MF/SS, micosi fungoide/síndrome de Sézary; MYD88, *myeloid differentiation 88*; NPM, *nucleophosmin*; PAX5, *paired box 5*; PD-1, *programmed death 1*; TC, tomografia computada; TCR, *T-cell receptor*; TIA1, *T-cell intracellular antigen-1*; VHB, virus hepatitis B; VHC, virus hepatitis C; VIH, virus de la immunodeficiència humana.

<sup>†</sup> No s'han de realitzar totes les proves o tècniques de forma sistemàtica; cal seleccionar aquelles que siguin adequades en el context clinicopatològic de cada cas.



Els LCP, sobretot en els seus estadis inicials, poden simular clínica i histopatològicament una àmplia varietat de dermatosis inflamatòries benignes. Per altra banda, hi han diversos processos limfoproliferatius reactius benignes (pseudolinfomes cutanis) que poden mimetitzar histopatològicament i/o clínicament els limfomes cutanis. (139,186) Existeixen diverses situacions clíniques en les que el diagnòstic diferencial amb patologies inflamatòries de la pell és especialment freqüent i, en ocasions, difícil.

**Micosi fungoide:** Els estadis maculars o en plaques inicials de la MF poden ser molt difícils de distingir de diverses dermatosis inflamatòries benignes, entre les quals s'inclouen les dermatitis de contacte limfomatoïdes, les erupcions a fàrmacs limfomatoïdes, les dermatosis purpúriques pigmentades, el líquen pla, les fases inflamatòries inicials del líquen esclerós i atròfic o del vitiligen, entre moltes altres.(7,139,186–192) En aquest sentit, la ISCL va publicar l'any 2005 una proposta d'algoritme per ajudar en el diagnòstic de la MF en els estadis inicials (taula 6).(10)

Taula 6. Algoritme diagnòstic de la MF en estadi inicial (*International Society for Cutaneous Lymphomas*)\*

Críteris	Puntuació
<b>Clínic</b>	
<u>Bàsic</u> Màcules o plaques fines persistents i/o progressives <u>Addicionals</u> <ul style="list-style-type: none"> <li>Localització en zones no fotoexposades</li> <li>Variació de mida/forma</li> <li>Poiquilodèrma</li> </ul>	2 punts pel criteri bàsic i dos criteris addicionals 1 punt pel criteri bàsic i un criteri addicional
<b>Histopatològics</b>	
<u>Bàsic</u> Infiltrat limfoide superficial <u>Addicionals</u> <ul style="list-style-type: none"> <li>Epidermotropisme sense espongiosi</li> <li>Atípia limfoide†</li> </ul>	2 punts pel criteri bàsic i dos criteris addicionals 1 punt pel criteri bàsic i un criteri addicional
<b>Biologia molecular</b>	
Reordenament genètic del TCR clonal	1 punt per clonalitat
<b>Immunopatològics</b>	
<ul style="list-style-type: none"> <li>&lt; 50% de cèl·lules T CD2+, CD3+ i/o CD5+</li> <li>&lt; 10% de cèl·lules T CD7+</li> <li>Discordança epidermis/dermis en l'expressió de CD2, CD3, CD5 o CD7‡</li> </ul>	1 punt per un o més criteris

MF, micosi fungoide; TCR, *T-cell receptor*.

\*Es requereix un total de 4 punts pel diagnòstic de MF basant-se en qualsevol combinació de punts dels criteris clínics, histopatològics, de biologia molecular i immunopatològics.

† L'atípia limfoide ve definida per la presència de cèl·lules amb nuclis engrandits hiper cromàtics i contorns nuclears irregulars o cerebriformes.

‡ Dèficit d'expressió dels antígens de cèl·lula T confinat a l'epidermis.

Adaptada de N. Pimpinelli *et al.* (10)

**Síndrome de Sézary:** L'eritrodèrmia és la forma de presentació clínica habitual dels pacients amb SS, tanmateix cal tenir en compte que el diagnòstic diferencial clínic i histopatològic d'un pacient adult eritrodèrmic és molt ampli. A més a més de la SS, la MF també es pot manifestar ocasionalment com una eritrodèrmia. Dins el grup de les eritrodèrmies inflamatòries benignes destaquen la psoriasi, la dermatitis atòpica, les reaccions cutànies adverses per fàrmacs, la pitiriasi rubra pilar o les dermatitis de contacte, entre altres.(44,193–196) La complexitat diagnòstica encara es veu incrementada al existir pacients amb eritrodèrmies d'evolució crònica i recalcitrant, a vegades associades a expansions clonals de limfòcits immunofenotípicament anòmals CD4+CD7-CD26- a la sang perifèrica, tot i que amb unes xifres inferiors a les requerides per establir un diagnòstic definitiu de SS. Aquests casos van ser designats inicialment com a síndrome de pre-Sézary i, posteriorment, com a discràsies monoclonals de cèl·lules T de significat incert.(197–199) És important el seguiment a llarg termini d'aquests pacients atesa la possibilitat imprecisa d'evolució a una SS al llarg dels anys.

**Trastorns limfoproliferatius de cèl·lules T CD30+ cutanis primaris:** El diagnòstic diferencial dels LTCD30+, particularment de la PL, és extens i inclou nombrosos processos inflamatoris reactius o infecciosos en els que es poden identificar cèl·lules grans CD30+ disperses a l'infiltrat limfoide mixt dèrmic. Les reaccions a picades d'artròpodes, l'escabiosi (nòduls escabiòtics), certes infeccions víriques (mol·luscs contagiosos, orf/ectima contagiosa, nòdul del munyidor, herpes simple, herpes zòster), determinades reaccions a fàrmacs limfomatoïdes i la pitiriasi liquenoide i varioliforme aguda són alguns exemples.(54,139,186,200–202) Generalment aquests processos reactius cutanis CD30+, en comparació amb els LTCD30+, presenten un nombre menor de cèl·lules CD30+ i aquestes es distribueixen de forma més dispersa en un infiltrat ric amb limfòcits B i cèl·lules plasmàtiques.(139) Resulta molt útil si a la biòpsia

cutània s'identifica, encara que sigui subtilment, alguna troballa característica del procés específic subjacent.(139,186)

**Limfomes cutanis de cèl·lules B indolents:** Els LCCB de curs indolent, LCPZM i LCPCF, sovint es presenten clínicament com els pseudolinfomes de cèl·lules B nodulars o les hiperplàsies limfoides cutànies. Aquests processos reactius s'han associat en alguns casos amb injeccions de substàncies subcutànies (els pigments dels tatuatges o les sals d'alumini d'algunes vacunes) i en zones endèmiques d'Europa a la infecció per *Borrelia burgdorferi*. Habitualment aquests processos reactius amb un predomini de cèl·lules B mostren a la histopatologia centres germinals reactius, macròfags amb cossos tingibles, un índex proliferatiu (Ki-67+) elevat però restringit als centres germinals i unes xarxes molt ben definides de cèl·lules dendrítiques fol·liculars CD21+/CD23+. A més a més, generalment es demostra una expressió politípica de cadenes lleugeres de les immunoglobulines i els estudis moleculars de reordenament dels gens de la cadena pesada de les immunoglobulines (IGH) són freqüentment policlonals. La fase inflamatòria d'algunes connectivopaties, especialment l'esclerodèrmia localitzada o morfea, també pot presentar infiltrats limfoides densos a la dermis que simulen un LCPZM.(139,186)

A les darreres dècades nombrosos estudis han buscat identificar mitjançant diferents tècniques de laboratori, marcadors immunofenotípics que facilitin el diagnòstic diferencial dels LCP respecte als seus possibles imitadors inflamatoris benignes. (44,49,193,195,196) De la mateixa manera, també s'ha explorat l'aportació dels estudis moleculars d'anàlisi genotípica del TCR, IGH o IGK al diagnòstic dels LCP. (14,136,203-207)

### 1.9. Diagnòstic molecular dels limfomes cutanis primaris

Els limfòcits T i B són les cèl·lules protagonistes del sistema immunològic adaptatiu que, en condicions normals, és capaç de reconèixer una enorme diversitat d'antígens diferents. Aquesta propietat està determinada per l'expressió d'uns receptors de membrana que reconeixen específicament un antigen. Aquests receptors per l'antigen són el *T-cell receptor* (TCR) en els limfòcits T i el *B-cell receptor* (BCR) o immunoglobulina (IG) de membrana o superfície en les cèl·lules B. Els TCR són unes proteïnes

heterodímers de cadenes  $\alpha$  i  $\beta$ , o menys freqüentment, de la combinació de cadenes  $\gamma$  i  $\delta$ . En canvi, les IG de membrana estan constituïdes per dues cadenes pesades (IGH) idèntiques unides mitjançant enllaços disulfur a dues cadenes lleugeres idèntiques  $\kappa$  (IGK) o  $\lambda$  (IGL). Ambdós tipus de receptors per l'antigen, TCR i IG, presenten una regió variable (V) diferent i específica per cada clon de limfòcits T/B i on té lloc la unió al antigen i, una regió constant (C).(208)

Els gens que codifiquen les IG i els TCR estan compostos de múltiples segments gènics, anomenats *variable* (V), *diversity* (D) i *joining* (J) que es recombinen al atzar durant les fases inicials del desenvolupament o maduració dels limfòcits B i T, respectivament (taula 7). Els segments D només estan presents en els gens de la IGH, de la cadena  $\beta$  del TCR (TCRB) i de la cadena  $\delta$  del TCR (TCRD).(209,210) Els nombrosos segments gènics V, D i J s'agrupen en famílies o subgrups en funció de l'homologia.

El procés de recombinació o reordenament gènic V(D)J està mediat per un complex enzimàtic recombinasa en el qual les proteïnes *recombination activating gene* (RAG) 1 i 2 exerceixen una funció principal en el reconeixement de les seqüències molt conservades de set nucleòtids (heptàmers) anomenades *recombination signal sequences* (RSS) i l'escissió de la doble cadena d'àcid desoxiribonucleic (ADN). La recombinació gènica s'inicia amb el reordenament d'un segment gènic D amb un segment J, seguida per la unió d'un segment V al DJ reordenat prèviament. En el cas dels gens IGK, IGL, cadena  $\alpha$  del TCR (TCRA) i cadena  $\gamma$  del TCR (TCRG), al no tenir segments D, es produeix directament el reordenament entre un segment V i un de J per formar un exó VJ. Les seqüències d'ADN entre els segments gènics reordenats s'eliminen en forma de fragments circulars d'ADN.(208,211)

Taula 7. Segments gènics variables (V), *diversity* (D) i *joining* (J) dels gens de les immunoglobulines i del receptor de la cèl·lula T

Gen (Locus)	Segments gènics				Total <sup>#</sup>	Longitud (kb)	Repertori <sup>§</sup>
	Variables (V)	Diversity (D)	Joining (J)	Constants (C)			
IGH (14q32.33)	123 - 129	27	9	11	170 - 176	1250	10 <sup>7</sup>
IGK (2p11.2)	40 - 76	0	5	1	46 - 82	1820	6·10 <sup>4</sup>
IGL (22q11.2)	73 - 74	0	7 - 11	7 - 11	87 - 96	1050	4·10 <sup>4</sup>
TCRA / TCRD (14q11.2)	54 / 8	0 / 3	61 / 4	1 / 1	116 / 16	1000	10 <sup>4</sup> / 10 <sup>8</sup>
TCRB (7q34)	64 - 67	2	14	2	82 - 85	620	10 <sup>8</sup>
TCRG (7p14)	12 - 15	0	5	2	19 - 22	160	10 <sup>4</sup>

IGH, cadena pesada de les immunoglobulines; IGK, cadena lleugera kappa de les immunoglobulines; IGL, cadena lleugera lambda de les immunoglobulines; TCRA, cadena alfa del receptor de la cèl·lula T; TCRB, cadena beta del receptor de la cèl·lula T; TCRD, cadena delta del receptor de la cèl·lula T; TCRG, cadena gamma del receptor de la cèl·lula T. <sup>#</sup> Nombre total de segments d'aquell gen per un genoma haploide. <sup>§</sup> Té en compte la diversitat combinatòria, la diversitat de la unió (inserció o deleció de nucleòtids a les unions) i, en el cas dels gens IGH, IGK i IGL, també les mutacions hipersomàtiques.

La recombinació gènica de IG i del TCR generalment segueix un ordre jeràrquic. Durant la maduració dels limfòcits B a la medul·la òssia, primer es reordena el gen IGH, seguidament el gen IGK que pot donar lloc a una cèl·lula B amb expressió de IGH/k o, alternativament es produeix la deleció del gen IGK i el reordenament del gen IGL per formar un limfòcit B IGH/λ+. Per altra banda, durant la maduració dels limfòcits T al timus, inicialment es reordena el gen TCRD, a continuació el TCRG, resultant potencialment en una cèl·lula T amb expressió del TCRγδ o seguit d'un reordenament del gen TCRB i, finalment, la deleció del gen TCRD i la conseqüent recombinació del gen TCRA. Tenint en compte aquest ordre seqüencial en els reordenaments dels gens que codifiquen per les quatre cadenes (α, β, γ i δ) del TCR, s'entén perquè els limfòcits T madurs amb un fenotip αβ també presenten el gen TCRG reordenat encara que aquest no s'expressa.(211)

Les nombroses combinacions diferents possibles entre els segments gènics V, D i J units produeix la diversitat combinatòria del repertori de limfòcits B i T i que s'estima en aproximadament 2·10<sup>6</sup> per les IG, 3· 10<sup>6</sup> per les molècules TCRαβ i 5·10<sup>3</sup> per les molècules TCRγδ. A més a més, en els llocs d'unio dels segments V, D i J es produeixen

delecions i insercions de nucleòtids a càrrec de l'enzim desoxinucleotidil-transferasa terminal (TdT) en el moment en que aquests segments gènics s'uneixen. Precisament aquesta diversitat a la unió és la que contribueix majoritàriament a la diversitat de receptors per l'antigen estimada en ser superior a  $10^{12}$  molècules de IG i TCR diferents. (208,211,219) De fet, com a conseqüència de la diversitat a la unió, les proteïnes de IG i del TCR mostren la major variabilitat en les unions de les regions variable i constant, que formen la tercera regió hipervariable o la regió determinant de la complementarietat (CDR) 3. Aquestes regions CDR3 també són les parts més importants de les IG i del TCR que determinen l'especificitat de la unió a l'antigen.(208)

Finalment, els limfòcits B madurs poden incrementar encara més el seu repertori de IG al entrar en contacte amb els antígens als centres germinals dels fol·licles limfoides mitjançant les hipermutacions somàtiques, un procés que comporta una maduració en l'afinitat de les molècules d'IG pels seus antígens específics. Les hipermutacions somàtiques són principalment mutacions d'un únic nucleòtid i, ocasionalment, insercions o delecions de nucleòtids que afecten els segments V dels gens IGH, IGK o IGL (figures 2 - 5).(220)

Figura 2. Generació de la diversitat a les cadenes pesades de les immunoglobulines

## Des dels gens IGH fins a les cadenes pesades d'immunoglobulina

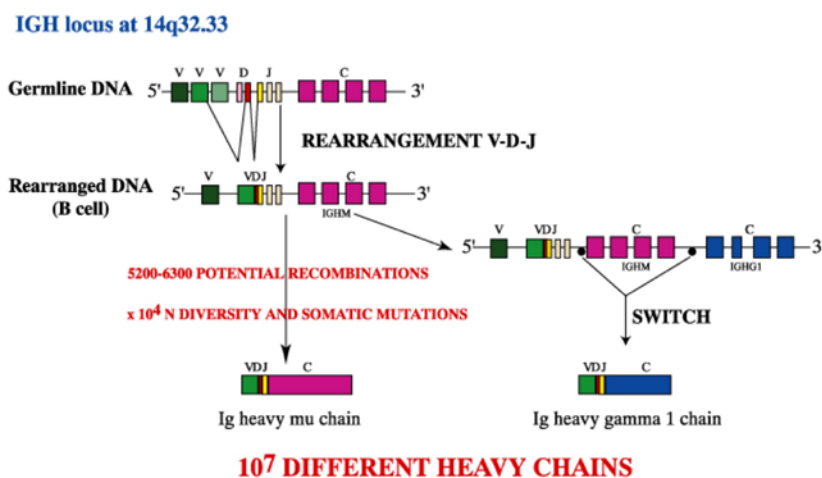
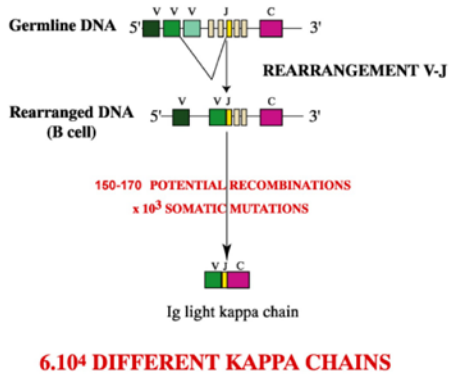


Figura 3. Generació de la diversitat a les cadenes lleugeres kappa i lambda de les immunoglobulines

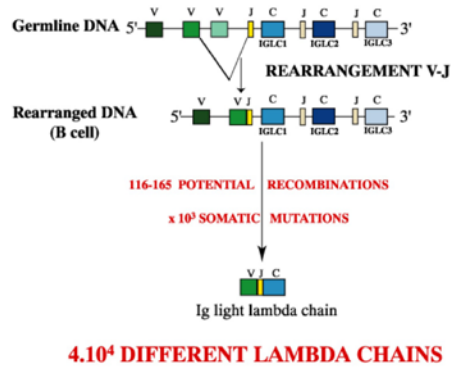
## Des dels gens IGK a les cadenes kappa d'immunoglobulina

## IGK locus at 2p11.2



## Des dels gens IGL a les cadenes lambda d'immunoglobulina

## IGL locus at 22q11.2

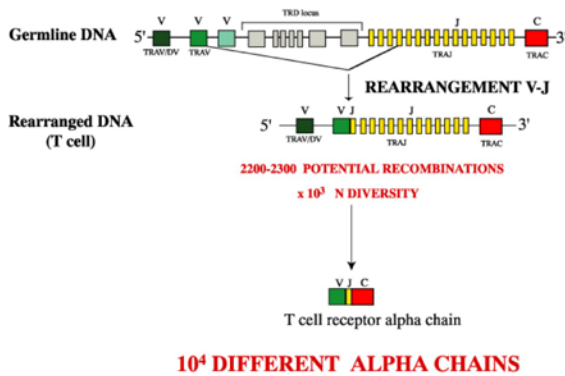


Authors: Elodie Foulquier and Marie-Paule Lefranc  
 Editor: Chantal Ginestoux  
<http://www.imgt.org/IMGTeducation/QuestionsAnswers/index.php?article=lesson1&nbr=2&lang=UK>  
<http://www.imgt.org/IMGTeducation/QuestionsAnswers/index.php?article=lesson1&nbr=3&lang=UK>

Figura 4. Generació de la diversitat a les cadenes alfa i beta del receptor de cèl·lules T

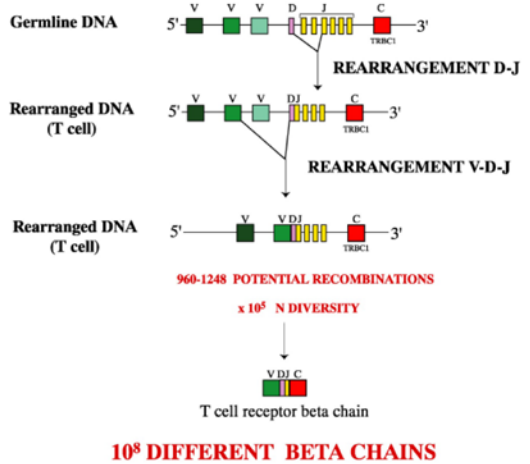
## Des dels gens TRA a les cadenes alfa del receptor de cèl·lules T

## TRA locus at 14q11.2



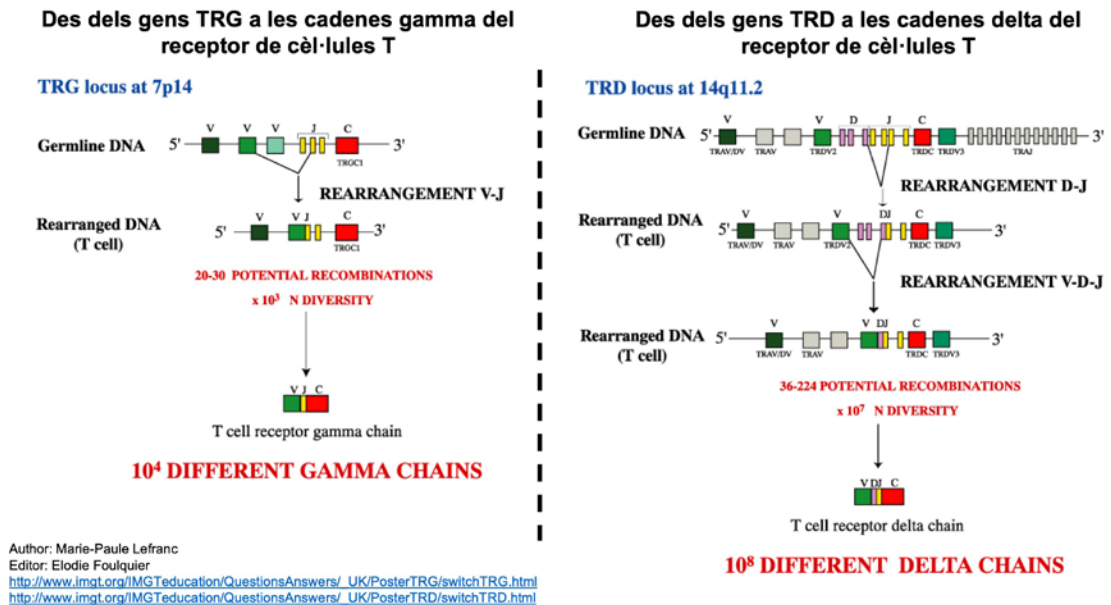
## Des dels gens TRB a les cadenes beta del receptor de cèl·lules T

## TRB locus at 7q34



Author: Marie-Paule Lefranc  
 Editor: Elodie Foulquier  
[http://www.imgt.org/IMGTeducation/QuestionsAnswers/\\_UK/PosterTRA/switchTRA.html](http://www.imgt.org/IMGTeducation/QuestionsAnswers/_UK/PosterTRA/switchTRA.html)  
[http://www.imgt.org/IMGTeducation/QuestionsAnswers/\\_UK/PosterTRB/switchTRB.html](http://www.imgt.org/IMGTeducation/QuestionsAnswers/_UK/PosterTRB/switchTRB.html)

Figura 5. Generació de la diversitat a les cadenes gamma i delta del receptor de cèl·lules T



C, constant; D, *diversity*; IGH, cadena pesada de les immunoglobulines; IGK, cadena kappa de les immunoglobulines; IGL, cadena lambda de les immunoglobulines; J, *joining*; N; nucleòtids; TRA, cadena alfa del receptor de la cèl·lula T; TRB, cadena beta del receptor de la cèl·lula T; TRD, cadena delta del receptor de la cèl·lula T; TRG, cadena gamma del receptor de la cèl·lula T; V, variable.

Les imatges de les figures 2 – 5 han estat reproduïdes amb l'autorització escrita d'IMGT®, *the international ImMunoGeneTics information system*® (<http://www.imgt.org>).

Així, doncs, gràcies a les combinacions aleatòries dels segments gènics en línia germinal que s'uneixen (diversitat combinatòria) i mitjançant l'addició o eliminació atzarosa de nucleòtids a les unions entre aquests segments (diversitat a la unió) cada limfòcit T i B i la seva descendència (clon) adquireixen un reordenament V(D)J únic que representa una signatura molecular individual, equivalent a l'empremta digital.

D'aquest coneixement deriva una aplicació clínica que és la determinació de la clonalitat a una mostra biològica que contingui limfòcits mitjançant l'anàlisi dels reordenaments V(D)J dels gens de les IG i/o del TCR. Els processos inflamatoris habitualment presenten múltiples clons de limfòcits T/B cadascun d'ells amb el seu reordenament V(D)J diferent que tradueix el caràcter policlonal de l'infiltrat limfoide. En canvi, els limfomes generalment es desenvolupen a partir d'una proliferació descontrolada d'un



únic limfòcit T o B maligne. Aquest fet pot ser una eina útil en el diagnòstic de les neoplàsies limfoides. Si una mostra biològica conté una població limfoide en la que es detecta un reordenament V(D)J idèntic dels gens del TCR i/o IG, assumim que té un origen cel·lular comú i una possible transformació limfoide maligna com a causa de la proliferació monoclonal.(221-224) No obstant, aquestes afirmacions no poden ser categòriques ja que és essencial no equiparar clonalitat amb malignitat i viceversa. Un resultat negatiu en els estudis de detecció de clonalitat no exclou un trastorn limfoproliferatiu maligne.(205,206,225)

Algunes tècniques que ens permeten estudiar la clonalitat limfoide ho fan indirectament a nivell de l'expressió de proteïnes utilitzant anticossos dirigits contra les cadenes lleugeres de les IG ( $\kappa$  o  $\lambda$ ) o contra els dominis variables de les diverses cadenes del TCR. També s'utilitzen tècniques basades en la hibridació in situ dels àcids ribonucleics missatgers (ARNm) de les cadenes lleugeres  $\kappa$  o  $\lambda$ .(140) Així i tot, cal tenir en compte algunes limitacions destacables d'aquestes tècniques, com són la necessitat d'un infiltrat plasmocel·lular per poder avaluar la restricció en l'expressió de les cadenes lleugeres de les IG o la disponibilitat limitada d'anticossos específics contra els dominis variables de les cadenes del TCR.(211,224) Contràriament a les tècniques basades en anticossos, les tècniques moleculars són àmpliament aplicables per la detecció dels reordenaments V(D)J clonals en els gens de les IG/TCR.(211)

Durant molts anys, l'anàlisi mitjançant *Southern blotting* (SB) va ser la tècnica *gold standard* pels estudis moleculars de clonalitat. El SB es basa en la detecció de fragments d'ADN reordenats obtinguts després de la digestió amb endonucleases de restricció. La discriminació entre monoclonal i policlonal utilitzant SB es fonamenta en la diversitat combinatòria entre els segments gènics. Malgrat l'alta fiabilitat del SB, aquesta metodologia va ser progressivament substituïda per les tècniques basades en la PCR. Les tècniques de PCR ofereixen una major rapidesa i facilitat tècnica, menors requeriments d'ADN d'una elevada qualitat, la possibilitat d'utilitzar mostres en parafina i una sensibilitat superior.(211,225,226)

Durant uns anys els anàlisis basats en les tècniques de PCR van generalitzar-se, però no estaven exemptes d'alguns problemes: s'utilitzaven diversos encebadors que s'aparellaven amb regions diferents dels gens IG/TCR i els mètodes emprats per la detecció

dels productes d'amplificació de la PCR també eren diferents. Aquestes diferències metodològiques significatives feien que els resultats obtinguts en diferents estudis resultessin difícilment comparables. En aquest sentit, es va fer evident la necessitat d'estandardització dels procediments analítics. Per aquest motiu, l'any 2003 experts en l'anàlisi de clonalitat de quaranta-set instituts i de set països europeus diferents van publicar un protocol uniforme i estandarditzat de PCR (BIOMED-2 Concerted Action BMH4-CT98-3936) per facilitar la detecció de poblacions limfoides clonals de qualsevol origen. El protocol BIOMED-2 complet inclou un total de noranta-set encebadors diferents distribuïts en catorze tubs de PCR múltiplex (taula 8). Les tècniques recomanades per analitzar els productes de PCR són l'anàlisi de fragments fluorescents per electroforesi capil·lar i l'anàlisi d'heterodúplex. L'anàlisi per electroforesi capil·lar requereix que els encebadors estiguin marcats amb fluoròfors, mentre que l'anàlisi d'heterodúplex utilitza gels de poliàcrilamida en els que s'analitza la formació d'heterodúplexs o homodúplexs. L'anàlisi mitjançant electroforesi capil·lar té una sensibilitat lleugerament superior, basant-se en la longitud del producte amplificat permet la comparació entre diferents mostres i és més senzill d'interpretar. A més a més, proporciona una anàlisi dels productes de PCR d'alta resolució podent detectar diferències de longitud de tan sols un únic parell de bases. En canvi, l'anàlisi heterodúplex es considera el mètode preferit per detectar els productes amplificats dels reordenaments dels gens de les cadenes lleugeres IGK i IGL.(211,219,224)

Taula 8. Protocol BIOMED-2: tubs de PCR múltiplex, nombre d'encebadors i mides dels productes de PCR

Reordenaments gènics	Tubs de PCR múltiplex	Nombre d'encebadors per tub	Nombre total d'encebadors diferents	Mides dels productes de PCR (nucleòtids)
IGH (V <sub>H</sub> -J <sub>H</sub> )	A	7 <sup>#</sup>	21 <sup>§</sup>	310 - 360
	B	8 <sup>#</sup>		250 - 295
	C	8 <sup>#</sup>		100 - 170
IGH (D <sub>H</sub> -J <sub>H</sub> )	D	7 <sup>#</sup>	8 <sup>§</sup>	110 - 290 i 390 - 420
	E	2 <sup>#</sup>		100 - 130
IGK	A	8 <sup>#</sup>	10	120 - 160, 190 - 210 i 260 - 300
	B	8 <sup>#</sup>		210 - 250, 270 - 300 i 350 - 390
IGL	A	3	3	140 - 165
TCRG	A	4 <sup>#</sup>	6	145 - 255
	B	4 <sup>#</sup>		80 - 140 i 160 - 220
TCRB	A	32 <sup>#</sup>	38	240 - 285
	B	27 <sup>#</sup>		240 - 285
	C	15 <sup>#</sup>		170 - 210 i 285 - 325
TCRD	A	12	12	120 - 280
	14 tubs		97 encebadors	

IGH (D<sub>H</sub>-J<sub>H</sub>), reordenaments incomplets del gen de la cadena pesada de les immunoglobulines; IGH (V<sub>H</sub>-J<sub>H</sub>), reordenaments complets del gen de la cadena pesada de les immunoglobulines; IGK, cadena lleugera kappa; IGL, cadena lleugera lambda; PCR, reacció en cadena de la polimerasa; TCRB, cadena beta del receptor de la cèl·lula T; TCRD, cadena delta del receptor de la cèl·lula T; TCRG, cadena gamma del receptor de la cèl·lula T. <sup>#</sup> Alguns encebadors estan presents en més d'un tub de PCR múltiplex. <sup>§</sup> L'encebador JH és el mateix en els tubs A, B, C, D i E de IGH, per aquest motiu, cal restar un encebador a la suma total per evitar que estigui comptat dues vegades. Adaptada d'AW. Langerak *et al.* (227), d'AM. Sproul *et al.* (228) i de JJM. van Dongen *et al.* (211).

Atès que existeixen kits comercials de les proves de PCR EuroClonality / BIOMED-2 Concerted Action BMH4-CT98-3936 i que múltiples estudis han demostrat bons resultats en la detecció de clonalitat incloent mostres de parafina de pacients amb LCCT i LCCB s'ha produït una àmplia acceptació i utilització d'aquest protocol per a l'anàlisi genotípica del TCR/IG en els LCP.(96,160,162, 235-247) Tot i que cada vegada existeixen més treballs que utilitzen les tècniques modernes de seqüenciació *high-throughput sequencing* (HTS)/NGS de la regió hipervariable CDR3 del TCR, en el moment actual el protocol de PCR EuroClonality / BIOMED-2 continua sent la metodologia referent a la majoria de laboratoris de diagnòstic molecular.(227) És

previsible que en el futur la HTS del TCR, que ja ha demostrat ser una tècnica altament sensible i precisa, que permet la quantificació de la freqüència relativa de cada clon dins el repertori global de cèl·lules T a una mostra biològica vagi ampliant els seus usos en la pràctica clínica habitual.(15,16,242–245)

Independentment de la tècnica utilitzada, l'anàlisi genotípica del TCR/IG pot ser una eina útil en aquells casos en els quals no es pot establir una diferenciació inequívoca entre un procés limfoproliferatiu benigne i un limfoma maligne en base a la informació clínica, histopatològica i immunofenotípica. En qualsevol cas, els resultats de l'estudi de clonalitat dels gens TCR/IG hauran de ser interpretats sempre en el context de la presentació clínica i el conjunt de les troballes histopatològiques. (205,206,219,224,228) Tot i així, cal tenir present que s'ha detectat monoclonalitat de cèl·lules T/B en diverses dermatosis inflamatòries benignes, per exemple, alguns casos de líquen pla, líquen estriat i atròfic, pitiriasis liquenoides, dermatosis purpúriques pigmentades, toxicodèrmies, èczema crònic, hiperplàsies limfoides cutànies, morfea, etc. (14,136,146,188,189,202,206,228,230,238,246–249) Fins i tot, alguns autors han suggerit el concepte de discràsies limfoides cutànies per agrupar aquelles dermatosis de curs crònic i sovint recalcitrant caracteritzades histopatològicament per infiltrats limfoides crònics sense atípia o atípia mínima, però en les que freqüentment es detecta un clon de cèl·lules T. Dins d'aquest grup s'inclouen les parapsoriasis, algunes dermatosis purpúriques pigmentades, mucinosis fol·liculars idiopàtiques, pitiriasis liquenoides, entre altres. Aparentment una minoria d'aquests casos podrien evolucionar al llarg del temps a un LCCT.(250)

### **1.10. Justificació de l'elaboració de la tesi doctoral**

Existeixen publicacions científiques prèvies sobre l'aplicació dels protocols de PCR BIOMED-2 al diagnòstic dels LCP, habitualment focalitzades en tipus concrets, com ara, la MF, els LCCT o els LCCB.(96,160,162, 235–247) Malgrat això, l'aplicació d'aquesta protocol·lització a sèries àmplies de pacients i a situacions clíniques diverses ha estat relativament reduïda. El propòsit d'aquest treball és estudiar el rendiment diagnòstic de les proves del protocol BIOMED-2 a diferents escenaris de la pràctica clínica habitual i investigar la possible significació pronòstica dels resultats de les proves de PCR BIOMED-2.





HIPÒTESIS



## HIPÒTESIS

---

El projecte europeu BIOMED-2 Concerted Action BMH4-CT98-3936 ha esdevingut una estratègia altament informativa al procés diagnòstic dels pacients amb sospita de limfomes cutanis de cèl·lules T/B. En aquest context es plantegen les següents hipòtesis:

- L'ús del protocol BIOMED-2 complet podria incrementar la capacitat diagnòstica (sensibilitat) molecular dels limfomes cutanis, específicament a situacions que suposen una problemàtica diagnòstica (la micosi fungoide en estadis inicials i les dermatosis inflamatòries benignes o els limfomes cutanis de cèl·lules B de curs indolent i les hiperplàsies limfoides cutànies reactives).
- La identificació del mateix clon de limfòcits T/B a les mostres procedents de teixits diferents pot tenir una significació pronòstica.







OBJECTIUS



## OBJECTIUS

---

### 3.1. Objectiu principal

- Determinar el valor diagnòstic i pronòstic de la detecció de clonalitat utilitzant els encebadors i protocols de PCR BIOMED-2 a una sèrie de pacients amb limfomes cutanis primaris de cèl·lules T/B.

### 3.2. Objectius secundaris

- Correlacionar els resultats dels estudis de clonalitat amb variables clíniques.
- Comparar els resultats de clonalitat a biòpsies cutànies obtingudes de diferents localitzacions anatòmiques i/o en diferents moments evolutius a un mateix pacient per valorar el grau d'heterogeneïtat clonal.
- Avaluar la rellevància de l'anàlisi genotípica a la diferenciació entre els estadis inicials de la micosi fungoide i les dermatosis inflamatòries benignes, així com, els limfomes cutanis de cèl·lules B de curs indolent i les hiperplàsies limfoides cutànies reactives. Estudiar si existeixen diferències en la resposta terapèutica i/o l'evolució d'aquests processos limfoproliferatius B cutanis respecte a la detecció de clonalitat.
- Comparar els resultats de clonalitat a les biòpsies de pell i a les mostres de sang perifèrica d'un mateix individu per conèixer la seva significació pronòstica.





MATERIALS I MÈTODES



## MATERIALS I MÈTODES

### 4.1. Pacients i mostres

En aquest estudi s'han inclòs i analitzat retrospectivament un total de 652 biòpsies de pell obtingudes de 357 pacients amb una sospita clínica i/o histopatològica d'un procés limfoproliferatiu cutani. Les mostres de biòpsia cutània es van obtenir durant un període de temps de gairebé onze anys, del gener de 2004 al desembre de 2014, al Servei de Dermatologia de l'Hospital del Mar – Parc de Salut Mar de Barcelona. En 150 pacients es va obtenir més d'una biòpsia de pell, 137 en diferents moments evolutius i 13 simultàniament però de localitzacions anatòmiques diferents. Totes les mostres de biòpsia cutània van ser fixades en formol tamponat neutre al 10% i incloses en parafina. Posteriorment van ser valorades mitjançant la tinció d'hematoxilina-eosina i també tècniques immunohistoquímiques segons l'orientació diagnòstica.

A més a més, es van analitzar genotípicament 370 mostres de sang perifèrica procedents de 195 participants de l'estudi. A la majoria dels casos, la informació molecular s'acompanyava de dades citomorfològiques (extensions de sang perifèrica tenyides amb May-Grünwald-Giemsa) per detectar la presència de limfòcits atípics (cèl·lules de Sézary) i immunofenotípiques utilitzant el sistema de citometria de flux BD FACSCanto™ II i el BD FACSDiva™ software (BD Biosciences, San Jose, CA, EUA).

La sospita d'un procés limfoproliferatiu cutani basada en la presentació clínica i/o els criteris histològics i immunofenotípics va ser el motiu per realitzar estudis de reordenament gènic del TCR i/o IG mitjançant l'anàlisi estandarditzat de PCR EuroClonality / BIOMED-2 a les biòpsies de pell i a les mostres de sang perifèrica. En última instància, el diagnòstic de limfoma cutani primari es va establir d'acord amb la classificació de consens de la WHO-EORTC de l'any 2005 i la darrera actualització de l'any 2018, tenint en compte totes les característiques clíniques, histopatològiques, immunofenotípiques i moleculars.(1,2) En els casos de MF en estadi inicial es va tenir en consideració l'algoritme diagnòstic proposat i validat per la ISCL (taula 6).(10,251) Addicionalment, el diagnòstic final es va poder confirmar durant el seguiment de la majoria dels participants del present estudi.



Els pacients van ser inclosos amb el consentiment informat d'acord amb el marc normatiu nacional i internacional tenint en compte que es van realitzar les biòpsies cutànies i les extraccions de sang perifèrica durant el procediment diagnòstic rutinari. No s'ha obtingut cap mostra biològica addicional a l'efecte de l'estudi. A més a més, el Comitè Ètic d'Investigació Clínica (CEIC) del Parc de Salut Mar va aprovar el disseny i la realització d'aquest estudi el juny de 2016 (núm. 2016/6719/I). La present recerca s'ha dut a terme seguint els principis de la Declaració de Hèlsinki.

#### 4.2. Protocol de reacció en cadena de la polimerasa (PCR)

L'extracció de l'ADN genòmic es va realitzar a partir de dues seccions de 15 micròmetres representatives de les biòpsies cutànies incloses en parafina utilitzant el QIAamp DNA Mini Kit (QIAGEN GmbH, Hilden, Alemanya) seguint les instruccions del fabricant. A les mostres de sang perifèrica, es van aïllar les cèl·lules mononuclears a partir de la sang anticoagulada amb etilendiaminotetracetat (EDTA) utilitzant la centrifugació de densitat mitjançant un gradient Ficoll-Hypaque (Seromed, Berlín, Alemanya) abans de procedir a l'extracció de l'ADN genòmic prèviament esmentada. El control de qualitat de l'ADN extret de cada mostra, un aspecte molt rellevant quan s'utilitza material parafinat en el protocol EuroClonality / BIOMED-2, es va dur a terme utilitzant la PCR de control del mateix protocol donant lloc a una escala de cinc fragments (100, 200, 300, 400 i 600 parells de base). La majoria de biòpsies cutànies en blocs de parafina van donar ADN de bona qualitat ( $\geq 300$  parell de bases). Les PCR de control es van dur a terme emprant dues concentracions diferents d'ADN a fi d'excloure l'efecte dels inhibidors de la PCR. A continuació, les mostres d'ADN purificades van ser amplificades i analitzades per les diferents proves de clonalitat T i/o B del protocol de PCR múltiplex EuroClonality / BIOMED-2 (TCRG: tubs A i B; TCRB: tubs A, B i C; IGH: tubs A, B, C, D i E; IGK: tubs A i B) en funció de la sospita diagnòstica (procés limfoproliferatiu de cèl·lules T o B), així com, de la quantitat i qualitat de l'ADN disponible.(211) Els encebadors i els tubs de PCR múltiplex es van obtenir dels productes comercialitzats per InVivoScribe Technologies (San Diego, CA, EUA). Es van utilitzar els controls positius i negatius subministrats pel fabricant (InVivoScribe Technologies) cada vegada que s'efectuava la prova per assegurar el correcte desenvolupament d'aquesta. Totes les reaccions d'amplificació es van realitzar en un termociclador automatitzat (GeneAmp® PCR System 9600; Applied Biosystems,

Foster City, CA, EUA). Els reactius i les condicions de les PCR estan sintetitzades a la taula 9.

Taula 9. Protocol estandarditzat de PCR BIOMED-2

Reactius de la PCR
<p>100 ng d'ADN            10 pmol de cada encebador (marcats amb fluorocrom si s'utilitza l'anàlisi de fragments fluorescents GeneScan com a mètode de detecció dels productes amplificats). El número i tipus d'encebador per cada tub depèn de cada PCR específica            Desoxiribonucleòtids trifosfat (dNTP) a una concentració final de 200 µM            MgCl<sub>2</sub> a una concentració final de 1.5 mM            AmpliTaq Gold polimerasa (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA): 1 unitat en la majoria dels tubs; 2 unitats en els tubs amb molts (&gt;15) encebadors            ABI Buffer II o ABI Gold Buffer (Applied Biosystems) per un volum final de 50 µL</p>
Condicions de la PCR
<p>Preactivació de la Taq polimerasa durant 7 minuts a 95°C            Fases del cicle                Desnaturalització: 30-45 segons a 95°C                Hibridació: 30-45 segons a 60°C                Extensió: 30-90 segons a 72°C                Extensió final: 10 minuts a 72°C            Nombre de cicles: 35            Emmagatzematge dels productes amplificats a temperatura ambient o a 15°C</p>

ADN, àcid desoxiribonucleic; CA, Califòrnia; dNTP, desoxiribonucleòtids trifosfat; EUA, Estats Units d'Amèrica; PCR, *polymerase chain reaction* (reacció en cadena de la polimerasa).

Adaptada de JJM. van Dongen *et al.* (211) i de F. Gallardo *et al.* (219).

Els productes amplificats de la PCR van ser detectats mitjançant l'anàlisi de fragments fluorescents per electroforesi capil·lar (GeneScan) i/o l'anàlisi d'heterodúplex per avaluar si els productes de PCR obtinguts derivaven de poblacions limfoides monoclonals o policlonals. Es van repetir per duplicat totes les PCR en les quals s'identificava un amplicó específic per verificar la reproductibilitat dels pics o les bandes i, així, descartar una interpretació falsament positiva de monoclonalitat (pseudomonoclonalitat). (211,219,227,252,253)

#### 4.2.1. Anàlisi de fragments fluorescents (GeneScan)

En el sistema GeneScan un dels encebadors estava marcat amb un fluoròfor, 6-carboxifluoresceïna (6-FAM) o hexaclorofluoresceïna (HEX), i se separaven els productes amplificats de la PCR mitjançant electroforesi capil·lar. Per aquest procés, un microlitre del producte de PCR es barrejava amb 9 µL de formamida desionitzada (Applied Biosystems) i 0.5 µL d'un producte de pes molecular estàndard (GeneScan 400-ROX, Applied Biosystems) per assolir la separació per desnaturalització en cadenes simples d'ADN. Els productes es detectaven automàticament per lectura de fluorescència a través d'un sistema làser en un seqüenciador d'ADN automatitzat (ABI Prism® 3100 Genetic Analyzer, Applied Biosystems). La determinació de la mida dels amplicons es va realitzar mitjançant l'ABI GeneScan 3.1 analysis software (Applied Biosystems). (219) Aquesta metodologia resulta en múltiples pics amb una distribució gaussiana, representant molts productes de PCR diferents en els processos limfoproliferatius policlonals, en canvi, dona lloc únicament a un pic consistent en un tipus de producte de PCR en les limfoproliferacions totalment monoclonals.

#### 4.2.2. Anàlisi d'heterodúplex

Aquest sistema d'anàlisi dels fragments de PCR va ser utilitzat per analitzar els reordenaments dels segments gènics de IGK, seguint les recomanacions del protocol BIOMED-2. En aquest procediment, els productes de PCR es van desnaturalitzar per calor (95°C durant 5 minuts) i posteriorment es van renaturalitzar ràpidament a baixes temperatures (4°C durant 1 hora) per tal de buscar novament la hibridació espontània, aquesta vegada de forma aleatòria i, d'aquesta manera obtenir fragments d'ADN homodúplex o heterodúplex. En el cas de la formació d'heterodúplex, les diferents conformacions obtingudes confereixen característiques físiques diferents, que permeten la seva separació mitjançant electroforesi en gels de poliacrilamida no desnaturalitzants. Els homodúplexs assoleixen una hibridació perfecta que es tradueix en una migració més ràpida a través del gel. Els productes de PCR corresponents a mostres monoclonals formen una elevada proporció d'homodúplexs i se separen clarament en el gel de poliacrilamida en forma d'una banda. En canvi, les mostres policlonals produeixen únicament heterodúplexs que es presenten amb bandes difuses en el gel de poliacrilamida. (211,219)

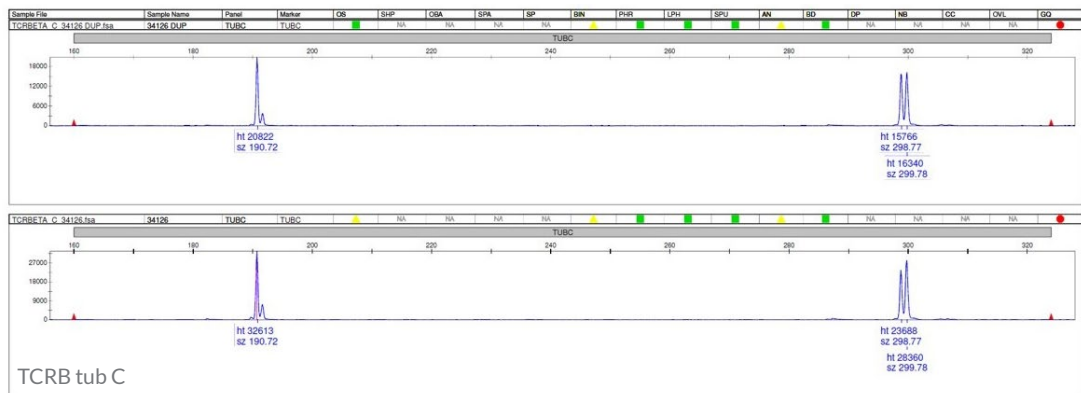
### 4.3. Interpretació dels resultats del protocol de PCR EuroClonality / BIOMED-2

Atès que les proves de clonalitat basades en la PCR no són un assaig quantitatiu, sinó que requereix el reconeixement d'uns patrons moleculars, l'any 2012 el consorci europeu EuroClonality / BIOMED-2 va publicar unes guies per a la interpretació i la presentació dels resultats de les proves de clonalitat. L'objectiu fonamental era disposar d'un sistema uniforme per descriure els resultats i les conclusions de les proves de clonalitat del TCR/IG que fos aplicable a almenys el 95% dels casos rutinaris als laboratoris de diagnòstic molecular.(227) La informació recollida dels informes de clonalitat utilitzada per a l'elaboració d'aquesta tesi doctoral s'ha basat en les guies del consorci EuroClonality (BIOMED-2) publicades i disponibles a la pàgina web (<http://www.euroclonality.org>). A la figura 6 i a la taula 10 es presenten exemples, juntament amb les descripcions, dels diferents resultats possibles.

Figura 6. Exemples dels resultats de clonalitat del TCR/IG obtinguts mitjançant (A) l'anàlisi de fragments fluorescents per electroforesi capil·lar (GeneScan) i (B) l'anàlisi d'heterodúplex

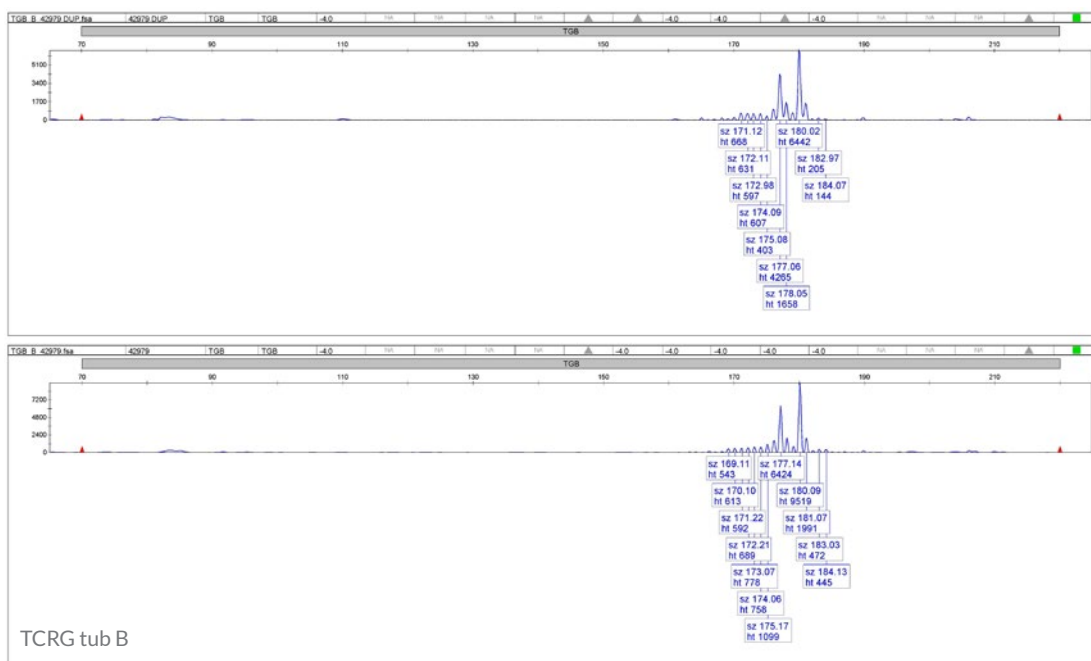
(A)

#### Resultats de l'electroforesi capil·lar - anàlisi de fragments fluorescents considerats **CLONALS**



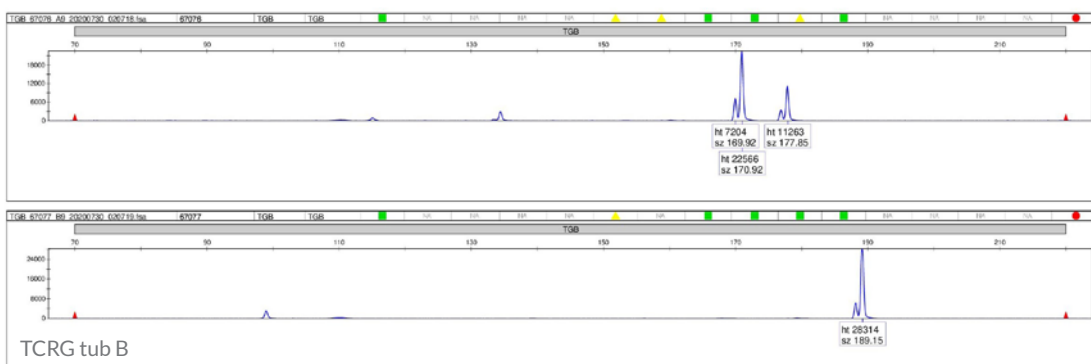
1 o 2 pics reproduïbles

**MONOCLONAL**

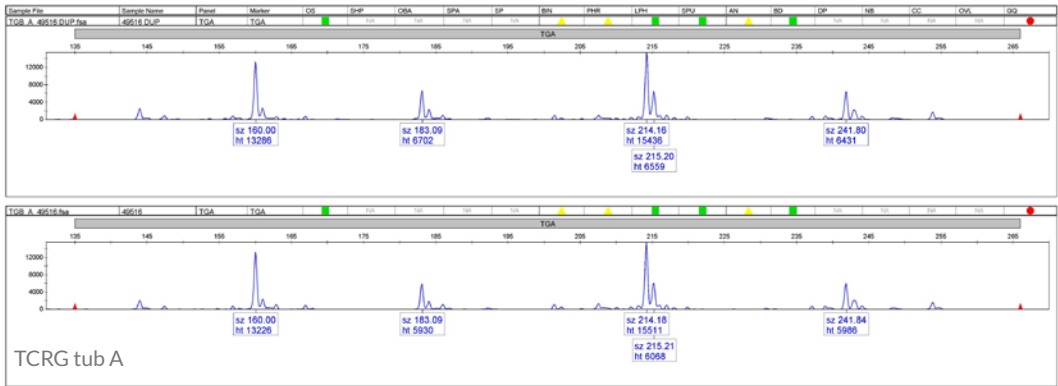


1 o 2 pics reproduïbles + múltiples pics de fons  
**PATRÓ CLONAL EN CONTEXT POLICLONAL**

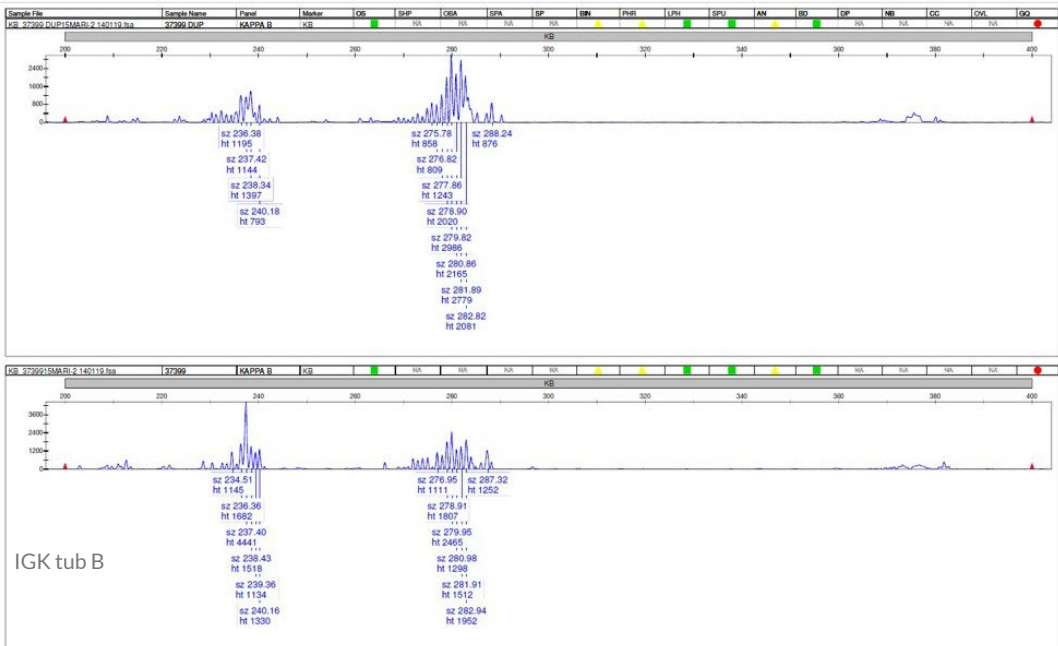
Resultats de l'electroforesi capil·lar - anàlisi de fragments fluorescents considerats  
**NO CLONALS**



≥1 pics no reproduïbles  
**PSEUDOCLONAL**



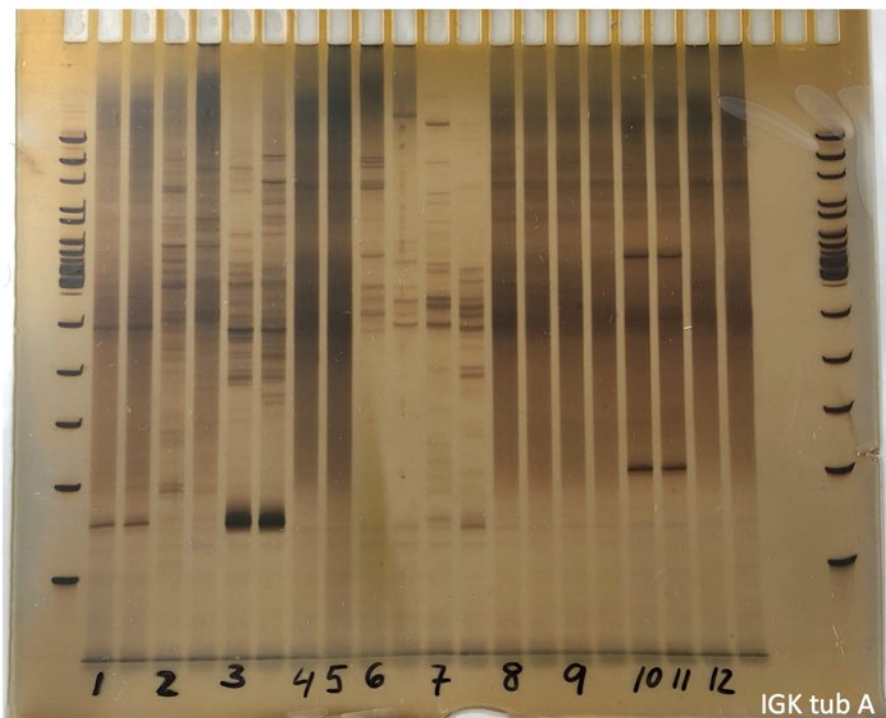
3-5 pics reproduïbles  
**OLIGOCLONAL**



>5 pics de longituds diferents (corba de Gauss)  
**POLICLONAL**

(B)

## Resultats de l'anàlisi d'heterodúplexs



**1, 3, 10 i 11: CLONAL**

**2, 4, 5, 6, 7, 8, 9 i 12: NO CLONAL**

Per considerar un resultat monoclonal calia que els pics observats, a més a més, tinguessin una longitud apropiada tenint en compte el rang de la mida (nucleòtids) dels productes per cada tub de PCR múltiplex (taula 8). Tot i que en les guies elaborades i publicades pel consorci EuroClonality (BIOMED-2) no s'estableixen unes definicions o requisits concrets en relació amb l'alçada dels pics; en aquest treball s'ha considerat un resultat com un patró monoclonal verdader quan l'alçada del pic era almenys el doble de la distribució normal dels pics policlonals, corresponents a les cèl·lules reactives acompanyants de l'infiltrat.(219,227)

Taula 10. Sistema EuroClonality / BIOMED-2 per interpretar i emetre informes de clonalitat del TCR/IG davant una sospita de síndrome limfoproliferativa

Anàlisi		Conclusió molecular	Possibles causes
GeneScan	Heterodúplex		
Absència de pics <sup>†</sup>	Absència de bandes <sup>†</sup>	No reordenament	ADN de mala qualitat Absència de limfòcits Hipermutacions somàtiques en limfoma B (post)fol·licular <sup>§</sup>
Un o dos pics reproduïbles <sup>#</sup>	Una o dues bandes reproduïbles <sup>#, &amp;</sup>	Monoclonal	Limfòcits monoclonals ± limfòcits normals/ reactius (limfoma, leucèmia)
Un o dos pics reproduïbles <sup>#</sup> + corba de Gauss	Una o dues bandes reproduïbles + banda difusa <sup>#, &amp;</sup>	Clonal en context policlonal	
Un o més pics no reproduïbles	Una o més bandes no reproduïbles <sup>&amp;</sup>	Pseudoclonal	Escasses cèl·lules T/B a la mostra
Múltiples (3-5) pics reproduïbles	Múltiples (3-5) bandes reproduïbles <sup>&amp;</sup>	Oligoclonal	Resposta immune amb clons dominants (infecció, autoimmunitat) Immunodeficiències
Múltiples (> 5) pics (corba de Gauss)	Banda difusa 'smear'	Policlonal	Limfòcits reactius

<sup>†</sup> Es poden observar pic(s) o banda(es) no específic(s).

<sup>§</sup> Representa un resultat fals negatiu.

<sup>#</sup> Pels loci IGK i TCRB es poden veure fins a 4 productes clonals per un únic clon.

<sup>&</sup> A l'anàlisi d'heterodúplexs, el nombre de bandes no reflecteix necessàriament el nombre de productes de PCR diferents, donat que es poden formar heterodúplexs addicionals entre els productes.

Adaptada d'AW. Langerak *et al.* (227) i [www.euroclonality.org](http://www.euroclonality.org)



## 4.4. Variables d'estudi

Les variables incloses en el present estudi observacional retrospectiu s'especifiquen a continuació.

### 4.4.1. Variables demogràfiques

- Gènere.
- Edat a la primera visita.
- Edat al diagnòstic.

### 4.4.2. Variables clíniques

- Diagnòstic principal: limfoma cutani primari de cèl·lules T/B, limfoma cutani secundari, dermatosi inflamatòria benigna, dermatosi digitada / parapsoriasis, hiperplàsia limfoide cutània reactiva, eritrodèrmia benigna o tumor cutani no limfoma.
- Diagnòstic específic: als limfomes cutanis primaris s'utilitza la terminologia de la darrera classificació WHO-EORTC de l'any 2018.(1,6) Els limfomes cutanis secundaris es designen d'acord amb l'última classificació dels tumors dels teixits hematopoètics i limfoïdes de l'OMS publicada l'any 2017.(5)
- Estadi inicial, màxim i a l'últim control: en els pacients amb MF/SS s'utilitza el sistema d'estadificació i classificació proposat per la ISCL / EORTC.(18)
- Duració dels símptomes fins al diagnòstic: període de temps entre l'inici dels símptomes descrit pel pacient i l'establiment del diagnòstic.
- Duració dels símptomes fins a la primera biòpsia de pell clonal: període de temps entre l'inici dels símptomes descrit pel pacient i l'obtenció de la primera biòpsia de pell amb un resultat clonal.

- Nombre de biòpsies de pell amb estudis de clonalitat: nombre total de biòpsies de pell en les que s'ha realitzat alguna prova per estudiar els reordenaments gènics del TCR i/o IG utilitzant el protocol de PCR BIOMED-2.
- Nombre de biòpsies de pell seqüencials amb estudis de clonalitat: nombre de biòpsies de pell amb alguna prova de clonalitat T i/o B realitzades en un mateix subjecte en diferents moments de l'evolució de la malaltia.
- Nombre de mostres de sang perifèrica amb estudis de clonalitat.
- Elevació sèrica de lactat deshidrogenasa: només en els casos de MF/SS es recull si s'ha detectat una elevació sèrica de lactat deshidrogenasa en algun moment de l'evolució de la malaltia.
- Transformació a cèl·lula gran: la demostració a alguna biòpsia cutània de pacients amb MF/SS de transformació a cèl·lula gran d'acord amb els criteris definits prèviament: la presència de > 25% de limfòcits grans (4 vegades la mida d'un limfòcit normal) en els infiltrats de la dermis o disposats en nòduls.(11)
- Nombre de teràpies dirigides a la pell: la suma total del nombre de tractaments dirigits a la pell utilitzats en cada pacient. Les teràpies dirigides a la pell incloses són: carmustina tòpica, cirurgia, corticoesteroides tòpics i/o intralesionals, foto(-quimio)teràpia, imiquimod tòpic, inhibidors de la calcineurina tòpics (tacrolimús o pimecrolimús), interferó alfa intralesional, irradiació cutània total amb electrons, radioteràpia, retinoides tòpics, rituximab intralesional i teràpia fotodinàmica.
- Nombre de tractaments sistèmics: el nombre total de teràpies sistèmiques emprades en cada pacient. Els tractaments sistèmics inclosos són: acitretina oral, anticossos monoclonals (alemtuzumab, atezolizumab, brentuximab vedotin, ibritumomab tiuxetan, rituximab) per via intravenosa, antipalúdics orals, bexarotè oral, ciclosporina oral, corticoesteroides sistèmics, doxiciclina oral, fotofèresi extracorpòria, inhibidors de cinasa (duvelisib, ibrutinib, imatinib) orals, interferó alfa subcutani, quimioteràpia amb un sol agent o en combinació (poliquimioteràpia), metotrexat per via oral o subcutània i trasplantament de progenitors hematopoètics.

- Resposta global (*Global Response Score*): es defineix la resposta global de cada pacient (resposta completa, resposta parcial, malaltia estable, malaltia en progressió o recidiva) d'acord amb els documents de consens de la ISCL / *United States Cutaneous Lymphoma Consortium* (USCLC) / EORTC per a la MF/SS i per a altres limfomes cutanis primaris. La taxa de resposta objectiva (ORR, *objective response rate*) és la proporció de pacients amb resposta completa i resposta parcial.(58,182,254)
- Estat al darrer control: viu sense la malaltia, viu amb la malaltia, mort per la malaltia o mort per altres causes.
- Temps de seguiment: període de temps des de la primera visita fins al darrer control o la mort de l'individu. L'última actualització de la base de dades es va realitzar el gener de 2020.

#### 4.4.3. Variables moleculars (proves de detecció de clonalitat)

- Clonalitat a la pell: detecció de clonalitat a alguna biòpsia de pell.
- Clonalitat a la sang perifèrica: detecció de clonalitat a alguna mostra de sang perifèrica.
- TCRG a la pell: detecció d'un reordenament clonal del gen de la cadena gamma del receptor de la cèl·lula T a les biòpsies cutànies.
- TCRG a la sang perifèrica: detecció d'un reordenament clonal del gen de la cadena gamma del receptor de la cèl·lula T als limfòcits de la sang perifèrica.
- TCRB a la pell: detecció d'un reordenament clonal del gen de la cadena beta del receptor de la cèl·lula T a les biòpsies cutànies.
- TCRB a la sang perifèrica: detecció d'un reordenament clonal del gen de la cadena beta del receptor de la cèl·lula T als limfòcits de la sang perifèrica.

- IGH (VH-JH) (*framework region* (FR)1, FR2 i FR3) a la pell: detecció d'un reordenament complet clonal del gen de la cadena pesada de les immunoglobulines a les biòpsies cutànies.
- IGH (VH-JH) (FR1, FR2 i FR3) a la sang perifèrica: detecció d'un reordenament complet clonal del gen de la cadena pesada de les immunoglobulines als limfòcits de la sang perifèrica.
- IGH (DH-JH) a la pell: detecció d'un reordenament incomplet clonal del gen de la cadena pesada de les immunoglobulines a les biòpsies cutànies.
- IGK (Vκ-Jκ i Vκ/intron-Kde) a la pell: detecció d'un reordenament clonal del gen de la cadena lleugera kappa de les immunoglobulines a les biòpsies cutànies.
- Heterogeneïtat clonal a la pell: detecció de pics clonals diferents a través de l'anàlisi de fragments fluorescents a les biòpsies cutànies obtingudes d'un mateix pacient.
- Heterogeneïtat clonal pell / sang perifèrica: detecció de pics clonals diferents mitjançant l'anàlisi de fragments fluorescents comparant els resultats de les biòpsies cutànies i de les mostres de sang perifèrica d'un mateix individu.

#### **4.4.4. Variables morfològiques i immunofenotípiques de les poblacions limfoides a la sang perifèrica**

- Cèl·lules de Sézary: recompte absolut (cèl·lules/ $\mu$ L) i percentatge de limfòcits atípics amb nuclis cerebriformes (cèl·lules de Sézary) detectats a través de l'anàlisi de 200 cèl·lules d'extensions de sang perifèrica tenyides amb May-Grünwald-Giemsa.
- Ràtio CD4/CD8: quocient entre els percentatges dels limfòcits T CD4+ i els limfòcits T CD8+ identificats per citometria de flux.
- Limfòcits T CD4+CD7-: recompte absolut (cèl·lules/ $\mu$ L) i percentatge dels limfòcits T CD4+ que no expressen l'antigen CD7 mitjançant citometria de flux.

- Limfòcits T CD4+CD26-: recompte absolut (cèl·lules/ $\mu$ L) i percentatge dels limfòcits T CD4+ que són negatius per l'antigen CD26 a la citometria de flux.
- Les variables esmentades anteriorment van permetre assignar una categoria B0, B1 o B2 d'acord amb els sistemes de classificació de l'afectació sanguínia als pacients amb MF/SS proposats per l'ISCL/EORTC a l'any 2007 i l'EORTC a l'any 2018.(18,47)
- Anomalies immunofenotípiques als limfòcits B: demostració de la pèrdua d'expressió polítípica de cadenes lleugeres de superfície mitjançant citometria de flux.

#### 4.5. Anàlisi estadística

El resum de l'estadística descriptiva de les variables qualitatives / categòriques i de les variables quantitatives s'expressa com a proporcions (percentatges) i mediana (rang), respectivament.

Les variables categòriques van ser comparades utilitzant el test  $\chi^2$  i el test exacte de Fisher. Les variables quantitatives, als casos de dues mostres independents, es van comparar amb el test U de Mann-Whitney o la t de Student, segons contravinguessin o no la hipòtesi de normalitat. Així mateix, a les comparacions de més de dos grups es va emprar l'anàlisi de la variància (ANOVA) d'un factor o el test de Kruskal-Wallis, utilitzant el test de Dunn-Sidák per comparacions en parella múltiples.

Per explorar l'associació entre la detecció de clonalitat a la pell (variable independent) i el desenvolupament d'una segona neoplàsia limfoide als pacients amb papulosi limfomatoide (variable dependent) es va utilitzar un model de regressió logística. També es va emprar una regressió logística binària per conèixer la relació entre la detecció de clonalitat a les biòpsies cutànies o el diagnòstic (variables independents) i l'obtenció d'una resposta completa (variable dependent) als processos limfoproliferatius de cèl·lules B cutanis. Els resultats de la regressió logística s'expressen en termes d'*Odds ratio* (OR).

Per avaluar el valor diagnòstic de les diferents proves del protocol de PCR EuroClonality / BIOMED-2 (TCRG, TCRB, IGH VH-JH, IGH DH-JH i IGK), els casos de LCCT, MF/SS, MF, MF en estadis inicials (IA-IIA), LCCB, LCPZM o LCPCF van ser seleccionats com la malaltia a ser diagnosticada i els infiltrats limfoides T o B cutanis benignes van ser considerats com els controls sans. La detecció de monoclonalitat o d'un patró clonal en un context policlonal va interpretar-se com un test positiu, en canvi, la policlonalitat, la pseudoclonalitat o l'oligoclonalitat van ser considerades com a resultats negatius. A més a més, els casos en els que s'informava alguna biòpsia cutània o mostra de sang perifèrica d'un resultat monoclonal i altres d'un resultat diferent s'han inclòs com a monoclonals. La correlació clinicopatològica juntament amb l'evolució dels casos varen ser el *gold standard* pel diagnòstic. Els individus sans (sense limfoma cutani primari) han estat casos de diverses malalties inflamatòries cutànies en les que s'evidenciava un infiltrat limfoide T/B prominent a l'hematoxilina-eosina i en els quals s'havia plantejat el diagnòstic diferencial clínic i/o histopatològic amb algun tipus de limfoma cutani primari (taula 11). Tot seguit, es van utilitzar les definicions habituals de sensibilitat, especificitat, valor predictiu positiu (VPP) i valor predictiu negatiu (VPN). Es va avaluar la precisió dels diferents tests diagnòstics comparant les quatre mesures anteriorment esmentades. Per a dur a terme aquesta bateria de tests de comparació de mesures diagnòstiques es va emprar el paquet 'DTComPair' de R.(255).

**Taula 11. Casos d'infiltrats limfoides T/B cutanis benignes utilitzats com a controls sans a l'avaluació de les proves diagnòstiques**

Infiltrats limfoides T benignes * Diagnòstic (n = 130)	Infiltrats limfoides B benignes * Diagnòstic (n = 42)
Dermatosis digitades / parapsoriasis (25)	Hiperplàsies limfoides cutànies (16)
Èczemes (20)	Dermatosis digitades / parapsoriasis (3)
Dermatosis purpúriques pigmentades (10)	Dermatitis psoriasiformes (2)
Hiperplàsies limfoides cutànies (9)	Èczemes (2)
Eritrodèrmies benignes (8)	Eritrodèrmies benignes (2)
Pitiriasi liquenoide crònica (8)	Leishmaniosi cutània (2)
Dermatitis liquenoides (7)	Pitiriasi liquenoide crònica (2)
Dermatitis atòpica de l'adult (6)	Altres (13) †
Lupus eritematós cutani (4)	
Prurigen (4)	
Toxicodèrmies (4)	
Picades d'artròpodes (3)	
Queratosis liquenoides benignes (3)	
Dermatitis psoriasiformes (2)	
Granuloma anular (2)	
Síndrome hipereosinofílica idiopàtica (2)	
Altres (13) #	

\* Els casos utilitzats com a controls sans mostraven a la biòpsia cutània infiltrats limfoides T i/o B, a més a més, varen plantejar el diagnòstic diferencial clínic i/o histopatològic amb un limfoma cutani primari, motiu pel qual es va realitzar l'anàlisi genotípica del TCR i/o IGH en funció de la composició de l'infiltrat limfoide utilitzant el protocol de PCR BIOMED-2.

# Tots els següents diagnòstics amb n = 1: balanitis plasmocel·lular de Zoon, dermatitis granulomatosa intersticial, dermatosi granulomatosa no especificada, ectima gangrenosa, eritema anular centrfug, exantema no especificat, hiperpigmentació postinflamatòria, ictiosi adquirida, mol·lusc contagiós, perifol·liculitis, pitiriasi alba, *PLCG2-associated antibody deficiency and immune dysregulation* (PLAID) i vasculitis.

† Tots els següents diagnòstics amb n = 1: dermatitis atòpica de l'adult, dermatitis granulomatosa intersticial, dermatosi eosinofílica associada a procés hematològic (reacció tipus picada d'artròpode), eritema elevat *diutinum*, escabiosi nodular, lupus eritematós cutani, malaltia de Bowen (carcinoma escamós cutani *in situ*), perifol·liculitis, pruija crònica associada a limfoma de cèl·lules del mantell sistèmic, síndrome de Sweet histiocítica, síndrome hipereosinofílica idiopàtica, úlcera oral i vasculitis.

Es va utilitzar el coeficient kappa de Cohen per avaluar la correlació entre les proves diagnòstiques TCRG i TCRB, IGH (VH-JH) i IGH (DH-JH), i IGH (VH-JH) i IGK calculant-se com:  $\kappa = (C_o - C_a) / (1 - C_a)$  on  $C_o$  és la proporció de la concordança observada (en tant per u) i  $C_a$  la proporció de concordança que s'esperaria per l'atzar. La valoració del coeficient kappa es va realitzar d'acord amb la proposta de Landis i Koch.(256)

La supervivència global (SG) va ser calculada des de la data del diagnòstic fins a la data de mort per qualsevol causa o la data del darrer control. La supervivència específica de la malaltia (SEM) es va calcular des de la data del diagnòstic fins a la data de la mort per limfoma cutani primari o la data de l'últim control. Es van estimar les corbes de supervivència mitjançant el mètode de Kaplan i Meier, i la comparació entre les corbes utilitzant el test de log-rank. Es va realitzar l'anàlisi univariable i multivariable de paràmetres amb possible significació pronòstica per a la SG i la SEM utilitzant el model de riscos proporcionals de Cox. L'anàlisi multivariable de l'efecte de la clonalitat a la pell i a la sang perifèrica es va ajustar segons l'edat, el gènere i l'estadificació clínica inicial atès que han estat descrits prèviament com a factors pronòstics.(17,22,257) Els resultats de la regressió de Cox estan expressats com a *Hazard ratio* (HR).

Totes les proves van ser de dues cues amb valors de  $p < 0.05$  considerats estadísticament significatius. Totes les anàlisis s'han realitzat mitjançant STATA SE version 15.1 (StataCorp, College Station, TX, EUA) i R software version 3.6.2 (R Foundation for Statistical Computing).







RESULTATS



## RESULTATS

### 5.1. Estadística descriptiva

A la taula 12 es recullen el nombre de biòpsies cutànies i de mostres de sang perifèrica incloses en aquest treball segons el diagnòstic final.

Taula 12. Resum del nombre de biòpsies cutànies i de mostres de sang perifèrica incloses a l'estudi en funció del diagnòstic final

Diagnòstic (nombre de pacients)	Biòpsies de pell	Mostres de sang perifèrica
Limfomes cutanis primaris (n = 149)	360	246
LCCT (n = 114)	290	203
MF i variants (n = 66)	181	121
SS (n = 10)	19	32
LTCD30+ (n = 31) *	84	39
Altres LCCT (n = 18)	47	33
LCCB (n = 35)	70	43
LCPZM (n = 21)	41	27
LCPCF (n = 12)	27	16
LCPDCBG, TC (n = 2)	2	0
Limfomes cutanis secundaris (n = 28)	43	32
Dermatosis no limfomes (n = 180)	249	92
Dermatosis inflamatòries benignes (n = 117)	140	39
Dermatosis digitades / parapsoriasi (n = 31)	50	24
Hiperplàsies limfoides cutànies (n = 19)	24	10
Eritrodèrmies benignes (n = 8)	27	18
Tumors cutanis no limfomes (n = 5)	8	1
Total (n = 357)	652	370

LCCB, limfoma cutani de cèl·lules B; LCCT, limfoma cutani de cèl·lules T; LCPCF, limfoma cutani primari centre fol·licular; LCPDCBG, TC, limfoma cutani primari difús de cèl·lules B grans, tipus cama; LCPZM, limfoma cutani primari de la zona marginal; LTCD30+, trastorns limfoproliferatius de cèl·lules T CD30+ cutanis primaris; MF, micosi fungoide; SS, síndrome de Sézary.

\* A onze casos el LTCD30+ s'associava a una MF.

### 5.1.1. Limfomes cutanis primaris vs. Limfomes cutanis secundaris

La mostra de LCP inclou cent quaranta-nou pacients amb una ràtio masculí : femení de 1.5 i una mediana d'edat al diagnòstic de 55 anys, significativament inferior a la mediana d'edat al diagnòstic dels vint-i-vuit casos de limfomes cutanis secundaris (LCS). A les taules 13 i 14 s'especifiquen els casos de LCP i LCS en funció del diagnòstic específic, respectivament. A la taula 15 es mostra el resum de les característiques epidemiològiques, clíniques, terapèutiques, així com, dels resultats de les proves de detecció de clonalitat a les biòpsies de pell i a les mostres de sang perifèrica dels casos estudiats de LCP i LCS.

Taula 13. Diagnòstics dels Limfomes cutanis primaris

Diagnòstic d'acord amb la Classificació de l'OMS-EORTC dels Limfomes cutanis primaris, actualització de l'any 2018(1,6) (codi ICD-O)	N (%)
Limfomes cutanis de cèl·lules T	114 (77)
Micosi fungoide (9700/3)	47 (32)
MF fol·liculotropa (9700/3)	7 (5)
Reticulosi pagetoide (9700/3)	1 (0.7)
Síndrome de Sézary (9701/3)	10 (7)
MF + Papulosi limfomatoide (9700/3 + 9718/1)	10 (7)
MF + Limfoma cutani primari anaplàstic de cèl·lules grans (9700/3 + 9718/3)	1 (0.7)
Trastorns limfoproliferatius de cèl·lules T CD30+ cutanis primaris Papulosi limfomatoide (9718/1)	17 (11)
Limfoma cutani primari anaplàstic de cèl·lules grans (9718/3)	3 (2)
Limfoma de cèl·lules T subcutani similar a panniculitis (9708/3)	1 (0.7)
Limfoma de cèl·lules NK/T extranodal, tipus nasal (9719/3)	2 (1)

Limfomes cutanis primaris de cèl·lules T perifèriques, subtipus rars	
Limfoma cutani primari de cèl·lules T CD8 <sup>+</sup> citotòxic epidermotrop agressiu (provisional) (9709/3)	1 (0.7)
Trastorn limfoproliferatiu cutani primari de cèl·lules T CD4 <sup>+</sup> petites/mitjanes (provisional) (9709/1)	8 (5)
Limfoma cutani primari de cèl·lules T perifèriques, no especificat	6 (4)
<b>Limfomes cutanis de cèl·lules B</b>	<b>35 (23)</b>
Limfoma cutani primari de la zona marginal (9699/3)	21 (14)
Limfoma cutani primari centre fol·licular (9597/3)	12 (8)
Limfoma cutani primari difús de cèl·lules B grans, tipus cama (9680/3)	2 (1)
<b>Total</b>	<b>149 (100)</b>

CD, cluster of differentiation; EORTC, European Organisation for Research and Treatment of Cancer; ICD-O, International Classification of Diseases for Oncology; MF, Micosis fungoide; NK, natural killer; OMS, Organització Mundial de la Salut.

**Taula 14. Diagnòstics dels Limfomes cutanis secundaris**

<b>Diagnòstic d'acord amb la Classificació de l'OMS dels Tumors dels Teixits Hematopoètics i Limfoides, 4<sup>a</sup> edició revisada(5) (codi ICD-O)</b>	<b>N (%)</b>
<b>Neoplàsies de cèl·lules B madures</b>	<b>21 (75)</b>
Leucèmia limfocítica crònica / limfoma limfocític de cèl·lules petites (9823/3)	3 (11)
Limfoma limfoplasmacític (9671/3)	2 (7)
Macroglobulinèmia de Waldenström (9761/3)	1 (3)
Limfoma de la zona marginal extranodal (limfoma MALT) (9699/3)	1 (3)
Limfoma fol·licular (9690/3)	9 (32)
Limfoma B difús de cèl·lules grans, no especificat (9680/3)	3 (11)
Limfoma B d'alt grau amb reordenament de MYC i BCL2 i/o BCL6 (9680/3)	2 (7)

Neoplàsies de cèl·lules T i NK madures	6 (21)
Limfoma de cèl·lules T angioimmunoblàstic (9705/3)	4 (14)
Limfoma anaplàstic de cèl·lules grans, ALK-positiu (9714/3)	1 (4)
Limfoma anaplàstic de cèl·lules grans, ALK-negatiu (9715/3)	1 (4)
Neoplàsia de cèl·lules dendrítiques plasmocitoides blàstiques (9727/3)	1 (4)
Total	28 (100)

ALK, *anaplastic lymphoma kinase*; BCL, *B-cell lymphoma*; ICD-O, *International Classification of Diseases for Oncology*; MALT, teixit limfoide associat a mucoses; NK, *natural killer*; OMS, Organització Mundial de la Salut.

**Taula 15. Resum de les característiques dels pacients amb limfomes cutanis primaris i secundaris**

	Limfomes Cutanis Primaris (n = 149)	Limfomes Cutanis Secundaris (n = 28)	Total (N = 177)
<b>Epidemiologia</b>			
Ràtio (M/F)	1.5 (89/60)	0.9 (13/15)	1.4 (102/75)
Edat al diagnòstic, anys mediana (rang)	55 (8 - 97)	66 (29 - 87)	58 (8 - 97)
<b>Clínica</b>			
Duració dels símptomes fins al diagnòstic, mesos mediana (rang)	18.5 (0 - 479.4)	5 (0.2 - 124)	12.4 (0 - 479.4)
<b>Resultats a la pell</b>			
Biòpsies de pell suma mediana (rang)	360 2 (1 - 10)	43 1 (1 - 6)	403 2 (1 - 10)
Biòpsies de pell seqüencials suma mediana (rang)	263 2 (0 - 9)	22 0 (0 - 4)	285 2 (0 - 9)
Clonalitat n/N (%)	137/149 (91.9)	26/28 (92.9)	163/177 (92.1)
Duració dels símptomes fins a la primera biòpsia clonal, mesos mediana (rang)	12.2 (1 - 280.1)	8.2 (1.1 - 100.7)	12.2 (1 - 280.1)
Homogeneïtat clonal n/N (%)	69/80 (86.3)	6/8 (75)	75/88 (85.2)

Heterogeneïtat clonal n/N (%)	11/80 (13.8)	2/8 (25)	13/88 (14.8)
<b>Resultats a la sang perifèrica</b>			
Mostres de sang perifèrica suma mediana (rang)	246 1 (0 - 9)	32 1 (0 - 6)	278 1 (0 - 9)
Clonalitat n/N (%)	65/123 (52.8)	14/16 (87.5)	79/139 (56.8)
Clon idèntic pell - sp n/N (%)	15/65 (23.1)	10/13 (76.9)	25/78 (32.1)
Clon diferent pell - sp n/N (%)	50/65 (76.9)	3/13 (23.1)	53/78 (67.9)
Anomalies IF als limfòcits B n/N (%)	4/119 (3.4)	5/12 (41.7)	9/131 (6.9)
<b>Terapèutica</b>			
Teràpies dirigides a la pell suma mediana (rang)	286 2 (0 - 6)	28 1 (0 - 9)	314 2 (0 - 9)
Tractaments sistèmics suma mediana (rang)	141 0 (0 - 7)	55 2 (0 - 4)	196 0 (0 - 7)
Resposta global			
RC n (%)	60 (40.5)	11 (39.3)	71 (40.3)
RP n (%)	26 (17.6)	2 (7.1)	28 (15.9)
ORR n (%)	86 (58.1)	13 (46.4)	99 (56.3)
Estable n (%)	37 (25)	5 (17.9)	42 (23.9)
Progressió n (%)	20 (13.5)	9 (32.1)	29 (16.5)
Recidiva n (%)	5 (3.4)	1 (3.6)	6 (3.4)
<b>Evolució</b>			
Estat al darrer control			
Viu sense la malaltia n (%)	48 (32.4)	9 (32.1)	57 (32.4)
Viu amb la malaltia n (%)	60 (40.5)	5 (17.9)	65 (36.9)
Mort per la malaltia n (%)	17 (11.5)	9 (32.1)	26 (14.8)
Mort per altres causes n (%)	23 (15.5)	5 (17.9)	28 (15.9)
Temps de seguiment, mesos mediana (rang)	75.7 (1.2 - 376.8)	68.5 (1.6 - 121.4)	75.3 (1.2 - 376.8)

F, femení; IF, immunofenotípiques; M, masculí; ORR, *objective response rate*; RC, resposta completa; RP, resposta parcial; sp, sang perifèrica.

Les dades en vermell presenten diferències estadísticament significatives ( $p < 0.05$ ).



Els percentatges de detecció de clonalitat a les biòpsies de pell van ser similars a ambdós grups, un 92% als LCP i un 93% als LCS. La demostració d'heterogeneïtat clonal a les biòpsies de pell tampoc va resultar significativament diferent entre els casos de LCP (11/80, 13.8%) i els LCS (2/8, 25%). Tanmateix, la detecció de clonalitat a les mostres de sang perifèrica va ser clarament superior al grup de LCS (14/16, 87.5%) en comparació amb els LCP (65/123, 52.8%). Així mateix, la comparació dels pics clonals identificats a les biòpsies de pell i a les mostres de sang perifèrica va mostrar diferències estadísticament significatives entre els pacients amb LCP i els individus afectats per un LCS. Al grup de LCP tan sols es va observar una coincidència dels clons de la pell i la sang perifèrica en un 23.1% dels casos. En canvi, els pacients amb LCS presentaven majoritàriament (10/13, 77%) un clon idèntic als dos compartiments (pell i sang perifèrica).

### 5.1.2. Limfomes cutanis de cèl·lules T vs. Limfomes cutanis de cèl·lules B

Es van incloure cent catorze LCCT i trenta-cinc LCCB sense observar diferències estadísticament significatives en la distribució per gènere ni en l'edat al diagnòstic. En canvi, la duració dels símptomes fins al diagnòstic i fins a la detecció de la primera biòpsia de pell clonal va ser clarament superior entre els pacients amb LCCT (mediana= 2 anys vs. 0.7 anys). Globalment es va identificar un resultat clonal a alguna biòpsia cutània al 89.5% dels casos de LCCT i a tots els casos de LCCB. No es van obtenir diferències estadísticament significatives respecte la presència d'heterogeneïtat clonal a les biòpsies de pell d'ambdós grups (LCCT= 14.3% vs. LCCB= 11.8%). Per altra banda, sí que es van demostrar resultats de clonalitat a les mostres de sang perifèrica estadísticament diferents: 59/95 (62.1%) casos clonals als LCCT i, només 6/28 casos (21.4%) entre els individus afectats per un LCCB. Tant als pacients amb LCCT com amb LCCB, si exceptuem la SS, en aquells casos en els quals es va detectar algun clon a la sang perifèrica majoritàriament no coincidia amb els respectius clons identificats a les biòpsies cutànies (50/65, 76.9%). A la taula 16 es mostren les característiques resumides dels pacients amb LCCT i LCCB.

Taula 16. Característiques dels pacients amb limfomes cutanis de cèl·lules T i B

	LCCT (N = 114)	LCCB (N = 35)
<b>Epidemiologia</b>		
Ràtio (M/F)	1.7 (72/42)	0.9 (17/18)
Edat al diagnòstic, anys mediana (rang)	54 (8 - 85)	60 (21 - 97)
<b>Clínica</b>		
Duració dels símptomes fins al diagnòstic, mesos mediana (rang)	24.3 (0 - 479.4)	7.7 (1 - 238.2)
<b>Resultats a la pell</b>		
Biòpsies de pell suma mediana (rang)	290 2 (1 - 10)	70 2 (1 - 6)
Biòpsies de pell seqüencials suma mediana (rang)	211 2 (0 - 9)	52 2 (0 - 6)
Clonalitat n/N (%)	102/114 (89.5)	35/35 (100)
Duració dels símptomes fins a la primera biòpsia clonal, mesos mediana (rang)	24.3 (1 - 280.1)	8.1 (1 - 238.2)
Homogeneïtat clonal n/N (%)	54/63 (85.7)	15/17 (88.2)
Heterogeneïtat clonal n/N (%)	9/63 (14.3)	2/17 (11.8)
<b>Resultats a la sang perifèrica</b>		
Mostres de sang perifèrica suma mediana (rang)	203 1 (0 - 9)	43 1 (0 - 3)
Clonalitat n/N (%)	59/95 (62.1)	6/28 (21.4)
Clon idèntic pell - sp n/N (%)	15/59 (25.4)	0/6 (0)
Clon diferent pell - sp n/N (%)	44/59 (74.6)	6/6 (100)

Terapèutica		
Teràpies dirigides a la pell suma mediana (rang)	221 2 (0 - 6)	65 2 (0 - 5)
Tractaments sistèmics suma mediana (rang)	134 0 (0 - 7)	7 0 (0 - 2)
Resposta global		
RC n (%)	32 (28.3)	28 (80)
RP n (%)	24 (21.2)	2 (5.7)
ORR n (%)	56 (49.6)	30 (85.7)
Estable n (%)	36 (31.9)	1 (2.9)
Progressió n (%)	17 (15)	3 (8.6)
Recidiva n (%)	4 (3.5)	1 (2.9)
Evolució		
Estat al darrer control		
Viu sense la malaltia n (%)	24 (21.2)	24 (68.6)
Viu amb la malaltia n (%)	55 (48.7)	5 (14.3)
Mort per la malaltia n (%)	16 (14.2)	1 (2.9)
Mort per altres causes n (%)	18 (15.9)	5 (14.3)
Temps de seguiment, mesos mediana (rang)	75.2 (1.2 - 311.2)	81.9 (1.8 - 376.8)

F, femení; LCCB, limfoma cutani de cèl·lules B; LCCT, limfoma cutani de cèl·lules T; M, masculí; ORR, *objective response rate*; RC, resposta completa; RP, resposta parcial; sp, sang perifèrica.

Les dades en vermell presenten diferències estadísticament significatives ( $p < 0.05$ ).

### 5.1.3. Micosi fungoide i síndrome de Sézary

S'han inclòs seixanta-sis pacients diagnosticats de MF i deu de SS. Inicialment 61 dels 66 casos de MF (92.4%) presentaven un estadi inicial (IA-IIA) i només cinc casos van debutar amb una MF en estadi avançat (IIB). Concretament la categoria T (pell) a la primera visita dels casos de MF i SS disponible va ser: T1a (n = 13), T1b (n = 21), T2a (n = 4), T2b (n = 21), T3 (n = 5) i T4 (n = 8). A la taula 17 es mostra la distribució dels casos de MF/SS en funció de l'estadi clínic a la visita inicial, a la visita final, així com, l'estadificació màxima assolida al llarg del seguiment d'aquests pacients.

Taula 17. Estadificació dels casos de micosi fungoide i síndrome de Sézary

Sistema revisat per ISCL/EORTC d'estadificació de la MF/SS (18)	Estadi inicial n (%)	Estadi màxim n (%)	Estadi final n (%)
IA	37 (48.7)	28 (36.8)	40 (64.5)
IB	22 (28.9)	19 (25)	5 (8.1)
IIA	2 (2.6)	3 (3.9)	
IIB	5 (6.6)	13 (17.1)	5 (8.1)
IIIA			
IIIB			
IVA <sub>1</sub>	9 (11.8)	8 (10.5)	7 (11.3)
IVA <sub>2</sub>	1 (1.3)	5 (6.6)	5 (8.1)
IVB			
Total N (%)	76 (100)	76 (100)	62 (100)

EORTC, *European Organisation of Research and Treatment of Cancer*; ISCL, *International Society for Cutaneous Lymphomas*; MF, micosi fungoide; SS, síndrome de Sézary.

Histològicament es va demostrar transformació a cèl·lula gran a alguna biòpsia de pell durant l'evolució de la malaltia en 10/66 casos de MF (15.2%). D'aquests deu casos, sis d'ells es trobaven en fase de MF tumoral (IIB) i només un en estadi inicial (IA). Per altra banda, es va detectar una elevació sèrica de lactat deshidrogenasa en 8/63 casos de MF (12.7%), principalment en estadis avançats de la neoplàsia (IIB i IVA<sub>2</sub>).

Prenent com a referència l'estadi màxim assolit, els seixanta-sis casos de MF estudiats es poden subdividir en: cinquanta casos en estadis inicials (IA-IIA) i setze en estadis avançats (IIB-IVB). A tots els casos diagnosticats de MF en estadi inicial es va obtenir una puntuació entre 4 i 6 aplicant l'algoritme diagnòstic proposat per la ISCL (taula 6).(10) En tretze casos (26%) la identificació d'un reordenament gènic clonal del TCR va resultar imprescindible per assolir la puntuació mínima requerida a fi d'establir el diagnòstic de MF en estadi inicial. El resum de les característiques principals dels dos subgrups de MF, juntament amb els deu pacients diagnosticats de SS, queda reflectit a la taula 18.

Taula 18. Característiques dels pacients amb micosi fungoide i síndrome de Sézary

	MF en estadis inicials (estadis IA-IIA) (n = 50)	MF en estadis avançats (estadis IIB-IVB) (n = 16)	MF (N = 66)	Síndrome de Sézary (N = 10)
<b>Epidemiologia</b>				
Ràtio (M/F)	1.9 (33/17)	4.3 (13/3)	2.3 (46/20)	1 (5/5)
Edat al diagnòstic, anys mediana (rang)	52 (12 - 85)	56.5 (31 - 80)	53.5 (12 - 85)	71 (61 - 83)
<b>Clínica</b>				
Duració dels símptomes fins al diagnòstic, mesos mediana (rang)	54.8 (1 - 479.4)	30.4 (0 - 133.9)	45.7 (0 - 479.4)	18.5 (3.7 - 86.9)
<b>Resultats a la pell</b>				
Biòpsies de pell suma mediana (rang)	125 2 (1 - 7)	56 3 (1 - 10)	181 2 (1 - 10)	19 2 (1 - 3)
Biòpsies de pell seqüencials suma mediana (rang)	85 2 (0 - 5)	49 3 (0 - 9)	134 2 (0 - 9)	14 2 (0 - 3)
Clonalitat n/N (%)	45/50 (90)	16/16 (100)	61/66 (92.4)	10/10 (100)
Duració dels símptomes fins a la primera biòpsia clonal, mesos mediana (rang)	67 (1 - 275.9)	59.2 (3.5 - 280.1)	60.9 (1 - 280.1)	48.7 (5 - 85.2)
Homogeneïtat clonal n/N (%)	19/24 (79.2)	10/13 (76.9)	29/37 (78.4)	6/6 (100)
Heterogeneïtat clonal n/N (%)	5/24 (20.8)	3/13 (23.1)	8/37 (21.6)	0/6 (0)
<b>Resultats a la sang perifèrica</b>				
Mostres de sang perifèrica suma mediana (rang)	84 1.5 (0 - 5)	37 2 (1 - 5)	121 2 (0 - 5)	32 1.5 (1 - 9)
Clonalitat n/N (%)	24/44 (54.5)	13/16 (81.3)	37/60 (61.7)	9/9 (100)
Clon idèntic pell - sp n/N (%)	4/24 (16.7)	1/13 (7.7)	5/37 (13.5)	8/9 (88.9)
Clon diferent pell - sp n/N (%)	20/24 (83.3)	12/13 (92.3)	32/37 (86.5)	1/9 (11.1)
<b>Classificació 'Blood' ISCL/ EORTC (18)</b>				
B0 n/N (%)	41/42 (97.6)	16/16 (100)	57/58 (98.3)	0
B <sub>0a</sub> n/N (%)	18/42 (42.9)	3/16 (18.8)	21/58 (36.2)	0
B <sub>0b</sub> n/N (%)	23/42 (54.8)	13/16 (81.3)	36/58 (62.1)	0
B1 n/N (%)	1/42 (2.4)	0	1/58 (1.7)	0
B <sub>1a</sub> n/N (%)	0	0	0	0
B <sub>1b</sub> n/N (%)	1/42 (2.4)	0	1/58 (1.7)	0
B2 n/N (%)	0	0	0	9/9 (100)
<b>Classificació 'Blood' EORTC (47)</b>				
B0 n/N (%)	21/26 (80.8)	10/11 (90.9)	31/37 (83.8)	0
B1 n/N (%)	5/26 (19.2)	1/11 (9.1)	6/37 (16.2)	0
B2 n/N (%)	0	0	0	9/9 (100)

Terapèutica				
Teràpies dirigides a la pell				
suma	106	51	157	12
mediana (rang)	2 (1 - 5)	3 (2 - 6)	2 (1 - 6)	1 (0 - 2)
Tractaments sistèmics				
suma	21	41	62	27
mediana (rang)	0 (0 - 6)	2 (0 - 6)	0 (0 - 6)	3 (0 - 5)
Resposta global				
RC n (%)	11 (22)	2 (12.5)	13 (19.7)	0
RP n (%)	15 (30)	3 (18.8)	18 (27.3)	1 (10)
ORR n (%)	26 (52)	5 (31.3)	31 (47)	1 (10)
Estable n (%)	24 (48)	3 (18.8)	27 (40.9)	2 (20)
Progressió n (%)	0	7 (43.8)	7 (10.6)	6 (60)
Recidiva n (%)	0	1 (6.3)	1 (1.5)	1 (10)
Evolució				
Estat al darrer control				
Viu sense la malaltia n (%)	7 (14)	1 (6.3)	8 (12.1)	0
Viu amb la malaltia n (%)	31 (62)	8 (50)	39 (59.1)	3 (30)
Mort per la malaltia n (%)	0	5 (31.3)	5 (7.6)	6 (60)
Mort per altres causes n (%)	12 (24)	2 (12.5)	14 (21.2)	1 (10)
Temps de seguiment, mesos				
mediana (rang)	92.8 (2.1 - 311.2)	67.6 (28.8 - 210.7)	89.7 (2.1 - 311.2)	51.5 (3.4 - 92.1)

EORTC, *European Organisation of Research and Treatment of Cancer*; F, femení; ISCL, *International Society for Cutaneous Lymphomas*; M, masculí; MF, micosi fungoide; ORR, *objective response rate*; RC, resposta completa; RP, resposta parcial; sp, sang perifèrica.

Les dades en vermell presenten diferències estadísticament significatives ( $p < 0.05$ ).

A tots els pacients amb MF i SS es va detectar clonalitat a les biòpsies de pell, excepte a dos casos de MF en estadi IA (T1a) i tres en estadi IB (T2b). L'evolució d'aquests cinc pacients amb MF no clonal va mostrar estabilitat de la malaltia en tres d'ells i una resposta parcial en els altres dos. Al final del seguiment, hi havia tres vius amb la malaltia i dos morts per altres causes (aturada cardiorespiratòria als 75 anys i una pneumònia a un pacient de 54 anys amb antecedent d'un astrocitoma de la medulla espinal grau IV). D'altra banda, es va identificar heterogeneïtat clonal a les biòpsies de pell al voltant del 22% dels individus amb MF i en cap cas de SS.

A les mostres de sang perifèrica es va obtenir clonalitat en 24/44 (54.5%) dels casos de MF en estadis inicials i en 13/16 (81.3%) dels pacients amb MF en estadis avançats. Tot i el considerable nombre de subjectes amb MF i clonalitat a la sang perifèrica (37/60, 61.7%), només en cinc casos, dos en estadi IA, dos en estadi IIA i un en estadi IVA<sub>2</sub>, es va demostrar el mateix clon a la pell i a la sang perifèrica (5/37, 13.5%). El seguiment d'aquests casos de MF amb homogeneïtat clonal pell - sang perifèrica no va evidenciar progressió ni defunció pel limfoma durant un període de temps mitjà

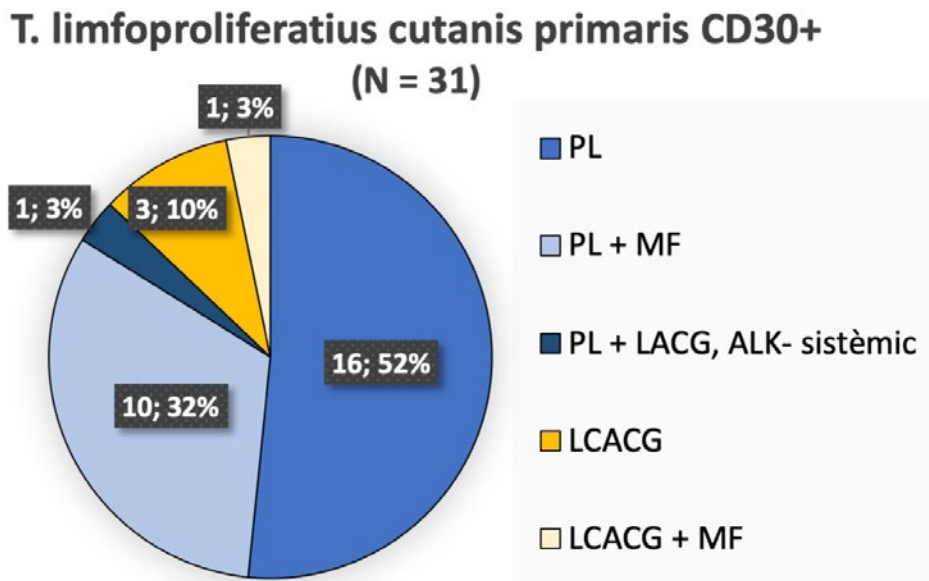
de 8.6 anys (mediana = 6.8 i rang = 5.3 - 13.6). Tots els pacients diagnosticats de SS presentaven mostres de sang perifèrica clonals. A més a més, el clon de limfòcits T identificat a la sang perifèrica era idèntic al clon de la pell a la majoria d'individus afectats de SS (8/9, 88.9%).

Des del punt de vista citomorfològic, els nombres absolut i relatiu de cèl·lules de Sézary van ser, com era esperable, significativament superiors a les mostres de sang perifèrica dels pacients amb SS. A l'estudi immunofenotípic dels limfòcits de la sang perifèrica es va detectar una ràtio CD4/CD8 i uns valors absoluts i relatius de les poblacions limfoides CD4+CD7- i CD4+CD26- clarament més elevats als casos de SS en comparació amb els afectats de MF. En canvi, no es van demostrar diferències estadísticament significatives a l'estudi morfològic, immunofenotípic i genotípic a la sang perifèrica entre els pacients amb MF en estadis inicials (IA-IIA) i avançats (IIB i IVA<sub>2</sub>).

#### **5.1.4. Trastorns limfoproliferatius de cèl·lules T CD30+ cutanis primaris**

Al grup dels LTCD30+ hi ha vint-i-set pacients amb PL, onze dels quals associaven una altra neoplàsia limfoide, i quatre amb LCACG. Histopatològicament, la majoria de PL en les que es va poder determinar el tipus histològic corresponien al tipus A (n = 22, 84.6%), i només alguns casos de PL tipus B (n = 1, 3.8%), tipus C (n = 1, 3.8%) i tipus E (n = 2, 7.7%). Els limfomes associats a la PL consistien en deu casos de MF i un cas de limfoma anaplàstic de cèl·lules grans, ALK-negatiu sistèmic. Addicionalment, dels quatre casos de LCACG un d'ells presentava també una MF (figura 7).

Figura 7. Distribució dels casos de trastorns limfoproliferatius de cèl·lules T CD30+ cutanis primaris



ALK, *anaplastic lymphoma kinase*; LACG, limfoma anaplàstic de cèl·lula gran; LCACG, limfoma cutani anaplàstic de cèl·lula gran; MF, micosi fungoide; PL, papulosi limfomatoide.

Es va detectar un resultat clonal a les biòpsies de pell en 23/31 (74.2%) pacients diagnosticats de LTCD30+. Si ens fixem en el diagnòstic específic, es va demostrar clonalitat en 19/27 (70.4%) dels casos de PL i al 100% (4/4) dels casos de LCACG. La presència d'heterogeneïtat clonal a les biòpsies cutànies d'un mateix pacient va ser evidenciada en 2/15 (13.3%) afectats per un LTCD30+. Concretament, aquells pacients amb una PL o un LCACG que associaven, a més a més, una MF van mostrar el mateix pic clonal entre les biòpsies de pell d'ambdós processos limfoproliferatius cutanis en 5/7 (71.4%) dels casos.

A les mostres de sang perifèrica obtingudes dels pacients diagnosticats de LTCD30+ es va detectar clonalitat en 9/20 (45%) dels casos, ara bé, en tots ells el(s) pic(s) clonal(s) identificat(s) a la sang perifèrica era/eren diferent(s) al(s) pic(s) clonal(s) de les biòpsies de pell. A la taula 19 s'especifica el resum de les característiques principals dels subjectes amb un LTCD30+.



Taula 19. Característiques principals dels pacients amb trastorns limfoproliferatius de cèl·lules T CD30+ cutanis primaris

	PL (n = 27)	LCACG (n = 4)	LTCD30+ (N = 31)
<b>Epidemiologia</b>			
Ràtio (M/F)	2.4 (19/8)	(4/0)	2.9 (23/8)
Edat al diagnòstic, anys mediana (rang)	47 (8 - 79)	55 (45 - 65)	47 (8 - 79)
<b>Clínica</b>			
Duració dels símptomes fins al diagnòstic, mesos mediana (rang)	36 (2 - 438.8)	5 (2 - 6)	16.5 (2 - 438.8)
<b>Resultats a la pell</b>			
Biòpsies de pell suma mediana (rang)	74 3 (1 - 7)	10 2.5 (1 - 4)	84 3 (1 - 7)
Biòpsies de pell seqüencials suma mediana (rang)	50 2 (0 - 5)	9 2.5 (0 - 4)	59 2 (0 - 5)
Clonalitat n/N (%)	19/27 (70.4)	4/4 (100)	23/31 (74.2)
Duració dels símptomes fins a la primera biòpsia clonal, mesos mediana (rang)	13.5 (1.5 - 243.5)	5 (2 - 6)	7.4 (1.5 - 243.5)
Homogeneïtat clonal n/N (%)	11/12 (91.7)	2/3 (66.7)	13/15 (86.7)
Heterogeneïtat clonal n/N (%)	1/12 (8.3)	1/3 (33.3)	2/15 (13.3)
<b>Resultats a la sang perifèrica</b>			
Mostres de sang perifèrica suma mediana (rang)	34 1 (0 - 4)	5 1 (1 - 2)	39 1 (0 - 4)

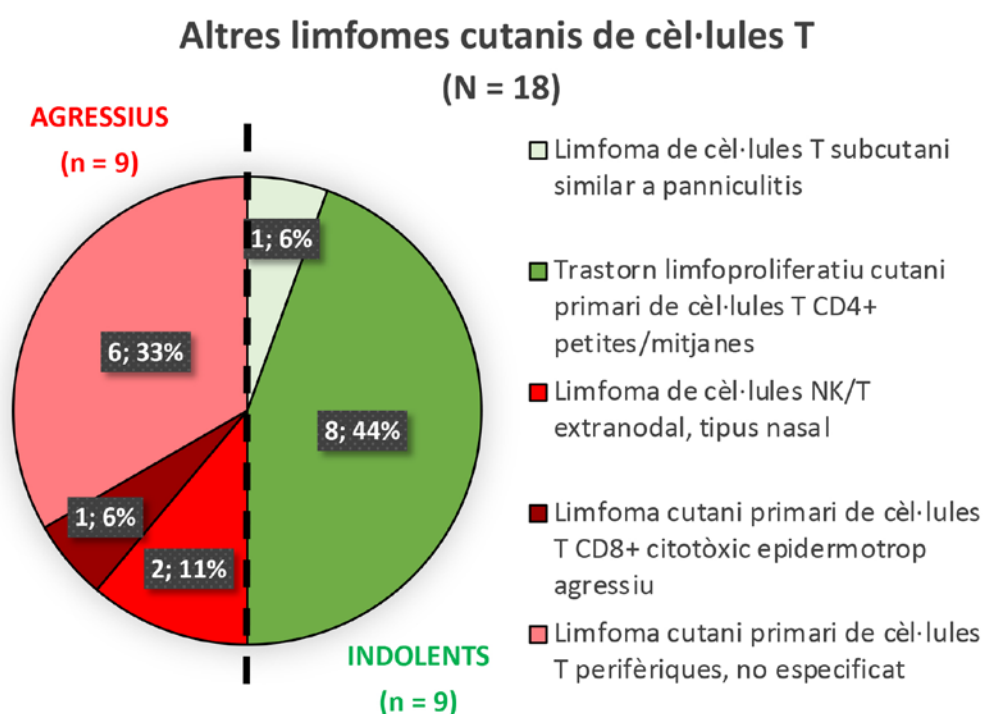
Clonalitat n/N (%)	9/17 (53)	0/3 (0)	9/20 (45)
Clon idèntic pell - sp n/N (%)	0/9 (0)		0/9 (0)
Clon diferent pell - sp n/N (%)	9/9 (100)		9/9 (100)
Terapèutica			
Teràpies dirigides a la pell suma mediana (rang)	39 1 (0 - 4)	3 0.5 (0 - 2)	42 1 (0 - 4)
Tractaments sistèmics suma mediana (rang)	25 0 (0 - 6)	2 0.5 (0 - 1)	27 0 (0 - 6)
Resposta global			
RC n (%)	11 (40.7)	4 (100)	15 (48.4)
RP n (%)	5 (18.5)	0	5 (16.1)
ORR n (%)	16 (59.3)	4 (100)	20 (64.5)
Estable n (%)	11 (40.7)	0	11 (35.5)
Progressió n (%)	0	0	0
Recidiva n (%)	0	0	0
Evolució			
Estat al darrer control			
Viu sense la malaltia n (%)	9 (33.3)	2 (50)	11 (35.5)
Viu amb la malaltia n (%)	13 (48.1)	0	13 (41.9)
Mort per la malaltia n (%)	0	0	0
Mort per altres causes n (%)	5 (18.5)	2 (50)	7 (22.6)
Temps de seguiment, mesos mediana (rang)	80.5 (1.2 - 234.8)	54.5 (35 - 95)	80.5 (1.2 - 234.8)

F, femení; LCACG, limfoma cutani anaplàstic de cèl·lula gran; LTCD30+, trastorns limfoproliferatius de cèl·lules T CD30+ cutanis primaris; M, masculí; ORR, *objective response rate*; PL, papulosi limfomatoide; RC, resposta completa; RP, resposta parcial; sp, sang perifèrica.

### 5.1.5. Altres limfomes cutanis de cèl·lules T

Dins d'aquesta categoria s'inclouen divuit pacients diagnosticats d'un limfoma cutani de cèl·lules T diferent a la MF, la SS i els LTCD30+. Són entitats poc freqüents que es poden agrupar en dos subgrups: indolents i agressius (figura 8).

Figura 8. Distribució dels casos diagnosticats d'altres limfomes cutanis de cèl·lules T diferents a la micosi fungoide, la síndrome de Sézary i els trastorns limfoproliferatius de cèl·lules T CD30+ cutanis primaris



CD, cluster of differentiation; NK, natural killer.

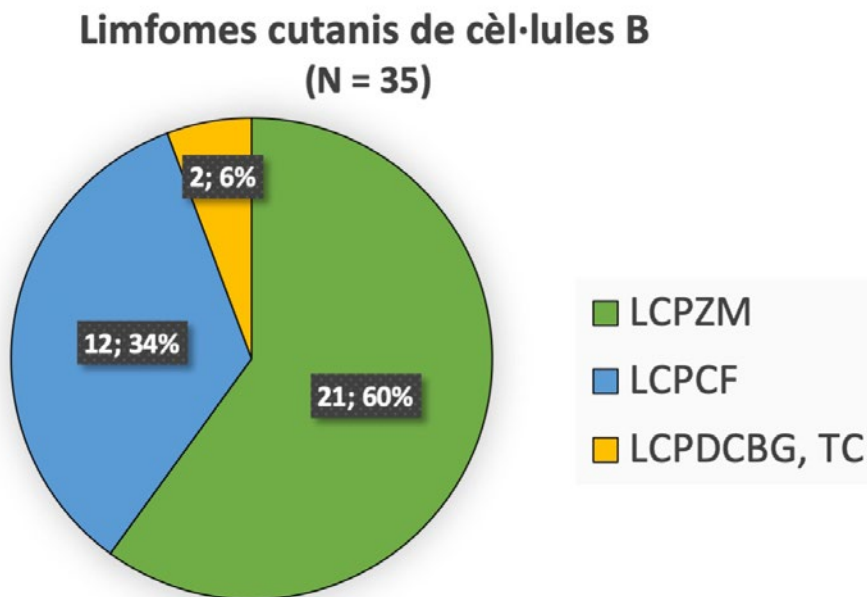
A tots els casos es va detectar clonalitat a les biòpsies de pell obtingudes pel diagnòstic. Es va evidenciar heterogeneïtat clonal a la pell en només un cas (1/12, 8.3%) que corresponia a un trastorn limfoproliferatiu cutani primari de cèl·lules T CD4+ petites/mitjanes.

A les mostres de sang perifèrica es va demostrar clonalitat en 10 dels 16 casos estudiats (62.5%). Concretament es va observar un resultat clonal en 8/9 (88.9%) dels pacients amb un subtipus agressiu de LCCT i en 2/7 (28.6%) dels afectats per un LCCT indolent. Tan sols en un cas de limfoma cutani primari de cèl·lules T perifèriques, no especificat i en un limfoma de cèl·lules NK/T extranodal, tipus nasal es va identificar un clon idèntic a la pell i a la sang perifèrica. A la taula suplementària 1 es resumeixen les característiques principals d'aquest grup de pacients.

### 5.1.6. Limfoma cutani primari de la zona marginal vs. Limfoma cutani primari centre fol·licular

La immensa majoria de LCCB estudiats corresponien als subtipus de curs indolent: LCPZM (21/35, 60%) i LCPCF (12/35, 34.3%). Només es van poder incloure dos casos del LCCB agressiu, LCPDCBG, TC (figura 9).

Figura 9. Distribució dels casos de limfomes cutanis de cèl·lules B en funció del diagnòstic específic



LCPCF, limfoma cutani primari centre fol·licular; LCPDCBG, TC, limfoma cutani primari difús de cèl·lules B grans, tipus cama; LCPZM, limfoma cutani primari de la zona marginal.

Les mostres de pacients diagnosticats de LCPZM i de LCPCF eren bastant homogènies en relació amb la distribució per gènere, l'edat al diagnòstic, la duració dels símptomes fins al diagnòstic o fins a obtenir la primera biòpsia de pell amb un resultat clonal. De fet, es va detectar clonalitat a les biòpsies de pell de tots els casos de LCCB de curs indolent. Només es va identificar la presència d'heterogeneïtat clonal a les biòpsies cutànies de dos pacients diagnosticats de LCPCF (2/17, 11.8%).

A les mostres de sang perifèrica obtingudes d'aquests pacients es va demostrar algun pic clonal en cinc casos de LCPZM (5/19, 26.3%) i en un únic cas diagnosticat de LCPCF (1/9, 11.1%). A tots els sis casos clonals a la sang perifèrica, el clon identificat no coincidia amb el de la pell.

Com era esperable per la història natural i el comportament biològic d'aquests LCCB, ambdós grups van mostrar un pronòstic favorable amb respostes completes al voltant del 90% i cap cas de mort a causa del LCCB. El resum de les característiques principals d'aquests pacients diagnosticats de LCPZM o de LCPCF s'especifica a la taula 20.

**Taula 20. Característiques principals dels pacients diagnosticats de limfomes cutanis de cèl·lules B de curs indolent**

	LCPZM (n = 21)	LCPCF (n = 12)	Total (N = 33)
<b>Epidemiologia</b>			
Ràtio (M/F)	0.8 (9/12)	1.4 (7/5)	0.9 (16/17)
Edat al diagnòstic, anys mediana (rang)	60 (21 - 83)	55 (28 - 86)	58 (21 - 86)
<b>Clínica</b>			
Duració dels símptomes fins al diagnòstic, mesos mediana (rang)	8.1 (1.6 - 93.1)	7.7 (1.5 - 238.2)	7.7 (1.5 - 238.2)
<b>Resultats a la pell</b>			
Biòpsies de pell suma mediana (rang)	41 2 (1 - 6)	27 2 (1 - 6)	68 2 (1 - 6)
Biòpsies de pell seqüencials suma mediana (rang)	30 2 (0 - 4)	22 2 (0 - 6)	52 2 (0 - 6)

Clonalitat n/N (%)	21/21 (100)	12/12 (100)	33/33 (100)
Duració dels símptomes fins a la primera biòpsia clonal, mesos mediana (rang)	8.1 (1.6 - 27.6)	7.9 (1.5 - 238.2)	8.1 (1.5 - 238.2)
Homogeneïtat clonal n/N (%)	10/10 (100)	5/7 (71.4)	15/17 (88.2)
Heterogeneïtat clonal n/N (%)	0/10 (0)	2/7 (28.6)	2/17 (11.8)
<b>Resultats a la sang perifèrica</b>			
Mostres de sang perifèrica suma mediana (rang)	27 1 (0 - 3)	16 1 (0 - 3)	43 1 (0 - 3)
Clonalitat n/N (%)	5/19 (26.3)	1/9 (11.1)	6/28 (21.4)
Clon idèntic pell - sp n/N (%)	0/5 (0)	0/1 (0)	0/6 (0)
Clon diferent pell - sp n/N (%)	5/5 (100)	1/1 (100)	6/6 (100)
Anomalies IF als limfòcits B n/N (%)	2/19 (10.5)	0/9 (0)	2/28 (7.1)
<b>Terapèutica</b>			
Teràpies dirigides a la pell suma mediana (rang)	35 1 (0 - 3)	27 2 (1 - 5)	62 2 (0 - 5)
Tractaments sistèmics suma mediana (rang)	5 0 (0 - 2)	2 0 (0 - 1)	7 0 (0 - 2)
Resposta global			
RC n (%)	20 (95.2)	8 (66.7)	28 (84.9)
RP n (%)	0 (0)	2 (16.7)	2 (6.1)
ORR n (%)	20 (95.2)	10 (83.4)	30 (91)
Estable n (%)	1 (4.8)	0	1 (3)
Progressió n (%)	0	1 (8.3)	1 (3)
Recidiva n (%)	0	1 (8.3)	1 (3)
<b>Evolució</b>			
Estat al darrer control			
Viu sense la malaltia n (%)	17 (81)	7 (58.3)	24 (72.7)
Viu amb la malaltia n (%)	1 (4.8)	4 (33.3)	5 (15.2)
Mort per la malaltia n (%)	0	0	0
Mort per altres causes n (%)	3 (14.3)	1 (8.3)	4 (12.1)
Temps de seguiment, mesos mediana (rang)	88.7 (13.5 - 231.5)	68.8 (3.6 - 376.8)	82.9 (3.6 - 376.8)

F, femení; IF, immunofenotípiques; LCPCF, limfoma cutani primari centre fol·licular; LCPZM, limfoma cutani primari de la zona marginal; M, masculí; ORR, *objective response rate*; RC, resposta completa; RP, resposta parcial; sp, sang perifèrica.

Les dades en vermell presenten diferències estadísticament significatives ( $p < 0.05$ ).

### 5.1.7. Dermatosis inflamatòries benignes o reactives

Es van incloure cent vuitanta pacients en els quals hi havia hagut en algun moment la sospita clínica i/o histopatològica d'un limfoma cutani, tot i que, finalment no es va confirmar i van acabar diagnosticant-se de: dermatosis inflamatòries benignes (n = 117, 65%), dermatosis digitades / parapsoriasis (n = 31, 17.2%), hiperplàsies limfoides cutànies reactives (n = 19, 10.6%), eritrodèrmies inflamatòries benignes (n = 8, 4.4%) o tumors cutanis no limfomes (n = 5, 2.8%). Dins del grup de les dermatosis inflamatòries benignes, els diagnòstics més freqüents varen ser: èczemes, pitiriasi liquenoide crònica, dermatosis purpúriques pigmentades, dermatitis liquenoides i dermatitis atòpica de l'adult (taula 21).

Taula 21. Distribució dels casos de dermatosis inflamatòries benignes

Diagnòstics	n (%)
Èczema / Dermatitis	30 (25.6)
Altres #	29 (24.8)
Pitiriasi liquenoide crònica	11 (9.4)
Dermatosi purpúrica pigmentada	10 (8.5)
Dermatitis liquenoide	9 (7.7)
Dermatitis atòpica de l'adult	7 (6)
Lupus eritematós cutani	5 (4.3)
Toxicodèrmia	5 (4.3)
Dermatitis psoriasiforme	4 (3.4)
Prurigen	4 (3.4)
Picades d'artròpodes	3 (2.6)
Total N (%)	117 (100)

# Dermatitis granulomatosa intersticial (n = 2); dermatitis granulomatosa no especificada (n = 2); granuloma anular (n = 2); leishmaniosi cutània (n = 2); síndrome hipereosinofílica idiopàtica (n = 2); balanitis plasmocel·lular de Zoon (n = 1); dermatosi eosinofílica associada a procés hematològic (reacció tipus picada d'artròpode) (n = 1); ectima gangrenosa (n = 1); eritema anular centrífug (n = 1); eritema elevat *diutinum* (n = 1); escabiosi nodular (n = 1); exantema no especificat (n = 1); hiperpigmentació postinflamatòria (n = 1); ictiosi adquirida (n = 1); mol·lusc contagiós (n = 1); morfea (n = 1); panniculitis infecciosa (n = 1); perifol·liculitis (n = 1); pitiriasi alba (n = 1); *PLCG2-associated antibody deficiency and immune dysregulation* (PLAID) (n = 1); pruija crònica associada a limfoma de cèl·lules del mantell sistèmic (n = 1); síndrome de Sweet histiocítica (n = 1); úlcera oral (n = 1) i vasculitis (n = 1).

A la categoria diagnòstica de tumors cutanis no limfomes (n = 5) hi ha tres queratosis liquenoides benignes, un cas de malaltia de Bowen i un altre de carcinoma escamós cutani infiltrant en els que s'evidenciava un infiltrat limfoide acompanyant prominent a l'estudi histopatològic.

Globalment es va detectar clonalitat a la pell a un de cada cinc pacients (20%) amb infiltrats limfoides cutanis benignes. Concretament a 20/117 (17.1%) casos de dermatosis inflamatòries benignes, a la meitat dels pacients amb eritrodèrmies inflamatòries benignes, tot i que, a aquests casos algunes biòpsies de pell van resultar clonals i altres policlonals. A més a més, es va demostrar clonalitat a 7/19 (36.8%) pacients amb hiperplàsies limfoides cutànies reactives i a 4/31 (12.9%) casos de dermatosis digitades / parapsoriasis (taula 22). A tots els dotze casos, excepte un, en els que es va realitzar l'anàlisi genotípica a més d'una biòpsia de pell es va obtenir un resultat monoclonal a només alguna de les biòpsies cutànies i la resta van resultar policlonals. L'excepció va ser un home de 61 anys en el que es va detectar el mateix reordenament clonal del gen TCRG a les dues biòpsies de pell practicades en 13.8 mesos de diferència i, ambdues, compatibles amb una pitiriasi liquenoide crònica.

Taula 22. Casos de dermatosis no limfomes amb clonalitat a la pell

Dermatosis amb infiltrats limfoides benignes clonals	n (%)
Hiperplàsies limfoides cutànies	7 (19.4)
Dermatosis digitades / parapsoriasis	4 (11.1)
Èczema / Dermatitis	4 (11.1)
Eritrodèrmies inflamatòries benignes	4 (11.1)
Pitiriasi liquenoide crònica	3 (8.3)
Dermatitis atòpica de l'adult	1 (2.8)
Dermatitis liquenoide	1 (2.8)
Dermatitis psoriasiforme	1 (2.8)
Dermatosi eosinofílica associada a procés hematològic <sup>5</sup>	1 (2.8)



Ectima gangrenosa	1 (2.8)
Eritema elevat <i>diutinum</i>	1 (2.8)
Granuloma anular	1 (2.8)
Ictiosi adquirida	1 (2.8)
Lupus eritematós cutani	1 (2.8)
Malaltia de Bowen (carcinoma escamós cutani <i>in situ</i> )	1 (2.8)
Picades d'artròpodes	1 (2.8)
Pruïja crònica associada a limfoma de cèl·lules del mantell sistèmic #	1 (2.8)
Síndrome hipereosinofílica idiopàtica	1 (2.8)
Toxicodèrmia (síndrome DRESS per Levetiracetam)	1 (2.8)
Total N (%)	36 (100)

DRESS, *Drug Reaction with Eosinophilia and Systemic Symptoms*.

<sup>§</sup> Biòpsia cutània amb reacció tipus picada i reordenaments clonals de IGH VH FR1-JH i VH FR2-JH idèntics als observats a la sang perifèrica corresponents a la leucèmia limfàtica crònica B (codi ICD-O 9823/3) de base d'aquest pacient, suggerint la presència de malaltia molecular a la mostra de pell.

<sup>#</sup> Atès que no es disposava de cap resultat monoclonal del limfoma de cèl·lules del mantell sistèmic (codi ICD-O 9673/3) no es va poder comparar amb el reordenament monoclonal de IGH VH FR3-JH identificat a la biòpsia de pell.

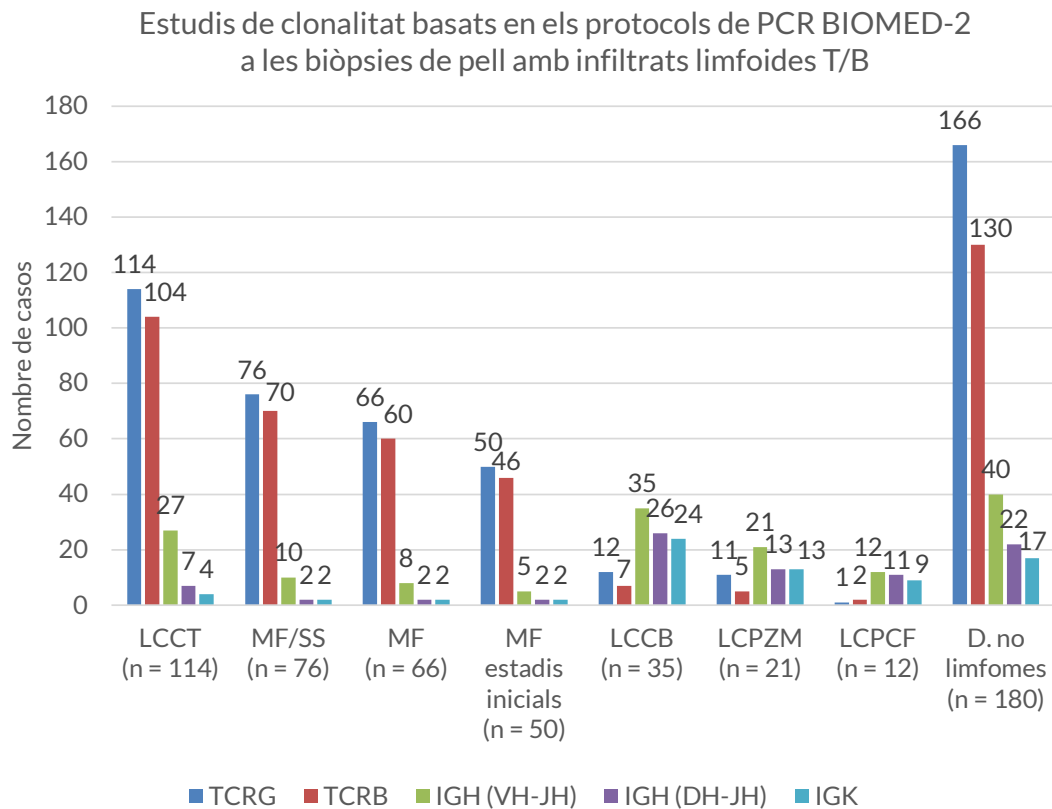
A les mostres de sang perifèrica es va evidenciar clonalitat a 30/56 (53.6%) dels casos estudiats. Malgrat això, només es va identificar el mateix clon a la sang perifèrica i a la pell en dos casos: un home amb una eritrodèrmia clonal pruriginosa en el que es va constatar progressió a una síndrome de Sézary als 10.2 anys de seguiment i, per altra banda, un home diagnosticat de pitiriasi liquenoide crònica que va morir per una altra causa (carcinoma escamós de pulmó en progressió metastàtica) als 7.2 anys de seguiment.

A la taula suplementària 2 es resumeixen les principals característiques dels pacients diagnosticats de diverses dermatosis amb infiltrats limfoides benignes.

## 5.2. Concordança entre les proves del protocol de PCR BIOMED-2

A la majoria de pacients amb sospita diagnòstica d'un LCCT (104/114, 91.2%) es van realitzar simultàniament el TCRG i el TCRB per estudiar la detecció de reordenaments gènics clonals. Per altra banda, en una bona part dels casos diagnosticats de LCCB es van dur a terme, addicionalment a l'estudi dels reordenaments complets del gen IGH (VH-JH), les proves dels reordenaments incomplets del gen IGH (DH-JH) (26/35, 74.3%) i/o dels reordenaments del gen de la cadena lleugera kappa (IGK) (24/35, 68.6%). A la figura 10 es mostra la distribució de les diferents proves de clonalitat del protocol BIOMED-2 efectuades en funció del diagnòstic final.

Figura 10. Distribució de les proves de clonalitat del protocol BIOMED-2 realitzades a les biòpsies cutànies en funció del diagnòstic final

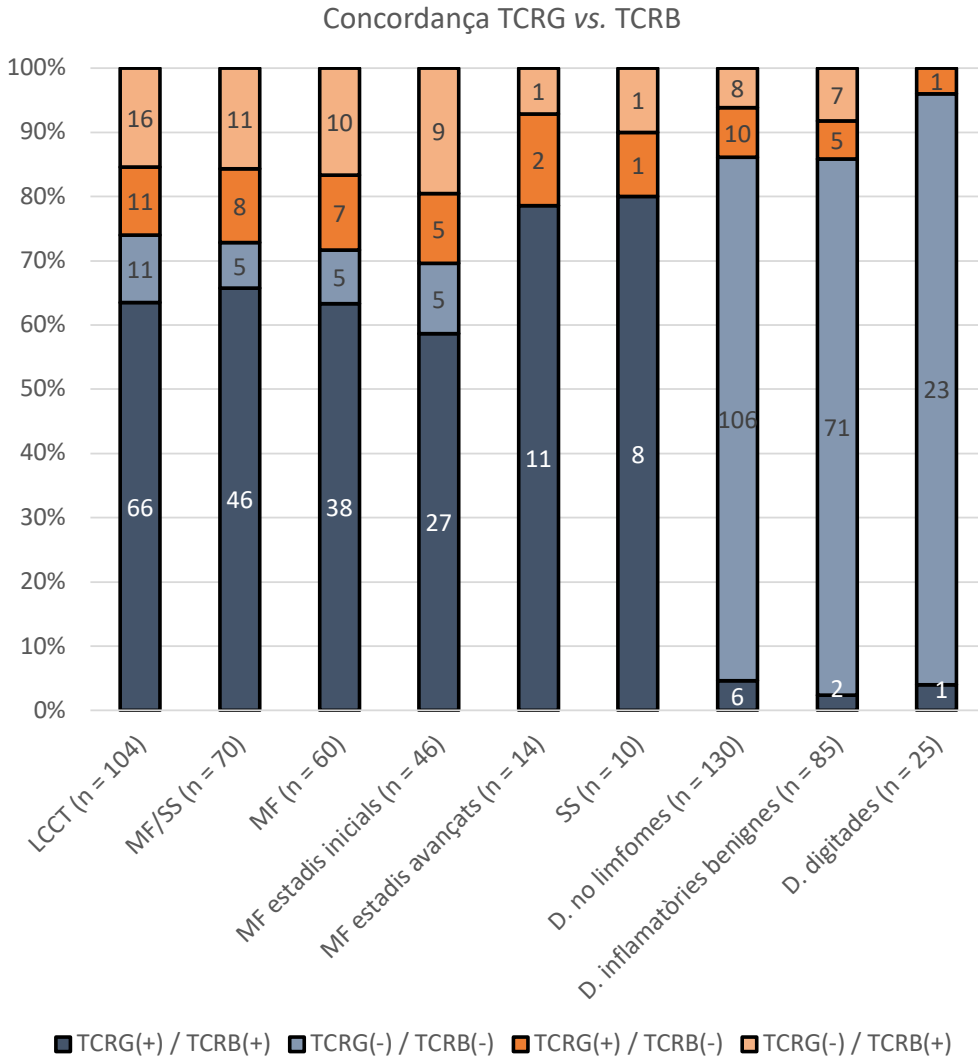


D, dermatosis; IGH (DH-JH), reordenaments incomplets del gen de la cadena pesada de les immunoglobulines; IGH (VH-JH), reordenaments complets del gen de la cadena pesada de les immunoglobulines; IGK, cadena lleugera kappa de les immunoglobulines; LCCB, limfoma cutani de cèl·lules B; LCCT, limfoma cutani de cèl·lules T; LCPCF, limfoma cutani primari centre fol·licular; LCPZM, limfoma cutani primari de la zona marginal; MF, micosi fungoide; SS, síndrome de Sézary; TCRB, cadena beta del receptor de la cèl·lula T; TCRG, cadena gamma del receptor de la cèl·lula T.

### 5.2.1. Concordança entre els reordenaments gènics de les cadenes gamma i beta del receptor de la cèl·lula T (TCRG - TCRB)

Globalment, als 104 casos amb diagnòstic de LCCT en els que es van realitzar les proves TCRG i TCRB per detectar els reordenaments gènics: 66 (63.5%) dels casos van resultar monoclonals a ambdues proves, 11 (10.6%) dels casos policlonals amb les dues tècniques, 11 (10.6%) dels casos monoclonals amb el TCRG i policlonals amb el TCRB i 16 (15.4%) dels casos monoclonals amb el TCRB, tot i que, policlonals amb el TCRG. A la figura 11 es representa la distribució dels casos en funció dels resultats de clonalitat obtinguts amb les dues proves (TCRG i TCRB) als pacients diagnosticats de LCCT, MF/SS, MF, MF en estadis inicials (estadis IA-IIA), MF en estadis avançats (estadis IIB-IVB) i diverses dermatosis inflamatòries benignes caracteritzades histològicament per infiltrats limfoides T prominents. A tots els grups de LCCT els casos identificats com a monoclonals amb ambdues tècniques representen la proporció més gran de casos, entre 27/46 (58.7%) casos als estadis inicials de la MF i 11/14 (78.6%) a les MF en estadi avançat. A més a més, als pacients amb resultats discordants es van detectar més casos TCRG policlonals / TCRB monoclonals que al revés, excepte als estadis avançats de la MF. Per altra banda, a les dermatosis inflamatòries benignes i a les dermatosis digitades (parapsoriasis) es va demostrar policlonalitat amb les dues proves en 71/85 (83.5%) i 23/25 (92%) casos, respectivament. En canvi, només es va detectar monoclonalitat als dos tests en 2/85 (2.4%) dels casos de dermatosis inflamatòries benignes i en 1/25 (4%) dels casos de dermatosis digitades.

Figura 11. Resultats de clonalitat amb l'ús de les proves TCRG i TCRB a les biòpsies cutànies amb infiltrats limfoides T



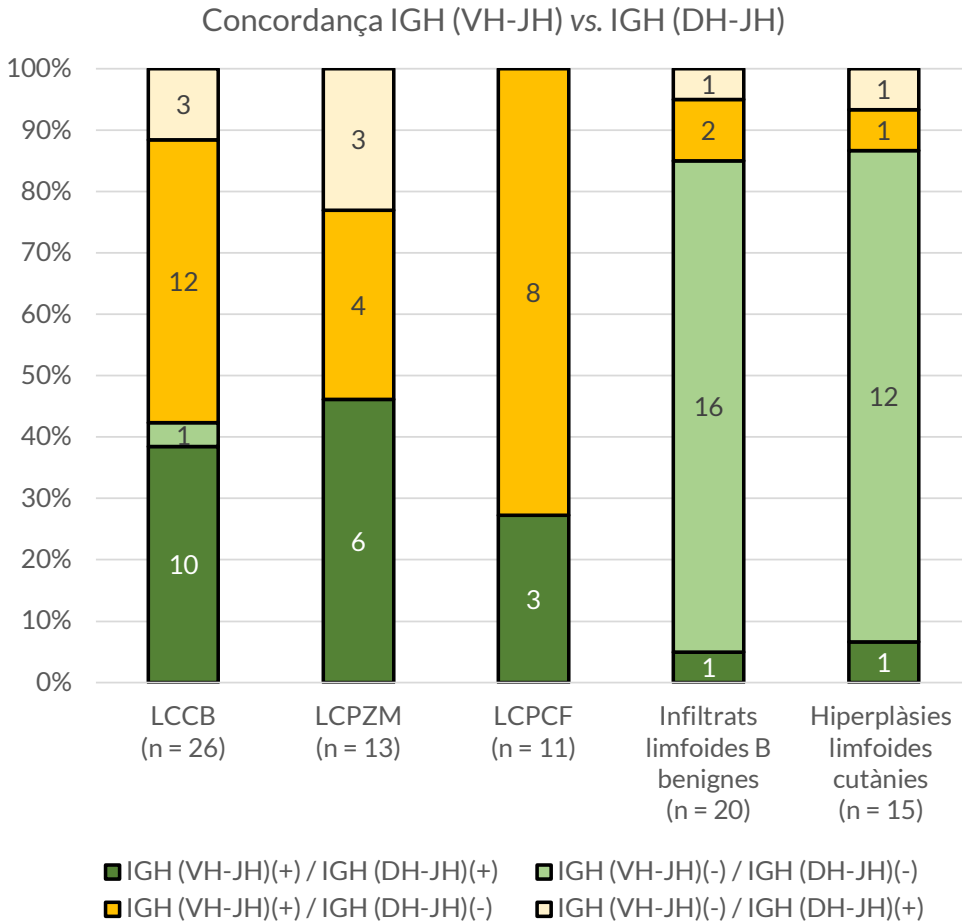
D, dermatosis; LCCT, limfoma cutani de cèl·lules T; MF, micosi fungoide; SS, síndrome de Sézary; TCRB, cadena beta del receptor de la cèl·lula T; TCRG, cadena gamma del receptor de la cèl·lula T.

Els resultats (+) representen monoclonalitat i els resultats (-) policlonalitat.

### 5.2.2. Concordança entre els reordenaments complets (VH-JH) i els incomplets (DH-JH) del gen IGH

Amb l'ús conjunt de les proves per detectar els reordenaments complets (VH-JH) i els incomplets (DH-JH) del gen de la cadena pesada de les immunoglobulines es va detectar monoclonalitat a una o ambdues proves en 25/26 (96.2%) dels casos diagnòsticats de LCCB. L'únic cas amb policlonalitat als reordenaments IGH (VH-JH) i IGH (DH-JH) corresponia a un LCPDCBG, TC que va resultar monoclonal a l'estudi dels reordenaments del gen IGK. Concretament es va obtenir un resultat monoclonal amb les dues proves, IGH (VH-JH) i IGH (DH-JH), en 10/26 (38.5%) dels casos estudiats i un resultat monoclonal amb la IGH (VH-JH) i policlonal al reordenament incomplet en 12/26 (46.2%) dels casos. Tanmateix, la realització de les PCR per detectar els reordenaments incomplets del gen IGH va permetre identificar 3 casos monoclonals de LCPZM que haurien sigut informats policlonals si només s'haguessin estudiat els reordenaments complets de la IGH. En relació amb les biòpsies de pell dels pacients amb infiltrats limfoides B benignes tan sols es va demostrar monoclonalitat a ambdues proves, IGH (VH-JH) i IGH (DH-JH), en 1/20 (5%) dels casos avaluats, la gran majoria d'aquests casos (16/20, 80%) van resultar policlonals a les dues proves. A la figura 12 es representen gràficament com es van distribuir els resultats de clonalitat obtinguts amb l'estudi dels reordenaments complets i incomplets del gen IGH als pacients diagnòsticats de LCCB, LCPZM, LCPCF i diferents processos limfoproliferatius cutanis benignes rics amb infiltrats limfocítics B.

Figura 12. Resultats de clonalitat amb l'ús de les proves IGH (VH-JH) i IGH (DH-JH) a les biòpsies de pell amb infiltrats limfoides B



IGH (DH-JH), reordenaments incomplets del gen de la cadena pesada de les immunoglobulines; IGH (VH-JH), reordenaments complets del gen de la cadena pesada de les immunoglobulines; LCCB, limfoma cutani de cèl·lules B; LCPCF, limfoma cutani primari centre fol·licular; LCPZM, limfoma cutani primari de la zona marginal.

Els resultats (+) representen monoclonalitat i els resultats (-) policlonalitat.

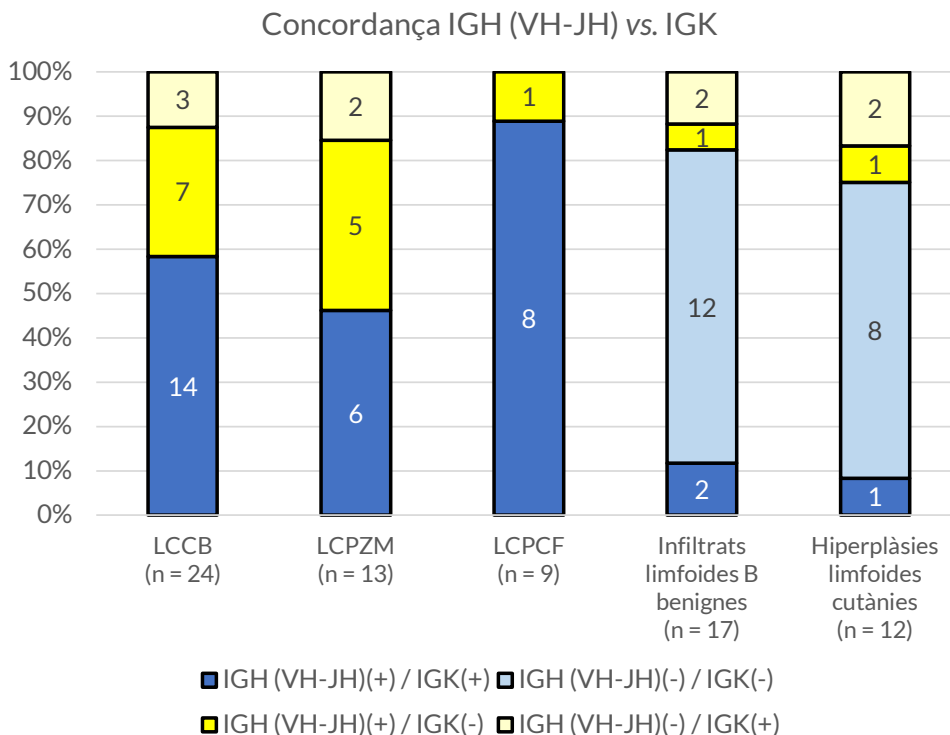
IGH (VH-JH) engloba els tres tubs de PCR: tub A VH FR1-JH, tub B VH FR2-JH i el tub C VH FR3-JH.

### 5.2.3. Concordança entre els reordenaments complets (VH-JH) del gen IGH i els reordenaments del gen IGK (Vκ-Jκ i Vκ/intron-Kde)

L'estudi en conjunt dels reordenaments de IGH (VH-JH) i de IGK va evidenciar un resultat monoclonal a tots els casos de LCCB examinats. Específicament, 14/24 (58.3%) dels casos van ser monoclonals tant amb IGH (VH-JH) com amb IGK i 7/24 (29.2%)

dels casos tan sols varen mostrar monoclonalitat amb l'estudi dels reordenaments complets de IGH. En canvi, la realització de les proves IGK va identificar 3 casos (2 LCPZM i 1 LCPDCBG, TC) com a monoclonals que no haurien estat reconeguts com a tal si només s'haguessin estudiat els reordenaments complets de IGH. Per altra banda, la majoria de casos d'infiltrats limfoides B cutanis benignes (12/17, 70.6%) varen mostrar resultats policlonals a les dues proves. A la figura 13 es representa la distribució dels resultats de clonalitat utilitzant els tests per IGH (VH-JH) i per IGK a les biòpsies de pell de pacients diagnosticats de LCCB, LCPZM, LCPCF i diversos infiltrats limfoides B benignes.

Figura 13. Resultats de clonalitat amb l'ús de les proves IGH (VH-JH) i IGK a les biòpsies cutànies amb infiltrats limfoides B



IGH (VH-JH), reordenaments complets del gen de la cadena pesada de les immunoglobulines; IGK, cadena lleugera kappa de les immunoglobulines; LCCB, limfoma cutani de cèl·lules B; LCPCF, limfoma cutani primari centre fol·licular; LCPZM, limfoma cutani primari de la zona marginal.

Els resultats (+) representen monoclonalitat i els resultats (-) policlonalitat.

IGH (VH-JH) engloba els tres tubs de PCR: tub A VH FR1-JH, tub B VH FR2-JH i el tub C VH FR3-JH.

IGK inclou els reordenaments Vk-Jk (tub A) i també els reordenaments Vk/intron-Kde (tub B).

#### 5.2.4. Concordança de les proves de clonalitat en funció del diagnòstic

En general, es va observar una major proporció de resultats concordants entre el TCRG i el TCRB, en comparació amb les proves IGH (VH-JH) i IGH (DH-JH) o IGK. A la taula 23 es mostren les mesures de concordança entre els resultats detectats mitjançant les proves de clonalitat basades en el protocol de PCR BIOMED-2.

La concordança de resultats TCRG / TCRB va ser màxima als casos diagnosticats de dermatosis digitades (24/25, 96%) i de dermatosis inflamatòries benignes (73/85, 85.9%). Contràriament, la proporció de resultats del TCRG i del TCRB concordants va ser més baixa entre els pacients afectats de MF en estadis inicials (32/46, 69.6%).

Respecte als resultats de IGH (VH-JH) i de IGH (DH-JH), la concordança va ser més alta als casos d'infiltrats limfoides B cutanis benignes (17/20, 85%) i d'hiperplàsies limfoides cutànies (13/15, 86.7%), tanmateix, va ser especialment baixa als casos diagnosticats de LCPCF (3/11, 27.3%). La comparació dels resultats obtinguts amb IGH (VH-JH) i IGK va posar de manifest una concordança particularment elevada als casos de LCPCF (8/9, 88.9%) i als infiltrats limfoides B benignes (14/17, 82.4%).

Amb el càlcul del coeficient kappa de Cohen tan sols es va identificar una força de concordança considerable o moderada en 3/19 dels escenaris clínics estudiats: TCRG / TCRB a les dermatosis digitades ( $\kappa = 0.65$ ), IGH (VH-JH) / IGK als infiltrats limfoides B cutanis benignes ( $\kappa = 0.46$ ) i IGH (VH-JH) / IGH (DH-JH) a les hiperplàsies limfoides cutànies ( $\kappa = 0.42$ ).



**Taula 23. Concordança entre els resultats de clonalitat a les biòpsies de pell obtinguts mitjançant diferents proves del protocol de PCR BIOMED-2**

Diagnòstic	Tests diagnòstics	Resultats concordants n/N (%)	Valor p	Coefficient Kappa de Cohen $\kappa$ (IC 95%)
LCCT	TCRG, TCRB	77/104 (74)	<b>0.006</b>	0.28 (0.09 - 0.47)
MF/SS	TCRG, TCRB	51/70 (72.9)	0.156	0.18 (-0.06 - 0.41)
MF	TCRG, TCRB	43/60 (71.7)	0.153	0.19 (-0.06 - 0.44)
MF estadis inicials	TCRG, TCRB	32/46 (69.6)	0.242	0.22 (-0.06 - 0.5)
MF estadis avançats	TCRG, TCRB	11/14 (78.6)	1	-0.11 (-0.59 - 0.38)
SS	TCRG, TCRB	8/10 (80)	1	-0.11 (-0.73 - 0.51)
Dermatosis no limfomes	TCRG, TCRB	113/130 (86.9)	<b>0.002</b>	0.34 (0.17 - 0.51)
Dermatosis inflamatòries benignes	TCRG, TCRB	73/85 (85.9)	0.159	0.17 (-0.04 - 0.38)
Dermatosis digitades	TCRG, TCRB	24/25 (96)	0.08	0.65 (0.28 - 1.01)
LCCB	IGH (VH-JH), IGH (DH-JH)	11/26 (42.3)	0.593	-0.15 (-0.43 - 0.12)
	IGH (VH-JH), IGK	14/24 (58.3)	0.530	-0.21 (-0.56 - 0.14)
LCPZM	IGH (VH-JH), IGH (DH-JH)	6/13 (46.2)	0.497	-0.36 (-0.89 - 0.18)
	IGH (VH-JH), IGK	6/13 (46.2)	0.487	-0.28 (-0.74 - 0.17)
LCPCF	IGH (VH-JH), IGH (DH-JH)	3/11 (27.3)	1	0 (0 - 0)
	IGH (VH-JH), IGK	8/9 (88.9)	1	0 (0 - 0)
Infiltrats limfoides B benignes	IGH (VH-JH), IGH (DH-JH)	17/20 (85)	0.284	0.32 (-0.11 - 0.74)
	IGH (VH-JH), IGK	14/17 (82.4)	0.121	0.46 (-0.005 - 0.93)
Hiperplàsies limfoides cutànies	IGH (VH-JH), IGH (DH-JH)	13/15 (86.7)	0.257	0.42 (-0.08 - 0.93)
	IGH (VH-JH), IGK	9/12 (75)	0.455	0.25 (-0.3 - 0.8)

IC 95%, interval de confiança del 95%; IGH (DH-JH), reordenaments incomplets del gen de la cadena pesada de les immunoglobulines; IGH (VH-JH), reordenaments complets del gen de la cadena pesada de les immunoglobulines; IGK, cadena lleugera kappa de les immunoglobulines; LCCB, limfoma cutani de cèl·lules B; LCCT, limfoma cutani de cèl·lules T; LCPCF, limfoma cutani primari centre fol·licular; LCPZM, limfoma cutani primari de la zona marginal; MF, micosi fungoide; SS, síndrome de Sézary; TCRB, cadena beta del receptor de la cèl·lula T; TCRG, cadena gamma del receptor de la cèl·lula T.

Les dades en vermell presenten diferències estadísticament significatives ( $p < 0.05$ ).

### 5.3. Valor diagnòstic de les proves de detecció de clonalitat basades en el protocol de PCR BIOMED-2

#### 5.3.1. Limfomes cutanis de cèl·lules T vs. infiltrats limfoides T cutanis benignes

L'estudi dels reordenaments del gen TCRB va mostrar una sensibilitat (82/104, 78.8%), una especificitat (116/130, 89.2%) i uns VPP (82/96, 85.4%) i VPN (116/138, 84.1%) superiors, tot i que no estadísticament significatius, respecte al TCRG. A més a més, la realització conjunta d'ambdós tests diagnòstics, TCRG i TCRB, a les biòpsies de pell amb sospita d'un LCCT incrementava significativament la sensibilitat i el VPN en comparació amb cadascun dels tests de forma aïllada. No obstant, aquesta millora de la sensibilitat i del VPN s'acompanyava d'una reducció, també estadísticament significativa, dels valors d'especificitat. A la taula 24 es presenten els paràmetres de validació dels tests diagnòstics TCRG i TCRB aïlladament i conjuntament, així com, les seves comparacions.

Taula 24. Mesures de precisió diagnòstica de les proves TCRG i TCRB als limfomes cutanis de cèl·lules T

LCCT (n = 104) vs. Infiltrats limfoides T cutanis benignes (n = 130)			
	TCRG	TCRB	TCRG + TCRB <sup>#</sup>
Sensibilitat	74.0 (64.5 - 82.1)	78.8 (69.7 - 86.2)	89.4 (81.9 - 94.6)
Especificitat	87.7 (80.8 - 92.8)	89.2 (82.6 - 94.0)	81.5 (73.8 - 87.8)
VPP	82.8 (73.6 - 89.8)	85.4 (76.7 - 91.8)	79.5 (71.0 - 86.4)
VPN	80.9 (73.4 - 87.0)	84.1 (76.9 - 89.7)	90.6 (83.8 - 95.2)
<u>TCRG / TCRB</u>		<u>TCRG / TCRG + TCRB<sup>#</sup></u>	<u>TCRB / TCRG + TCRB<sup>#</sup></u>
S p = 0.442		S p < 0.001	S p = 0.001
E p = 0.815		E p = 0.008	E p = 0.002
VPP p = 0.501		VPP p = 0.134	VPP p = 0.013
VPN p = 0.304		VPN p < 0.001	VPN p = 0.003

E, especificitat; LCCT, limfoma cutani de cèl·lules T; S, sensibilitat; TCRB, cadena beta del receptor de la cèl·lula T; TCRG, cadena gamma del receptor de la cèl·lula T; VPN, valor predictiu negatiu; VPP, valor predictiu positiu.

Les dades es presenten com a percentatge i interval de confiança del 95%.

Les dades en vermell mostren diferències estadísticament significatives (p < 0.05).

<sup>#</sup>Almenys un dels dos tests (TCRG o TCRB) positiu.

### 5.3.2. Micosi fungoide vs. infiltrats limfoides T cutanis benignes

Les diferències en les xifres de sensibilitat, especificitat, VPP i VPN entre l'examen aïllat del TCRG o el TCRB a les biòpsies de pell de casos sospitosos de MF no van ser estadísticament significatives. Tot i això, el TCRB es va mostrar lleugerament més sensible (48/60, 80%) i, gairebé tan específic, com el TCRG. L'avaluació conjunta del TCRG i el TCRB implicava uns guanys estadísticament significatius de sensibilitat diagnòstica (55/60, 91.7%) i de VPN (98/103, 95.1%), malgrat que, en detriment d'una pèrdua d'especificitat (98/118, 83.1%) (taula 25).

Taula 25. Mesures de precisió diagnòstica de les proves TCRG i TCRB a la micosi fungoide

MF (n = 60) vs. Infiltrats limfoides T cutanis benignes (n = 118)			
	TCRG	TCRB	TCRG + TCRB <sup>#</sup>
Sensibilitat	75.0 (62.1 – 85.3)	80.0 (67.7 – 89.2)	91.7 (81.6 – 97.2)
Especificitat	89.8 (82.9 – 94.6)	89.0 (81.9 – 94.0)	83.1 (75.0 – 89.3)
VPP	78.9 (66.1 – 88.6)	78.7 (66.3 – 88.1)	73.3 (61.9 – 82.9)
VPN	87.6 (80.4 – 92.9)	89.7 (82.8 – 94.6)	95.1 (89.0 – 98.4)
<u>TCRG / TCRB</u>		<u>TCRG / TCRG + TCRB<sup>#</sup></u>	<u>TCRB / TCRG + TCRB<sup>#</sup></u>
S p = 0.629		S p = 0.002	S p = 0.016
E p = 1.000		E p = 0.008	E p = 0.016
VPP p = 0.962		VPP p = 0.088	VPP p = 0.072
VPN p = 0.489		VPN p = 0.003	VPN p = 0.012

E, especificitat; MF, micosi fungoide; S, sensibilitat; TCRB, cadena beta del receptor de la cèl·lula T; TCRG, cadena gamma del receptor de la cèl·lula T; VPN, valor predictiu negatiu; VPP, valor predictiu positiu.

Les dades es presenten com a percentatge i interval de confiança del 95%.

Les dades en vermell mostren diferències estadísticament significatives ( $p < 0.05$ ).

<sup>#</sup> Almenys un dels dos tests (TCRG o TCRB) positiu.

### 5.3.3. Micosi fungoide en estadis inicials (IA – IIA) vs. infiltrats limfoides T cutanis benignes

L'estudi dels reordenaments gènics del TCRB es va mostrar discretament més sensible (36/46, 78.3%) per distingir els casos de MF en estadis inicials respecte a diverses dermatosis inflamatòries benignes i dermatosis digitades (parapsoriasis). Tot i aquesta tendència més favorable del TCRB, no es van detectar diferències estadísticament significatives de sensibilitat, especificitat, VPP o VPN en comparació amb el TCRG. L'estudi conjunt del TCRG i el TCRB va evidenciar un increment significatiu de la sensibilitat diagnòstica (41/46, 89.1%) respecte a la prova TCRG aïllada, així com, un augment no estadísticament significatiu respecte al TCRB. El VPN de l'examen combinat també va resultar clarament superior en comparació amb el de cadascuna de les proves per separat. No obstant, amb la combinació dels dos tests diagnòstics TCRG i TCRB s'observava una reducció significativa de l'especificitat (94/110, 85.5%) i no estadísticament significativa del VPP (taula 26).

Taula 26. Paràmetres de validació dels tests diagnòstics TCRG i TCRB als estadis inicials de la micosi fungoide (estadis IA-IIA)

MF estadis inicials (n = 46) vs. Infiltrats limfoides T cutanis benignes (n = 110)			
	TCRG	TCRB	TCRG + TCRB <sup>#</sup>
Sensibilitat	69.6 (54.2 – 82.3)	78.3 (63.6 – 89.1)	89.1 (76.4 – 96.4)
Especificitat	91.8 (85.0 – 96.2)	90.9 (83.9 – 95.6)	85.5 (77.5 – 91.5)
VPP	78.0 (62.4 – 89.4)	78.3 (63.6 – 89.1)	71.9 (58.5 – 83.0)
VPN	87.8 (80.4 – 93.2)	90.9 (83.9 – 95.6)	94.9 (88.6 – 98.3)
<u>TCRG / TCRB</u>		<u>TCRG / TCRG + TCRB<sup>#</sup></u>	<u>TCRB / TCRG + TCRB<sup>#</sup></u>
S p = 0.424		S p = 0.004	S p = 0.063
E p = 1.000		E p = 0.016	E p = 0.031
VPP p = 0.975		VPP p = 0.136	VPP p = 0.077
VPN p = 0.302		VPN p = 0.004	VPN p = 0.037

E, especificitat; MF, micosi fungoide; S, sensibilitat; TCRB, cadena beta del receptor de la cèl·lula T; TCRG, cadena gamma del receptor de la cèl·lula T; VPN, valor predictiu negatiu; VPP, valor predictiu positiu.

Les dades es presenten com a percentatge i interval de confiança del 95%.

Les dades en vermell mostren diferències estadísticament significatives ( $p < 0.05$ ).

<sup>#</sup>Almenys un dels dos tests (TCRG o TCRB) positiu.

### 5.3.4. Limfomes cutanis de cèl·lules B vs. infiltrats limfoides B cutanis benignes

L'estudi dels reordenaments complets del gen IGH a partir del tub A de PCR múltiplex, incloent els encebadors dirigits a FR1, va ser el que va demostrar un perfil de sensibilitat, especificitat, VPP i VPN més favorable dels tres, tot i així, només es van constatar diferències estadísticament significatives en el VPN de IGH tub A VH FR1-JH i IGH tub C VH FR3-JH. L'avaluació conjunta dels reordenaments complets de IGH mitjançant els tres tubs de PCR va mostrar una sensibilitat del 85.7% (18/21), una especificitat del 82.4% (14/17) i un VPP i VPN de 85.7% (18/21) i 82.4% (14/17), respectivament. A la nostra sèrie de pacients amb LCCB, es va identificar un resultat monoclonal als tres tubs de PCR (A, B i C) per IGH (VH-JH) al 22.9% (8/35) dels casos, a dos dels tubs al 25.7% (9/35) dels individus i, a només un dels tres tubs, al 40% (14/35) dels casos estudiats.

En total hi va haver quatre casos falsos negatius (taxa de falsos negatius = 4/27, 14.8%) amb IGH (VH-JH), tres LCPZM i un LCPDCBG, TC, en els que es va detectar un resultat monoclonal a través de l'estudi dels reordenaments incomplets IGH (DH-JH) i/o del gen IGK. La realització addicional de les proves de PCR per examinar els reordenaments incomplets de IGH (DH-JH) i/o els reordenaments del gen IGK (Vκ-Jκ i Vκ/intron-Kde) va permetre assolir una sensibilitat diagnòstica i un VPN del 100%, malgrat que, en detriment d'augmentar la taxa de falsos positius de 4/22 (18.2%) a 13/22 (59.1%) i, en conseqüència, disminuir l'especificitat i el VPP del conjunt de tests diagnòstics moleculars (taula 27).

Taula 27. Mesures de precisió diagnòstica de les proves IGH (VH-JH), IGH (DH-JH) i IGK als limfomes cutanis de cèl·lules B

LCCB (n = 31) vs. Infiltrats limfoides B cutanis benignes (n = 38)			
	IGH VH FR1-JH	IGH VH FR2-JH	IGH VH FR3-JH
Sensibilitat	67.7 (48.6 – 83.3)	54.8 (36.0 – 72.7)	41.9 (24.5 – 60.9)
Especificitat	97.4 (86.2 – 99.9)	92.1 (78.6 – 98.3)	94.7 (82.3 – 99.4)
VPP	95.5 (77.2 – 99.9)	85.0 (62.1 – 96.8)	86.7 (59.5 – 98.3)
VPN	78.7 (64.3 – 89.3)	71.4 (56.7 – 83.4)	66.7 (52.5 – 78.9)
<u>Tub A FR1 / Tub B FR2</u>		<u>Tub A FR1 / Tub C FR3</u>	
S p = 0.388 E p = 0.500 VPP p = 0.132 VPN p = 0.186		S p = 0.077 E p = 1.000 VPP p = 0.378 VPN p = 0.040	
		<u>Tub B FR2 / Tub C FR3</u>	
		S p = 0.549 E p = 1.000 VPP p = 0.796 VPN p = 0.383	
	IGH (VH-JH) <sup>#</sup>	IGH (VH-JH) + IGK (Vκ-Jκ i Vκ/intron-Kde) <sup>#</sup>	IGH (VH-JH) + IGH (DH-JH) + IGK (Vκ-Jκ i Vκ/ intron-Kde) <sup>#</sup>
Sensibilitat	85.7 (70.7 – 100)	100 (83.9 – 100)	100 (87.2 – 100)
Especificitat	82.4 (64.2 – 100)	70.6 (44.0 – 89.7)	40.9 (20.7 – 63.6)
VPP	85.7 (70.7 – 100)	80.8 (60.6 – 93.4)	67.5 (50.9 – 81.4)
VPN	82.4 (64.2 – 100)	100 (73.5 – 100)	100 (66.4 – 100)
<u>IGH (VH-JH)<sup>#</sup> / IGH (VH-JH) + IGK<sup>#</sup></u>		<u>IGH (VH-JH)<sup>#</sup> / IGH (VH-JH) + IGH (DH-JH) + IGK<sup>#</sup></u>	
S p = 0.250 E p = 0.500 VPP p = 0.314 VPN p = 0.084		S p = 0.125 E p = 0.004 VPP p = 0.007 VPN p = 0.046	

E, especificitat; FR, *framework regions*; IGH (DH-JH), reordenaments incomplets del gen de la cadena pesada de les immunoglobulines; IGH (VH-JH), reordenaments complets del gen de la cadena pesada de les immunoglobulines; IGK, cadena lleugera kappa de les immunoglobulines; Kde, *kappa deleting element*; LCCB, limfoma cutani de cèl·lules B; S, sensibilitat; VPN, valor predictiu negatiu; VPP, valor predictiu positiu.

Les dades es presenten com a percentatge i interval de confiança del 95%.

Les dades en vermell mostren diferències estadísticament significatives ( $p < 0.05$ ).

<sup>#</sup>Almenys un dels tests (tubs de PCR) positiu.

### 5.3.5. Limfoma cutani primari de la zona marginal vs. infiltrats limfoides B cutanis benignes

L'estudi dels reordenaments complets del gen IGH (VH-JH) va mostrar un resultat clonal a tots els casos diagnosticats de LCPZM excepte a tres pacients, en els quals es va detectar monoclonalitat mitjançant les proves per estudiar els reordenaments incomplets de IGH (DH-JH) i els reordenaments gènics de IGK en tres i dos dels casos, respectivament. Particularment, la sensibilitat, l'especificitat, el VPP i el VPN varen ser superiors utilitzant el tub A de PCR múltiplex IGH VH FR1-JH, tot i així, les diferències no van ser estadísticament significatives en comparació amb els resultats obtinguts a partir dels altres dos tubs de PCR. La realització del protocol sencer per estudiar els reordenaments de IGH complets (VH-JH) i incomplets (DH-JH) conjuntament amb els de IGK aconsegueix detectar monoclonalitat al 100% dels casos diagnosticats de LCPZM, no obstant, incrementa la taxa de falsos positius de 4/22 (18.2%) utilitzant només IGH (VH-JH) fins a 13/22 (59.1%) amb el protocol complet. En conseqüència, l'especificitat i el VPP es veuen reduïts de forma estadísticament significativa amb l'aplicació del protocol complet per l'estudi de clonalitat B (taula suplementària 3).

### 5.3.6. Limfoma cutani primari centre fol·licular vs. infiltrats limfoides B cutanis benignes

L'avaluació conjunta dels tres tubs de PCR múltiplex per estudiar els reordenaments complets de IGH (VH-JH) va posar de manifest un resultat monoclonal al 100% dels casos diagnosticats de LCPCF. De manera similar a les troballes identificades al conjunt de LCCB i als LCPZM, el tub A IGH VH FR1-JH va ser el que va mostrar unes xifres de sensibilitat, especificitat, VPP i VPN més elevades, tanmateix, no es van trobar diferències estadísticament significatives en comparació amb els resultats del tub B IGH VH FR2-JH i del tub C IGH VH FR3-JH. La realització addicional de les tècniques de PCR per estudiar els reordenaments incomplets de IGH (DH-JH) i de IGK (Vκ-Jκ i Vκ/intron-Kde), en el context dels LCPCF, tan sols va representar una disminució significativa de l'especificitat i del VPP (taula suplementària 4).

## 5.4. Associacions entre la detecció de clonalitat a les biòpsies cutànies i certs esdeveniments clínics

### 5.4.1. Associació entre la detecció de clonalitat a la pell i el desenvolupament d'un segon limfoma en el context d'una papulosi limfomatoide

La detecció de clonalitat amb la prova del TCRG o el TCRB a les biòpsies de pell dels pacients amb PL és més freqüent entre els casos que associen una segona neoplàsia limfoide (9/11, 81.8%) en comparació amb els individus afectats únicament per PL (10/16, 62.5%). Malgrat aquesta tendència de les PL clonals respecte a les no clonals a presentar un altre limfoma maligne associat (*Odds Ratio* = 2.7), no s'ha demostrat una significació estadística ( $p = 0.289$ ) (figura 14).

Figura 14. Associació entre la detecció de clonalitat a les biòpsies cutànies dels pacients amb papulosi limfomatoide i el desenvolupament d'una segona neoplàsia limfoide

#### Clonalitat a la pell com a factor predictor d'un segon limfoma als casos de PL

Clonalitat a la pell TCRG/TCRB	PL n (%)	PL + Limfoma maligne associat a PL* n (%)	Total N (%)
NO	6 (37.5)	2 (18.2)	8 (29.6)
SÍ	10 (62.5)	9 (81.8)	19 (70.4)
	16 (100)	11 (100)	27 (100)

\* MF (n=10) i LACG, ALK-negatiu sistèmic (n=1).

<u>V. dependent</u> 2n limfoma	<u>V. independent</u> clonalitat a la pell	<i>Odds Ratio</i>	Valor p	IC 95%
No clonalitat a la pell	Clonalitat a la pell	1	0.289	0.43 – 16.94

ALK, *anaplastic lymphoma kinase*; IC, interval de confiança; LACG, limfoma anaplàstic de cèl·lula gran; MF, micosi fungoide; PL, papulosi limfomatoide; TCRB, cadena beta del receptor de la cèl·lula T; TCRG, cadena gamma del receptor de la cèl·lula T; V, variable.



#### 5.4.2. Evolució dels processos limfoproliferatius B cutanis respecte a la detecció de clonalitat a la pell i al diagnòstic

D'un total de 77 casos amb infiltrats limfoides B a les biòpsies de pell, es van diagnosticar 35 LCCB i 42 infiltrats limfoides B cutanis benignes, entre els quals s'inclouen 16 hiperplàsies limfoides cutànies reactives (taula 12). Globalment es va obtenir un resultat monoclonal en 52/77 (67.5%) dels casos. Específicament, es va detectar monoclonalitat a les biòpsies cutànies de tots els casos diagnosticats de LCCB i de 17 (40.5%) dels infiltrats limfoides B cutanis benignes. Tenint en compte que la immensa majoria de LCCB (33/35, 94.3%) corresponien als subtipus de curs indolent, LCPZM i LCPCF, no es van trobar diferències estadísticament significatives en l'obtenció d'una resposta completa segons el diagnòstic establert, LCCB vs. infiltrats limfoides B cutanis benignes (figura 15). Tampoc es van identificar diferències significatives estadísticament en l'assoliment d'una resposta completa entre els casos monoclonals i els policlonals (figura 16).

Figura 15. Evolució dels processos limfoproliferatius cutanis de cèl·lules B respecte al diagnòstic

<b>Evolució dels processos limfoproliferatius B cutanis respecte al diagnòstic</b>			
<b>Diagnòstic</b>	<b>Resposta Global</b>		<b>Total</b>
	<b>RP + Estable + Progressió + Recidiva n (%)</b>	<b>RC n (%)</b>	
Inf. limfoides B benignes	10 (58.8)	32 (53.3)	42 (54.5)
LCCB	7 (41.2)	28 (46.7)	35 (45.5)
	17 (100)	60 (100)	77 (100)
<b><i>V. dependent</i></b> RC	<b><i>Odds Ratio</i></b>	<b>Valor p</b>	<b>IC 95%</b>
<b><i>V. independent</i></b> diagnòstic			
Infiltrats limfoides B benignes	1		
LCCB	1.25	0.688	0.42 – 3.72

Figura 16. Evolució dels processos limfoproliferatius cutanis de cèl·lules B respecte a la detecció de clonalitat a les biòpsies de pell

<b>Evolució dels processos limfoproliferatius B cutanis respecte a la detecció de clonalitat a la pell</b>			
<b>Clonalitat a la pell</b>	<b>Resposta Global</b>		<b>Total</b>
	<b>RP + Estable + Progressió + Recidiva</b>	<b>RC</b>	
	<b>n (%)</b>	<b>n (%)</b>	<b>N (%)</b>
Policlonal	7 (41.2)	18 (30)	25 (32.5)
Monoclonal	10 (58.8)	42 (70)	52 (67.5)
	17 (100)	60 (100)	77 (100)

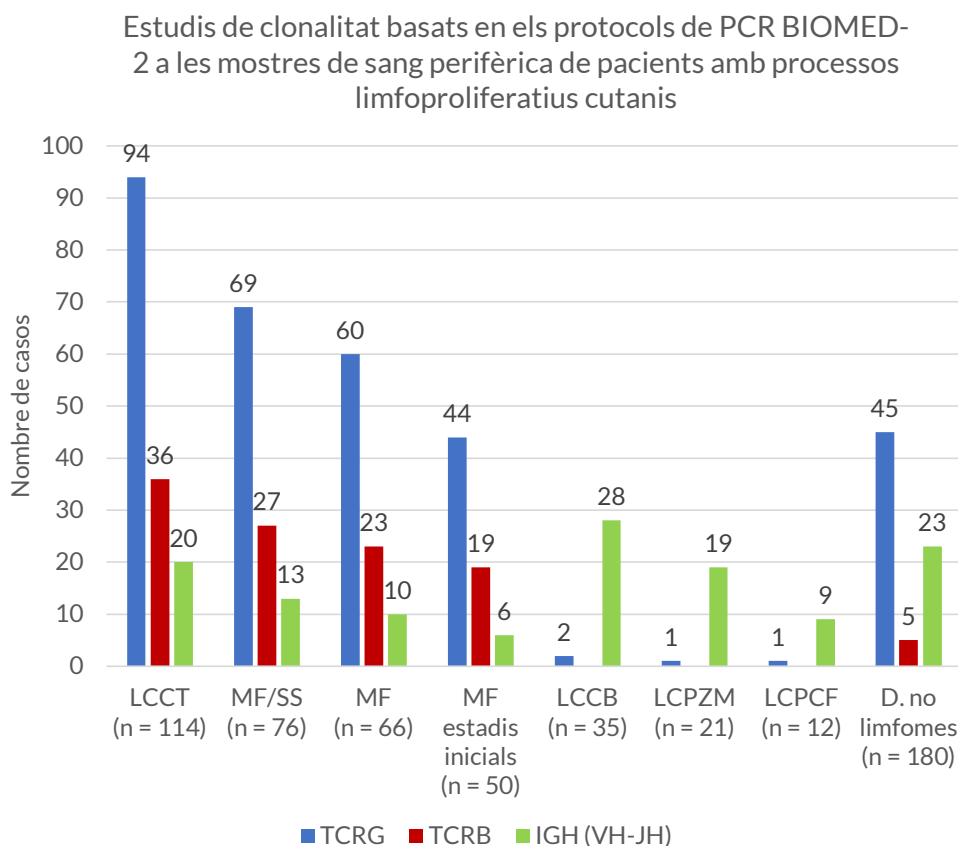
<u><i>V. dependent</i></u> RC	<i>Odds Ratio</i>	<i>Valor p</i>	<i>IC 95%</i>
<u><i>V. independent</i></u> clonalitat a la pell			
Policlonal	1		
Monoclonal	1.63	0.387	0.54 – 4.97

IC 95%, interval de confiança del 95%; Inf, infiltrats; LCCB, limfoma cutani de cèl·lules B; RC, resposta completa; RP, resposta parcial; V, variable.

## 5.5. Clonalitat a la sang perifèrica

Es van incloure els resultats de clonalitat T/B obtinguts de tres-centes setanta mostres de sang perifèrica extretes de cent noranta-set pacients participants de l'estudi. A la figura 17 es representa la distribució de les diferents proves de clonalitat del protocol EuroClonality / BIOMED-2 realitzades a les mostres de sang perifèrica segons el diagnòstic final de cada pacient.

Figura 17. Distribució de les proves de clonalitat del protocol BIOMED-2 realitzades a les mostres de sang perifèrica en funció del diagnòstic final

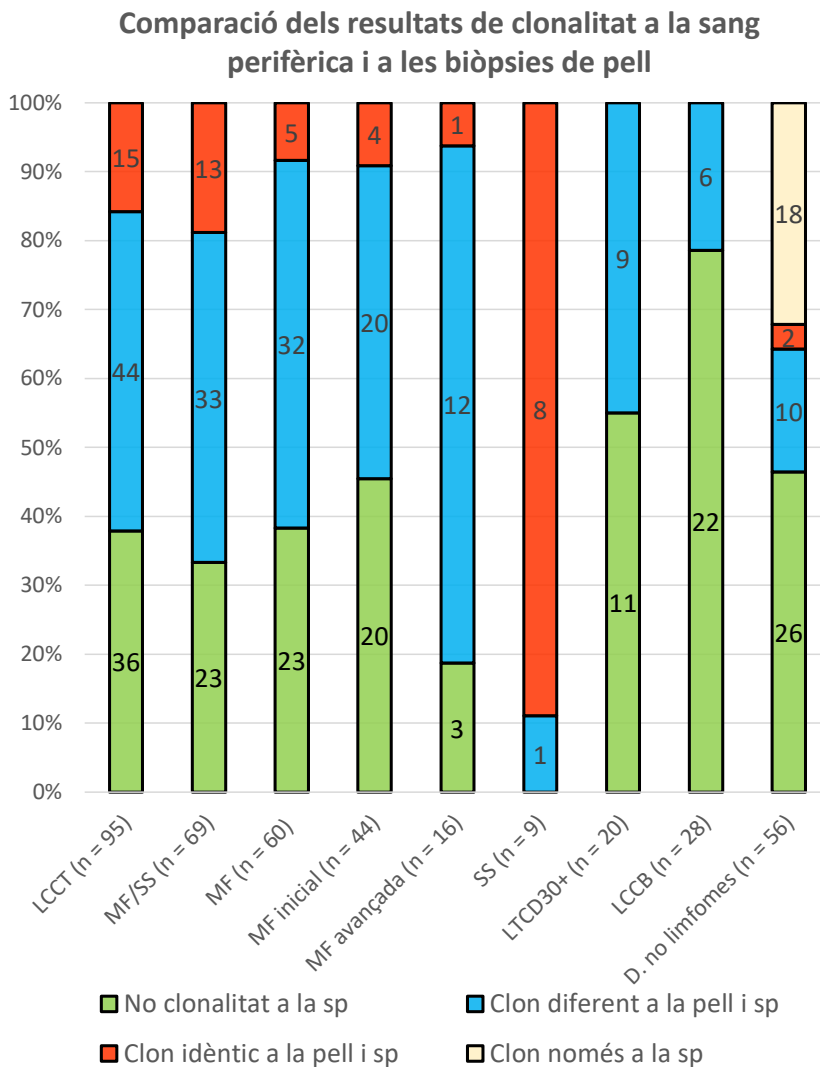


D, dermatosis; IGH (VH-JH), reordenaments complets del gen de la cadena pesada de les immunoglobulines; LCCB, limfoma cutani de cèl·lules B; LCCT, limfoma cutani de cèl·lules T; LCPCF, limfoma cutani primari centre fol·licular; LCPZM, limfoma cutani primari de la zona marginal; MF, micosi fungoide; SS, síndrome de Sézary; TCRB, cadena beta del receptor de la cèl·lula T; TCRG, cadena gamma del receptor de la cèl·lula T.

Es va detectar la presència d'algun pic clonal a la sang perifèrica de 59/95 (62.1%) dels casos diagnosticats de LCCT. No obstant, el clon identificat a la sang perifèrica només va ser idèntic al de la pell en 15/95 (15.8%) dels pacients. Els diagnòstics dels quinze casos amb clon a la sang perifèrica i a la pell coincident varen ser: vuit pacients amb síndrome de Sézary, una MF en estadi avançat (estadi IVA<sub>2</sub>), quatre MF en estadi inicial (estadis IA i IIA), un cas de limfoma cutani primari de cèl·lules T perifèriques, no especificat, i un limfoma de cèl·lules NK/T extranodal, tipus nasal. A més de la meitat (24/44, 54.5%) dels pacients diagnosticats de MF en estadi inicial (estadis IA-IIA) es va detectar clonalitat a la sang perifèrica, tot i així, a gairebé tots el clon de la sang perifèrica no coincidia amb l'identificat a les biòpsies de pell.

Per altra banda, es va obtenir un resultat monoclonal a la sang perifèrica d'una cinquena part dels casos estudiats i diagnosticats de LCCB (6/28, 21.4%). A més a més, a cap cas de LCCB es va detectar el mateix clon a la sang perifèrica i a les mostres de biòpsia cutània. A la figura 18 es representa gràficament la distribució dels resultats de clonalitat a la sang perifèrica, en comparació amb els resultats de les biòpsies de pell, agrupats per diagnòstics.

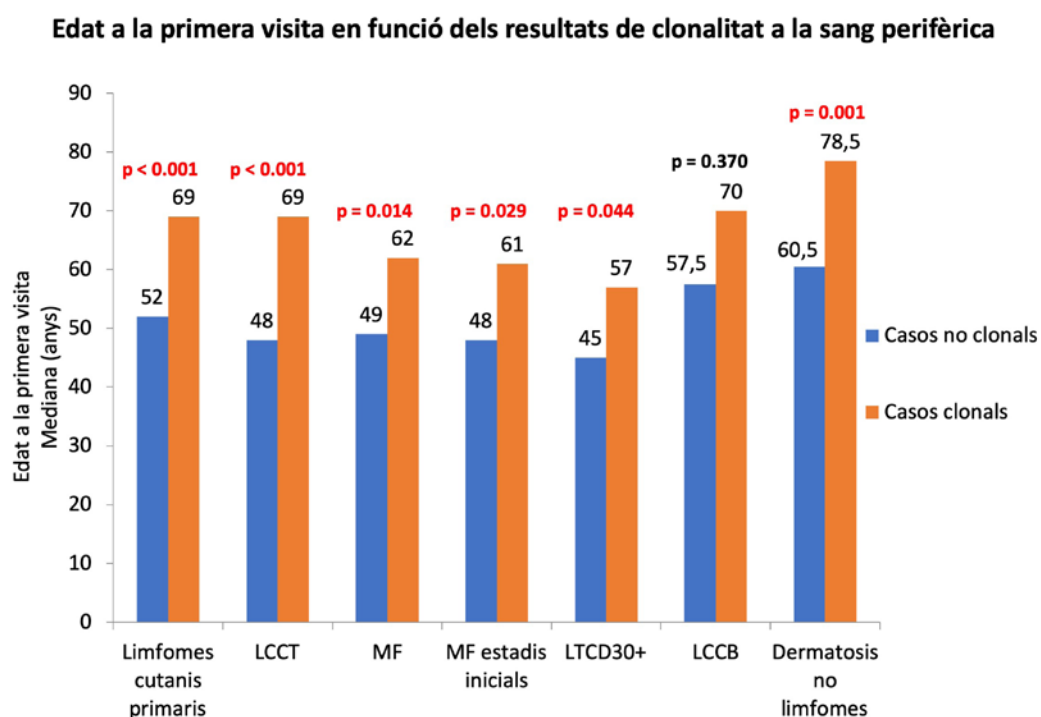
Figura 18. Resultats de clonalitat T/B a les mostres de sang perifèrica i comparació dels clons amb els identificats a les biòpsies cutànies



D, dermatosis; LCCB, limfoma cutani de cèl·lules B; LCCT, limfoma cutani de cèl·lules T; LTCD30+, trastorns limfoproliferatius de cèl·lules T CD30+ cutanis primaris; MF, micosi fungoide; sp, sang perifèrica; SS, síndrome de Sézary.

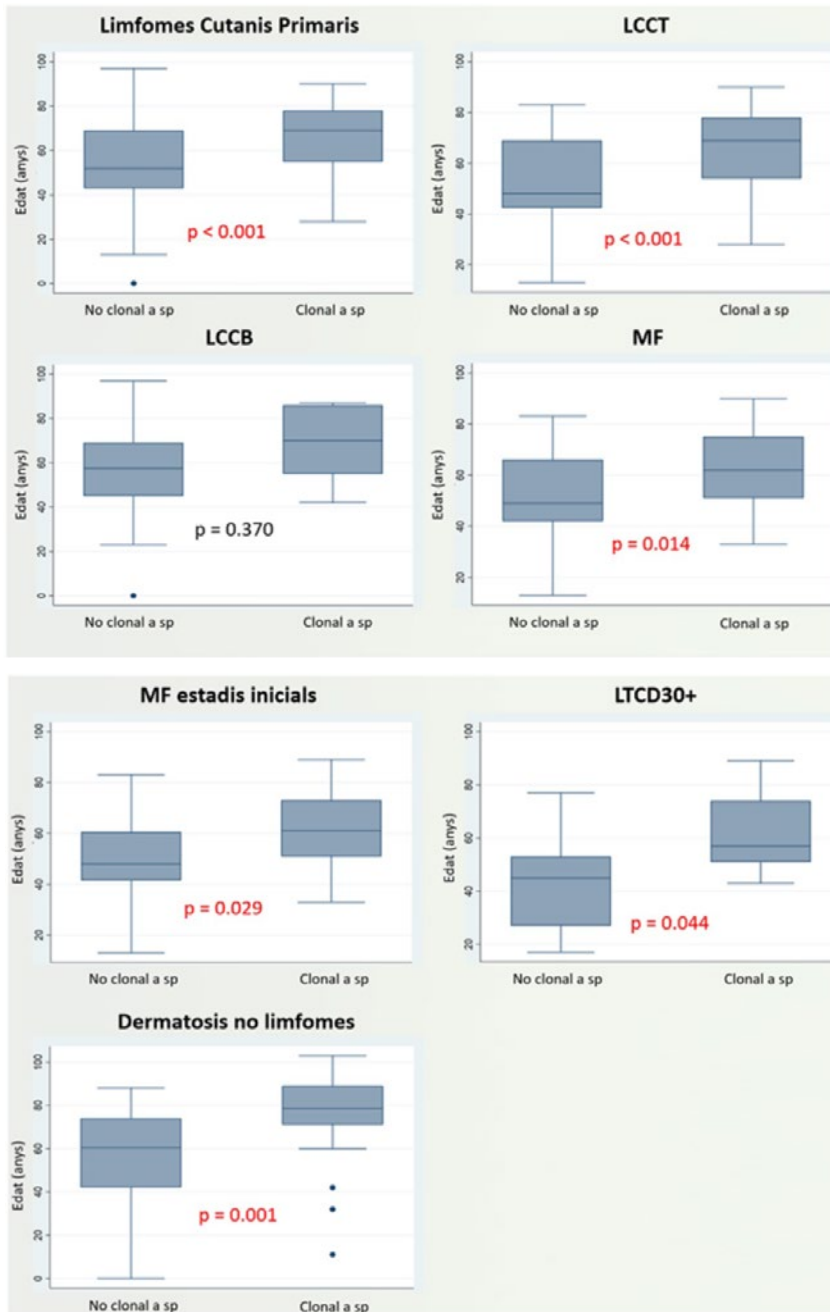
La mediana d'edat a la primera visita dels pacients en els que es va detectar un resultat clonal a la sang perifèrica va ser entre 12 i 21 anys superior a la dels pacients amb resultats policlonals a la sang perifèrica. Aquestes diferències en l'edat dels casos clonals i els casos no clonals a la sang perifèrica varen ser estadísticament significatives per tots els diagnòstics excepte als LCCB (figures 19 i 20). Concretament, els 12,5 anys de diferència a la mediana d'edat a la primera visita entre els sis casos clonals i els vint-i-dos casos no clonals no va assolir la significació estadística ( $p = 0.370$ ), probablement limitada pel baix nombre de casos clonals a la sang perifèrica dins d'aquest grup diagnòstic.

Figura 19. Representació gràfica de la mediana d'edat (anys) a la primera visita segons la presència o absència de clonalitat a la sang perifèrica



LCCB, limfoma cutani de cèl·lules B; LCCT, limfoma cutani de cèl·lules T; LTCD30+, trastorns limfoproliferatius de cèl·lules T CD30+ cutanis primaris; MF, micosi fungoide.

Figura 20. Representació en diagrames de caixes de l'edat a la primera visita segons la presència o absència de clonalitat a la sang perifèrica



LCCB, limfoma cutani de cèl·lules B; LCCT, limfoma cutani de cèl·lules T; LTCD30+, trastorns limfoproliferatius de cèl·lules T CD30+ cutanis primaris; MF, micosi fungoide; sp, sang perifèrica.

## 5.6. Valor pronòstic de l'anàlisi genotípica mitjançant PCR BIOMED-2 a les biòpsies cutànies i a les mostres de sang perifèrica de pacients amb limfomes cutanis primaris

### 5.6.1. Anàlisi de supervivència

La comparació de les corbes de supervivència estimades utilitzant el test de log-rank va posar de manifest diferències estadísticament significatives en les corbes de SEM i de SG dels pacients amb LCCT (figures 21 i suplementària 1) i MF/SS (figures 22 i suplementària 2).

Segons els resultats obtinguts a la detecció de clonalitat a la pell i a la sang perifèrica es van diferenciar 3 grups:

- Grup A: els pacients amb clon limfocitari exclusivament a la pell.
- Grup B: els casos amb els clons limfocitaris diferents als dos compartiments.
- Grup C: els pacients en els que s'havia detectat un clon de limfòcits T idèntic a la pell i a la sang perifèrica.

Aquells pacients inclosos en el grup C (clon de limfòcits T idèntic a la pell i a la sang perifèrica) mostraven una SEM i SG significativament menor en comparació amb els casos només clonals a la pell (grup A) o amb els clons limfocitaris diferents als dos compartiments (grup B).

En canvi, no es van trobar diferències estadísticament significatives en les corbes de SEM i de SG dels pacients diagnosticats de LCCB, de MF (figures 23 i suplementària 3) i de MF en estadi inicial (IA-IIA). De fet, la probabilitat de SEM a 10 anys en els pacients amb MF del grup B (91.8%) va ser superior a la dels del grup A (79.6%) (figura 23 i taula suplementària 7).

A les taules suplementàries 5 – 7 es resumeixen les dades principals en relació amb la SG i la SEM dels pacients amb LCCT, MF/SS i MF, respectivament.

Figura 21. Supervivència específica de la malaltia als pacients diagnosticats de limfoma cutani de cèl·lules T en funció dels resultats de clonalitat a la pell i a la sang perifèrica

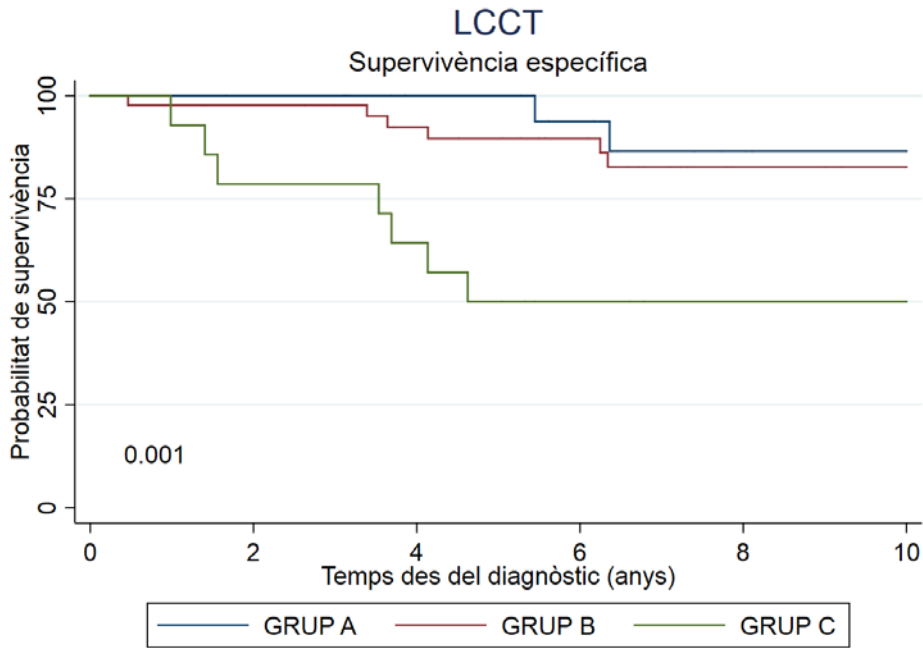


Figura 22. Supervivència específica de la malaltia als pacients diagnosticats de micosi fungoide / síndrome de Sézary en funció dels resultats de clonalitat a la pell i a la sang perifèrica

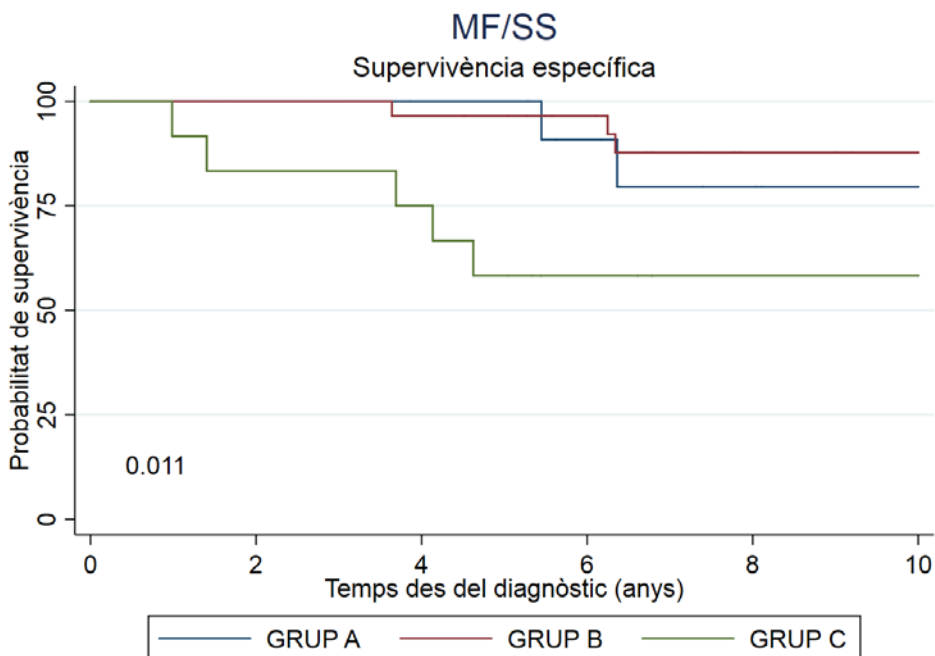
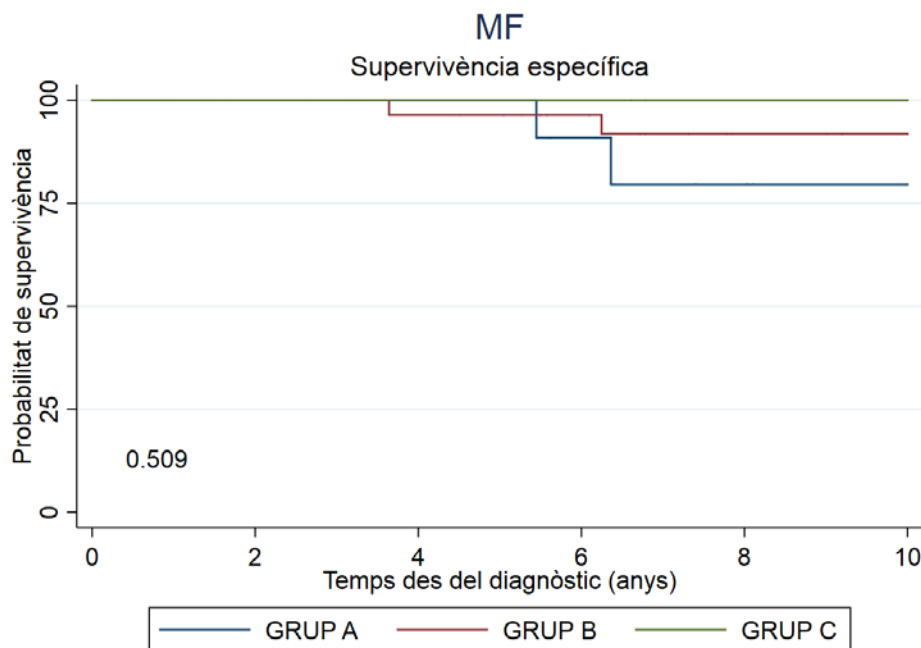




Figura 23. Supervivència específica de la malaltia als pacients diagnosticats de micosi fungoide segons els resultats de clonalitat a la pell i a la sang perifèrica



GRUP A, clon només a la pell; GRUP B, clon diferent a la sang perifèrica i a la pell; GRUP C, clon idèntic a la sang perifèrica i a la pell.

### 5.6.2. Anàlisi de la clonalitat a la pell i a la sang perifèrica com a factor pronòstic

Mitjançant el model de riscos proporcionals de Cox es va identificar la presència del mateix clon limfocitari a la pell i a la sang perifèrica (grup C dins de la variable clonalitat), l'edat al diagnòstic major de 60 anys i un estadi clínic al diagnòstic avançat (IIB-IVB) com a factors pronòstics adversos tant per a la SG com per a la SEM. Aquesta afirmació va ser vàlida a l'anàlisi univariable dels pacients amb un diagnòstic de limfoma cutani primari (taula suplementària 8 A) i LCCT (taula suplementària 8 B). En canvi, l'estatus de clonalitat a la pell i a la sang perifèrica no es va reconèixer com a factor de risc a l'anàlisi univariable dels pacients amb MF/SS (taula suplementària 8 C) i MF (taula suplementària 8 D), però tampoc, a cap de les anàlisis multivariables efectuades (taula 28). L'edat al diagnòstic superior als 60 anys i un estadi clínic al diagnòstic avançat (IIB-IVB) varen ser els únics factors que van demostrar una significació pronòstica estadísticament significativa a l'anàlisi multivariable dels pacients amb limfoma cutani primari, LCCT o MF/SS (taula 28 A).

Taula 28. Anàlisi multivariable de factors amb possible significació pronòstica per a la supervivència global i la supervivència específica de la malaltia

(A) Limfomes cutanis primaris, LCCT i MF/SS (N = 64)

Variable	ANÀLISI MULTIVARIABLE					
	SG			SEM		
	HR	IC 95%	Valor p	HR	IC 95%	Valor p
<b>Gènere</b>						
Masculí	1			1		
Femení	1.8	0.6 – 5.5	0.312	1.2	0.2 – 5.5	0.865
<b>Edat al diagnòstic, anys</b>						
≤ 60	1			1		
> 60	<b>49.6</b>	<b>7.8 – 314.6</b>	<b>0.000</b>	<b>10.3</b>	<b>1.2 – 86.5</b>	<b>0.032</b>
<b>Estadi clínic al diagnòstic</b>						
Inicial (IA-IIA)	1			1		
Avançat (IIB-IVB)	<b>11.4</b>	<b>3.0 – 43.2</b>	<b>0.000</b>	<b>15.5</b>	<b>3.4 – 70.5</b>	<b>0.000</b>
<b>Clonalitat</b>						
Grup A	1			1		
Grup B	0.5	0.1 – 1.8	0.262	0.3	0.0 – 2.7	0.300
Grup C	0.6	0.1 – 3.5	0.585	0.7	0.1 – 9.7	0.820

(B) Micosi fungoide (N = 55)

Variable	ANÀLISI MULTIVARIABLE					
	SG			SEM		
	HR	IC 95%	Valor p	HR	IC 95%	Valor p
<b>Gènere</b>						
Masculí	1					
Femení	1.8	0.4 – 7.6	0.432			
<b>Edat al diagnòstic, anys</b>						
≤ 60	1			1		
> 60	<b>29.8</b>	<b>3.4 – 259.7</b>	<b>0.002</b>	2.9	0.3 – 33.8	0.397
<b>Estadi clínic al diagnòstic</b>						
Inicial (IA-IIA)	1			1		
Avançat (IIB-IVB)	4.9	0.4 – 64.8	0.232	3.2	0.2 – 53.4	0.421
<b>Clonalitat</b>						
Grup A	1			1		
Grup B	0.5	0.1 – 2.1	0.345	0.5	0.1 – 4.6	0.573
Grup C	0.3	0.0 – 3.1	0.301			

Grup A, clon només a la pell; Grup B, clon diferent a la sang perifèrica i a la pell; Grup C, clon idèntic a la sang perifèrica i a la pell; HR, *hazard ratio*; IC 95%, interval de confiança del 95%; SEM, supervivència específica de la malaltia; SG, supervivència global.

Les dades en vermell presenten diferències estadísticament significatives ( $p < 0.05$ ).





DISCUSSIÓ



## DISCUSSIÓ

Els LCP constitueixen un grup de limfomes no Hodgkin que comparteixen un tropisme dels limfòcits T/B neoplàstics per la pell. D'acord amb la definició dels LCP, no hi ha evidència de malaltia extracutània en el moment del diagnòstic. És un grup heterogeni perquè existeixen diferències rellevants entre els seus integrants des del punt de vista clínic, histopatològic, immunofenotípic, molecular i pronòstic. Tanmateix, des de fa uns anys s'han reconegut diversos tipus de LCP amb unes característiques pròpies ben definides que han permès la seva inclusió com entitats diferents en els sistemes de classificació dels limfomes.(1,2,258)

El diagnòstic dels processos limfoproliferatius cutanis és una de les àrees més complexes dins de la dermatopatologia.(259) Davant una biòpsia cutània caracteritzada per infiltrats limfoides, més o menys atípics, el diagnòstic diferencial pot resultar molt ampli. Òbviament, s'inclouen els LCP, però també caldrà tenir en consideració l'opció d'una infiltració cutània per un limfoma nodal o sistèmic. A més a més, diverses dermatosis inflamatòries poden simular clínicament i histopatològicament diferents formes de LCP, donant lloc a l'extens grup dels pseudolinfomes o de les hiperplàsies limfoides cutànies reactives. Aquestes dificultats diagnòstiques s'accentuen encara més quan es tracta d'un LCP en estadi inicial, per exemple la MF, en el que el percentatge de les cèl·lules neoplàstiques pot ser baix i resultar emmascarat per un infiltrat reactiu acompanyant.(231,260,261) Per tot això, des de fa unes dècades s'han buscat eines que ajudin en el diagnòstic diferencial de les limfoproliferacions cutànies. Entre aquestes eines diagnòstiques trobem diferents tècniques de laboratori, com per exemple, les tincions immunohistoquímiques, d'hibridació in situ o les proves moleculars. Així i tot, a la majoria d'ocasions cap element per si sol és suficient per establir un diagnòstic definitiu i serà necessària una acurada integració de la informació clínica, histopatològica, immunofenotípica i molecular per arribar a una conclusió diagnòstica.(259)

Les tècniques de Biologia Molecular aplicades als LCP consisteixen en l'anàlisi de clonalitat basant-se en el principi que els limfomes són neoplàsies clonals, és a dir, que tots els limfòcits malignes deriven d'una sola cèl·lula limfoide transformada. A més a més, la recombinació entre els segments gènics V(D)J del TCR i de la IG confereix un marcador únic (empremta molecular) per a cada limfòcit T/B individual i

la seva descendència. En conseqüència, l'anàlisi d'aquests reordenaments a partir de l'extracció d'ADN d'una mostra biològica permet identificar expansions clonals d'un reordenament genètic del TCR/IG idèntic a favor d'una proliferació neoplàstica de limfòcits T/B.(241,260)

Els mètodes tradicionals basats en la PCR per avaluar la clonalitat a les mostres dels pacients amb LCP inclouen diferències metodològiques rellevants dificultant la comparació dels resultats en la detecció de clonalitat.

L'any 2003 es va publicar el protocol de PCR BIOMED-2 Concerted Action BMH4-CT98-3936 com a resultat del treball de col·laboració entre experts en l'anàlisi de clonalitat de diferents països europeus (Alemanya, Bèlgica, Espanya, França, Països Baixos, Portugal i Regne Unit). Aquest protocol ha aconseguit estandarditzar i uniformitzar el procediment analític de la PCR per detectar recombinacions clonals dels gens TCR/IG davant la sospita d'una limfoproliferació de qualsevol origen. El protocol BIOMED-2 estableix cinquanta-sis encebadors diferents repartits en sis tubs de PCR múltiplex per estudiar els reordenaments genètics del TCR i quaranta-un encebadors distribuïts en vuit tubs de PCR múltiplex per avaluar les recombinacions de IG (taula 8). Una de les forteses del protocol BIOMED-2 és que facilita la identificació de la gran majoria dels reordenaments entre els segments genètics V(D)J del TCR i de la IG, reduint la possibilitat de resultats falsos negatius. Per altra banda, el protocol BIOMED-2 recomana tècniques d'alta resolució per a l'anàlisi dels productes de PCR obtinguts com són: l'electroforesi capil·lar associada a l'anàlisi automatitzat de fragments fluorescents (GeneScan) i l'anàlisi d'heterodúplex.(211)

### **6.1. Valor diagnòstic i pronòstic de l'anàlisi genotípica del TCR mitjançant la PCR BIOMED-2 als limfomes cutanis de cèl·lules T**

Nombrosos treballs publicats han demostrat la utilitat de l'estudi dels reordenaments genètics del TCR per diferenciar els LCCT de les dermatosis inflammatòries o reactives. (14,229,234,238,239,262) La majoria d'aquests han utilitzat diferents protocols de PCR dirigits a amplificar els reordenaments VJ del TCRG i, només puntualment, s'han emprat encebadors específics pels segments V-D-J del TCRB. Bàsicament són dos motius els que justifiquen el clar predomini de les proves de PCR pel TCRG davant

de les del TCRB. En primer lloc, perquè la immensa majoria de cèl·lules neoplàstiques dels LCCT, malgrat expressar l'heterodímer  $\alpha/\beta$  del TCR, han reordenat com a mínim un dels dos al·lels del gen TCRG a un estadi inicial del desenvolupament dels limfòcits T.(211,263) En segon lloc, perquè el gen TCRG té una configuració més simple que el TCRB, amb un nombre limitat de segments gènics  $V_\gamma$  i  $J_\gamma$  homòlogament superiors que permeten detectar la majoria de recombinacions possibles amb pocs encebadors. (211,264,265) Per aquests motius, el TCRG ha estat la diana preferentment utilitzada a la majoria d'estudis d'anàlisi de clonalitat als LCCT.

Les freqüències de detecció de reordenaments monoclonals del TCRG als LCCT publicades utilitzant diferents tècniques de PCR oscil·len àmpliament entre el 43% i el 100% dels casos (taula suplementària 9). Tanmateix, la sensibilitat mitjana de la prova de PCR TCRG pel diagnòstic dels LCCT se situa al voltant del 75%, independentment que el protocol de PCR sigui BIOMED-2 o no. Aquesta xifra de sensibilitat és molt similar a l'obtinguda al present treball (74%). La mitjana de la sensibilitat de la prova de PCR pel TCRB és similar a la del TCRG, però, quan es combinen els dos tests diagnòstics i es considera un resultat positiu l'obtenció de monoclonalitat a almenys una de les dues proves, la sensibilitat ascendeix significativament a gairebé el 90% (taula 29). No obstant, cal tenir en compte que amb l'ús combinat de les dues proves (TCRG + TCRB) també es perd especificitat diagnòstica al incrementar la probabilitat d'identificar una dermatosi inflamatòria clonal i, per tant, un resultat fals positiu pel diagnòstic dels LCCT. Aquestes dades plantegen la importància de l'equilibri entre la sensibilitat i l'especificitat d'un test diagnòstic. A la nostra experiència amb biòpsies cutànies en parafina vàrem detectar mitjançant el protocol de PCR BIOMED-2 TCRG /TCRB un resultat clonal al 89.5% (102/114) dels casos diagnosticats amb els criteris clínics i patològics com a LCCT. Contràriament es va detectar un resultat monoclonal al 20% (36/180) de les dermatosis inflamatòries o reactives, entre les quals, hi havia hiperplàsies limfoides cutànies clonals (n = 7), parapsoriasis / dermatosis digitades (n = 4), eritrodèrmies clonals (n = 4) i pitiriasis liquenoides cròniques (n = 3).



**Taula 29. Resum dels valors mitjans de sensibilitat i especificitat de les proves de PCR pel TCRG i el TCRB al diagnòstic dels LCCT vs. dermatosis inflamatòries**

	PCR NO BIOMED-2 #			PCR BIOMED-2 §			PRESENT ESTUDI		
	TCRG	TCRB	TCRG / TCRB	TCRG	TCRB	TCRG / TCRB	TCRG	TCRB	TCRG / TCRB
S (%)	74.5			75.1	74	88.6	74	78.8	89.4
E (%)	94.1			94	90.3	86.8	87.7	89.2	81.5

E, especificitat; LCCT, limfomes cutanis de cèl·lules T; PCR, reacció en cadena de la polimerasa; S, sensibilitat; TCRB, cadena beta del receptor de la cèl·lula T; TCRG, cadena gamma del receptor de la cèl·lula T.

# Referències: Assaf *et al.* (266); Bachelez *et al.* (267); Bakels *et al.* (204); Beylot – Barry *et al.* (257); Cordel *et al.* (268); Costa *et al.* (269); Curcó *et al.* (270); De la Garza Bravo *et al.* (72); Delfau – Larue *et al.* (271); Dippel *et al.* (252); Fierro *et al.* (272); Goedel *et al.* (239); Greisser *et al.* (69); Guitart *et al.* (273); Kohler *et al.* (274); Lukowsky *et al.* (275); Mielke *et al.* (276); Muche *et al.* (277); Ponti *et al.* (14); Rea *et al.* (243); Theodorou *et al.* (203); Tok *et al.* (278) i Wood *et al.* (279).

§ Referències: De la Garza Bravo *et al.* (72); Garcia – Herrera *et al.* (114); Goedel *et al.* (239); Humme *et al.* (232,240); Kirsch *et al.* (16); Kong *et al.* (88); Lukowsky *et al.* (241); Moczko *et al.* (234); Morgan *et al.* (237); Rodríguez Pinilla *et al.* (116) i Sandberg *et al.* (235).

En relació amb el diagnòstic de la MF vs. les dermatosis inflamatòries benignes els tests de PCR BIOMED-2 pel TCRG, el TCRB i l'ús combinat (TCRG + TCRB) varen mostrar, al present estudi, una sensibilitat del 75%, el 80% i del 91.7%, respectivament. Uns valors de sensibilitat discretament per sobre de la mitjana de les xifres de sensibilitat publicades als diferents treballs, tal i com queda reflectit a la taula 30.

Taula 30. Resum dels valors mitjans de sensibilitat i especificitat de les proves de PCR pel TCRG i el TCRB al diagnòstic de la MF vs. dermatosis inflamatòries

	PCR NO BIOMED-2 #			PCR BIOMED-2 &			PRESENT ESTUDI		
	TCRG	TCRB	TCRG / TCRB	TCRG	TCRB	TCRG / TCRB	TCRG	TCRB	TCRG / TCRB
S (%)	72.5			71.2	72.7	89	75	80	91.7
E (%)	93.2			91.4	88.5	86.3	89.8	89	83.1

E, especificitat; MF, micosi fungoide; PCR, reacció en cadena de la polimerasa; S, sensibilitat; TCRB, cadena beta del receptor de la cèl·lula T; TCRG, cadena gamma del receptor de la cèl·lula T.

#Referències: Beylot – Barry *et al.* (257); Curcó *et al.* (270); Delfau – Larue *et al.* (271,280,281); Goeldel *et al.* (239); Liebmann *et al.* (282); Muche *et al.* (283); Ponti *et al.* (14,262); Rea *et al.* (243), Theodorou *et al.* (203); Vega *et al.* (284) i Yang *et al.* (231).

&Referències: Goeldel *et al.* (239); Lukowsky *et al.* (241); Mantaka *et al.* (233); Morgan *et al.* (237); Sandberg *et al.* (235); Sufficool *et al.* (242); Thurber *et al.* (238); Yang *et al.* (231) i Zhang *et al.* (229).

Per distingir la MF inicial de diverses dermatosis inflamatòries benignes l'estudi dels reordenaments gènics del TCRB es va mostrar superior al TCRG en termes de sensibilitat diagnòstica (78.3% vs. 69.6%) i amb una especificitat molt similar. A més a més, vàrem demostrar que l'addició de l'assaig de PCR pel TCRB a la prova del TCRG d'ús habitual implica un increment substancial de la sensibilitat diagnòstica de gairebé vint punts percentuals, tot i que, amb una certa pèrdua d'especificitat (taula 31). El locus TCRG no conté segments gènics D i demostra unes addicions de nucleòtids als punts de recombinació VJ relativament limitades. És per això que, malgrat aquest repertori més restringit del TCRG a la línia germinal facilita l'amplificació per PCR, la diversitat a la unió limitada dels reordenaments del TCRG pot complicar la distinció entre els productes de PCR clonals i policlonals.(211) En aquest sentit, l'estudi dels reordenaments gènics del TCRB aporta un valor afegit al detectar productes clonals que passarien inadvertits realitzant només el TCRG. Schachter *et al.* han publicat recentment la seva experiència amb el protocol de PCR BIOMED-2 emprant el TCRG i el TCRB per distingir la MF en estadi inicial de les dermatosis inflamatòries cròniques. Aquests autors han demostrat una sensibilitat del TCRB clarament superior a la del TCRG (83% vs. 43%,  $p = 0.002$ ). (261) Les nostres troballes i les publicades per alguns grups recolzen la realització de la PCR pel TCRB, preferentment en combinació amb el TCRG, quan existeixi una sospita d'una MF en estadi inicial.(229,232,237,261)

**Taula 31. Resum dels valors mitjans de sensibilitat i especificitat de les proves de PCR pel TCRG i el TCRB al diagnòstic de la MF en estadi inicial (IA-IIA) vs. dermatosis inflamatòries**

	PCR NO BIOMED-2 #			PCR BIOMED-2 &			PRESENT ESTUDI		
	TCRG	TCRB	TCRG / TCRB	TCRG	TCRB	TCRG / TCRB	TCRG	TCRB	TCRG / TCRB
S (%)	62.8			59.1	63.6	86	69.6	78.3	89.1
E (%)	88			92.2	91.8	89.5	91.8	90.9	85.5

E, especificitat; MF, micosi fungoide; PCR, reacció en cadena de la polimerasa; S, sensibilitat; TCRB, cadena beta del receptor de la cèl·lula T; TCRG, cadena gamma del receptor de la cèl·lula T.

# Referències: Alessi *et al.* (207); Beylot – Barry *et al.* (257); Cordel *et al.* (268); Costa *et al.* (285); Curcó *et al.* (270); Delfau – Larue *et al.* (271); Goeldel *et al.* (239); Klemke *et al.* (286), Liebmann *et al.* (282); Massone *et al.* (13); Ponti *et al.* (14) i Yang *et al.* (231).

& Referències: Goeldel *et al.* (239); Morgan *et al.* (237); Sandberg *et al.* (235); Schachter *et al.* (261); Yang *et al.* (231) i Zhang *et al.* (229).

Menció especial mereixen el grup de dermatosis cròniques, caracteritzades per màcules eritematoses i descamatives de mides variables, que tradicionalment s'han designat com a parapsoriasis. La relació entre aquestes i la MF ha estat motiu de debat des de fa anys. Per alguns experts, la variant històrica de parapsoriasis en plaques grans correspon, en realitat, a una MF en estadi inicial. Al present estudi vàrem incloure trenta-un pacients diagnosticats mitjançant la correlació clinicopatològica de parapsoriasis / dermatosi digitada. Cap dels casos complia els criteris clínics, histològics i immunopatològics suficients per establir el diagnòstic de MF en estadi inicial d'acord amb l'algoritme proposat per la ISCL (taula 6).(10) Des del punt de vista molecular vàrem detectar un resultat clonal en quatre casos (12.9%): tres dones i un home de 28 a 56 anys d'edat (mitjana = 39.8 anys i mediana = 37.5 anys) en els que no es va observar progressió a una MF durant el període de seguiment mitjà de 84.8 mesos (mediana = 78.5 mesos i rang = 5 – 177 mesos). De les quatre parapsoriasis / dermatosis digitades clonals, tres varen mostrar un resultat monoclonal amb el TCRG i una un patró clonal en context policlonal amb el TCRG i el TCRB. De fet, la freqüència de detecció de clonalitat a les biòpsies cutànies de la nostra sèrie de parapsoriasis / dermatosis digitades (4/31, 12.5%) és similar a la publicada a alguns treballs que han tractat aquesta qüestió (11.1% - 19.2%).(285,286) Hem observat diferències significatives en les freqüències de clonalitat del TCRG / TCRB a la pell entre els casos diagnosticats de MF en estadi inicial (45/50, 90%) i de parapsoriasis /

dermatosi digitada (4/31, 12.9%). Tanmateix, aquest diagnòstic diferencial no es pot resoldre només amb la informació de l'anàlisi genotípica, sinó que resulta imprescindible, integrar-la amb els criteris clínics, histopatològics i immunofenotípics per aplicar l'algoritme diagnòstic de la MF en estadi inicial.(10) Aquells casos que no assoleixen la puntuació mínima de quatre punts serien tributaris d'un seguiment a llarg termini davant el risc imprecís de progressió a una MF.

Per altra banda, vàrem incloure dinou pacients eritrodèrmics. Al final del seguiment, el diagnòstic va ser de dotze eritrodèrmies limfomatoses (onze SS i un limfoma cutani primari de cèl·lules T perifèriques, no especificat) i set eritrodèrmies idiopàtiques. L'anàlisi genotípica a les biòpsies de pell va posar de manifest un resultat monoclonal als dotze LCCT eritrodèrmics i a tres eritrodèrmies idiopàtiques. La clonalitat a les eritrodèrmies clonals idiopàtiques només es va evidenciar a alguna de les quinze biòpsies cutànies realitzades al llarg del control evolutiu d'aquests pacients. Des del punt de vista hematològic, les tres eritrodèrmies clonals idiopàtiques mostraven un reordenament clonal del TCRG a la sang perifèrica, no relacionat amb el reordenament identificat a la pell. A més a més, el recompte absolut i relatiu de cèl·lules de Sézary, així com, la ràtio CD4/CD8 i les subpoblacions limfoides CD4+CD7- i CD4+CD26- es van mantenir sempre per sota els criteris hematològics que defineixen la SS.(18,47) Contràriament, a les eritrodèrmies secundàries a un LCCT es va demostrar un clon idèntic a la pell i a la sang perifèrica a la gran majoria dels casos analitzats (9/11, 82%). Al final d'un període de seguiment mitjà de 58.3 mesos (mediana = 63 mesos i rang = 16 - 96 mesos) de les eritrodèrmies clonals idiopàtiques, dues estaven vives sense malaltia i una havia estat èxitus per una insuficiència cardíaca congestiva als vuitanta-cinc anys. Mereix especial atenció el cas d'un home seguit durant 122 mesos per una eritrodèrmia clonal acompanyada d'un clon de cèl·lules T relacionat a la sang perifèrica que al tancament d'aquest estudi va ser finalment diagnosticat de SS. Aquest és un exemple del que s'ha referit com a 'síndrome de pre-Sézary' a la bibliografia. (199,287) Els resultats del present treball recolzen la utilitat de dur a terme l'anàlisi genotípica a les biòpsies cutànies i a les mostres de sang perifèrica per completar l'estudi d'una eritrodèrmia. Especialment a les eritrodèrmies clonals interessa repetir els estudis de clonalitat a la pell i a la sang perifèrica, aproximadament cada sis mesos, per comparar els clons i descartar una progressió a SS o una altra forma de LCCT amb una presentació clínica eritrodèrmica.(288)

Al present estudi vàrem obtenir un resultat monoclonal a les biòpsies cutànies del 70% (19/27) dels pacients amb PL i a tots els quatre casos de LCACG. De les vuit PL no clonals, set corresponien al tipus histològic A i una al tipus B. Revisant la bibliografia sobre l'anàlisi genotípica del TCR a la PL s'observa una variabilitat significativa (freqüència de clonalitat = 22% - 100%).(72,240) Greisser *et al.* no varen detectar clonalitat a cap dels nou casos de PL tipus A estudiats i, només a la meitat (4/8) dels pacients amb PL tipus C. Aquests autors utilitzaren un protocol de PCR diferent del BIOMED-2 per investigar els reordenaments del TCRG a les biòpsies de pell en parafina.(69) En canvi, Humme *et al.* varen identificar una població de cèl·lules T monoclonal a les biòpsies de pell del 81% (17/21) dels pacients amb PL, incloses 14/18 (78%) de les PL tipus A.(240) Aquest estudi emprant la PCR pel TCRG segons el protocol BIOMED-2 va obtenir uns resultats molt més concordants amb els trobats al nostre treball. Així, doncs, el protocol BIOMED-2 es mostra sensible en l'anàlisi genotípica dels LTCD30+, fins i tot, a la PL tipus A (15/22, 68.2%) on les cèl·lules tumorals representen una minoria en un fons de cèl·lules inflamatòries reactives.

La presentació clínica característica de la PL, en forma de múltiples pàpules autoinvolutives i recurrents, juntament amb l'associació en un 10-20% dels casos a un altre limfoma maligne (MF, limfoma de Hodgkin o LACG) ha motivat la publicació d'alguns estudis sobre la clonalitat a diferents mostres amb la intenció de contribuir a aclarir la relació biològica entre aquests processos. Investigacions prèvies, entre les quals la de Chott *et al.*, varen demostrar un clon de cèl·lules T idèntic a les biòpsies de PL de localitzacions separades o obtingudes en moments diferents, fins i tot, en lesions recurrents anys més tard.(70) A més a més, diferents grups han identificat un patró monoclonal del TCR compartit entre les biòpsies de PL i de MF quan ocorren en un mateix individu.(70,72,289) Aquestes troballes publicades concordants amb els resultats del nostre estudi (clon T idèntic entre lesions de PL diferents = 11/12 (92%) i mateix clon a les biòpsies de PL i MF = 5/6 (83%)) suggereixen un origen comú d'aquestes dues entitats clinicopatològiques.(70,72,289) No s'han pogut dilucidar els mecanismes addicionals que determinarien que un clon de cèl·lules T aberrant desenvolupés una lesió de PL o de MF.(72)

L'any 2012 de Souza *et al.* varen descriure que la detecció d'un reordenament monoclonal del TCR podria ser un element d'ajuda per identificar els casos de PL amb una

major probabilitat de progressió a un segon limfoma. Concretament, aquests autors varen obtenir un resultat monoclonal del TCR en el 82% (9/11) dels pacients amb PL i un segon limfoma vs. el 44% (30/68) dels pacients amb només PL (OR = 5.7; IC 95% = 1.14 - 28.39 i  $p = 0.02$ ).<sup>(60)</sup> Al nostre estudi, l'observació d'un resultat monoclonal del TCR a les biòpsies de PL també va ser més freqüent al grup de PL associades a un altre limfoma maligne: 82% (9/11) vs. 62.5% (10/16), tanmateix, no es va assolir la significació estadística probablement per una mida mostral reduïda (OR = 2.7; IC 95% = 0.43 - 16.94 i  $p = 0.289$ ).

## **6.2. Valor diagnòstic i pronòstic de l'anàlisi genotípica de IGH i IGK utilitzant la PCR BIOMED-2 als limfomes cutanis de cèl·lules B**

Amb l'ús conjunt de la PCR múltiple per avaluar els reordenaments complets de IGH (VH-JH) al nostre estudi es va detectar un resultat clonal en un 88.6% dels LCCB, un 85.7% dels LCPZM i un 100% dels LCPCF amb un valor de sensibilitat superior al publicat per Lukowsky *et al.* (56%), Morales *et al.* (69%) i Felcht *et al.* (59%) i, molt similar al descrit per Fujiwara *et al.* (90%).<sup>(146,148,230,236)</sup> Probablement, diferències en la selecció dels casos i en el temps d'emmagatzematge de les mostres justifiquin, en certa mesura, aquestes discrepàncies. Investigacions prèvies sobre clonalitat de IGH utilitzant mètodes de PCR diferents en LCCB detectaven clonalitat entre un 27% i un 90% de les mostres estudiades (taula suplementària 10).<sup>(140,143,146,148,153,230,235,236,249,290-295)</sup>

A la nostra sèrie, i de forma similar a altres, la freqüència de detecció de clonalitat basada en l'anàlisi de VH FR1-JH és la que va aportar una proporció més elevada de casos clonals (67.7%), seguit per VH FR2-JH (55.9%) i VH FR3-JH (47.1%). Lukowsky *et al.*<sup>(236)</sup> i Felcht *et al.*<sup>(230)</sup> descriuen freqüències de resultats clonals molt elevades amb VH FR1-JH (90% i 100%, respectivament), malgrat que, en un nombre de mostres molt limitat (10/43 i 3/11) per la impossibilitat majoritària d'obtenir una amplificació de l'ADN de qualitat suficient.<sup>(230,236)</sup> Tot i aquesta tendència favorable de VH FR1-JH (67.7%), no hem trobat diferències estadísticament significatives en la sensibilitat per detectar clonalitat comparativament amb VH FR2-JH (54.8%) o VH FR3-JH (41.9%) (taula 27).

Els principals tipus de LCCB (LCPZM, LCPCF i LCPDCBG, TC) són neoplàsies de limfòcits B que han experimentat la reacció al centre germinal i, per tant, mostren freqüentment hipermutacions somàtiques als segments que codifiquen la regió variable de IGH.(296) Aquest fenomen podria, en alguns casos, implicar substitucions de nucleòtids a les FR que impedirien una correcta hibridació de l'encebador donant lloc a un fracàs de l'amplificació per PCR i un resultat falsament negatiu.(146,211,219,295) A la nostra experiència quatre casos (tres LCPZM i un LCPDCBG, TC) van resultar falsos negatius amb la PCR múltiple per IGH (VH-JH). L'addició dels estudis de reordenament d'IGK i dels reordenaments incomplets de IGH (DH-JH) va incrementar la sensibilitat de detecció clonal del 88.6% (31/35) al 100% (35/35). Globalment, amb els dos tubs de PCR per IGK es van detectar disset dels vint-i-quatre casos testats (sensibilitat = 70.8%), inclosos tres casos amb les PCR per IGH (VH-JH) policlonals. Per altra banda, l'avaluació dels reordenaments incomplets de IGH (DH-JH) ens va permetre diagnosticar com a clonals un 50% dels casos de LCCB analitzats incloent alguns casos negatius amb IGH (VH-JH). El valor afegit de l'anàlisi combinada dels reordenaments de IGH i de IGK ha estat descrit prèviament per Morales *et al.* i Fujiwara *et al.* al observar uns increments en la sensibilitat de detecció clonal del 69% (18/26) al 85% (22/26) i del 90% (18/20) al 95% (19/20), respectivament.(146,148) Addicionalment, l'any 2011 Felcht i col·laboradors varen publicar un estudi sobre el valor del diagnòstic molecular als LCCB en el que varen comprovar un augment de la sensibilitat diagnòstica del 59% (10/17) amb IGH de forma aïllada, al 94% (16/17) quan es combinava amb IGH (DH-JH) i IGK.(230) Totes aquestes observacions, concordants amb les del present treball, es poden justificar perquè IGK i IGH (DH-JH) són dianes complementàries en l'estratègia d'estudi de la clonalitat a les neoplàsies de cèl·lules B, en veure's menys afectades per les hipermutacions somàtiques.(146,211,219,230)

El diagnòstic diferencial dels LCCB de curs indolent (LCPZM i LCPCF) i les hiperplàsies limfoides cutànies (HLC) reactives pot ser molt difícil. Alguns autors han suggerit que formen part d'un espectre continu de trastorns limfoproliferatius cutanis de cèl·lules B. A l'extrem maligne d'aquest espectre trobem els LCCB i al pol benigne les HLC. La presentació clínica i les troballes histopatològiques poden ser pràcticament indistingibles, motiu pel qual, s'ha estudiat el valor de l'anàlisi genotípica dels reordenaments de IGH i, puntualment de IGK, per distingir aquestes entitats de diagnòstic problemàtic. (136,146,249,291) Aquelles HLC en les que s'identifica una població de cèl·lules B

monoclonal, s'han designat com a HLC clonals, i podrien correspondre amb entitats intermèdies dins l'espectre.(248) Casos aïllats han demostrat la presència d'un reordenament gènic de IGH idèntic a les biòpsies de les HLC clonals que han progressat, al llarg dels anys, a un LCCB.(297) Aquests casos reforcen l'argument que algunes HLC són, en realitat, LCCB de curs indolent en un estadi inicial.(136,248,292)

Al present estudi vàrem detectar un resultat monoclonal en el 100% (35/35) dels casos diagnosticats com LCCB i en el 40.5% dels casos diagnosticats com infiltrats limfoides B/T cutanis benignes i que incloïen setze HLC. El *gold standard* per establir el diagnòstic es va basar en els criteris clínics, histopatològics, immunofenotípics i la informació aportada a través del seguiment evolutiu dels pacients. L'addició dels tests per IGK i/o IGH (DH-JH) a l'estudi dels reordenaments complets de IGH (VH-JH) permet incrementar la sensibilitat en la identificació de clonalitat entre els casos de LCCB, tanmateix, també augmenta la detecció de clonalitat entre els infiltrats limfoides cutanis benignes donant lloc a una pèrdua de l'especificitat del conjunt de tests diagnòstics. La correcta distinció entre un LCCB de curs indolent i una HLC pot ser rellevant, però, encara resulta més transcendental descartar una infiltració cutània secundària per un limfoma nodal o sistèmic.

En el present treball no hem pogut demostrar que la identificació d'un resultat monoclonal a la biòpsia de pell sigui un factor predictor de l'evolució clínica que presentarà el pacient. Concretament, l'obtenció de monoclonalitat a una biòpsia cutània caracteritzada per un infiltrat majoritàriament de cèl·lules B no s'associa amb un risc més o menys elevat d'assolir una resposta completa als tractaments (*odds ratio* = 1.63 (0.54 - 4.97) i  $p = 0.387$ ) (figura 16). Tanmateix, cal tenir en compte que dels setanta-set casos de processos limfoproliferatius B cutanis inclosos per realitzar aquesta regressió logística, seixanta (78%) presenten una resposta completa al final del període de seguiment. Només s'observa una recidiva i progressió de la malaltia en un nombre limitat de casos.

En relació amb una possible associació entre la clonalitat a la pell i la resposta als tractaments, l'any 2013 Servitje i col·laboradors van publicar un estudi realitzat amb 137 pacients diagnosticats de LCPZM, un 54% (29/54) dels quals amb un reordenament monoclonal de IGH a la biòpsia cutània. En aquest treball, els autors no troben



diferències estadísticament significatives ( $p = 0.7$ ) en la taxa de recidives ni en la supervivència lliure de malaltia entre els casos clonals i els no clonals.(135)

Per últim, citar que ocasionalment en pacients diagnosticats de LCPZM es pot identificar un reordenament monoclonal del TCRG, sense que això impliqui una potencial aparició d'un LCCT. Es reconeix la possibilitat d'obtenir un reordenament gènic del TCR en neoplàsies limfoides B i viceversa.(211) Per investigar si aquests reordenaments clonals del TCRG corresponen a l'infiltrat T reactiu acompanyant que pot ser prominent o, més rarament, a les pròpies cèl·lules B neoplàstiques al presentar un reordenament clonal dual (IG i TCR) caldria dur a terme tècniques més sofisticades com la microdissecció per captura làser.(298)

### **6.3. Comparació dels clons identificats a les biòpsies cutànies múltiples (seqüencials o síncrones): patró molecular homogeni vs. patró molecular heterogeni**

A aquest treball vàrem tenir l'oportunitat d'estudiar una sèrie àmplia de pacients amb un diagnòstic de LCCT a qui se'ls havia realitzat més d'una biòpsia cutània, majoritàriament de forma seqüencial al llarg de l'evolució de la malaltia. A la gran majoria d'aquests pacients es va observar el mateix clon de limfòcits T a totes les biòpsies de pell analitzades mitjançant el protocol de PCR BIOMED-2. Aquests individus que mostren estabilitat clonal al llarg del temps corresponen a un patró molecular homogeni. En canvi, a un grup reduït de pacients amb LCCT (14.3%) es varen objectivar clons limfocitaris T diferents entre les múltiples biòpsies realitzades a un mateix subjecte. El patró molecular heterogeni es va evidenciar sobretot a partir de l'anàlisi dels reordenaments del TCRG. Al final del període de seguiment la resposta global d'aquests casos amb un patró molecular heterogeni va ser tant d'una malaltia estable, com d'una resposta completa o progressió de la malaltia.

Diversos estudis han investigat les implicacions diagnòstiques i pronòstiques que proporciona la comparació clonal de cèl·lules T a les biòpsies cutànies de LCCT obtingudes simultàniament de diferents localitzacions i/o seqüencialment. Thurber *et al.* varen publicar la seva experiència en l'ús de la PCR BIOMED-2 / GeneScan per estudiar els reordenaments del TCRG a dues biòpsies en parafina de llocs diferents

per cada pacient. Els autors varen descriure que la detecció de clons idèntics a diferents localitzacions anatòmiques (PCR – TCRG dual) mostrava una sensibilitat alta del 82.6% (19/23) i una especificitat molt elevada del 95.7% (22/23) per distingir la MF de les dermatosis inflamatòries.(238) Els nostres resultats són bastant concordants amb aquestes troballes: sensibilitat del 78.4% (29/37) i especificitat del 91.7% (11/12). Tot i així, nosaltres vàrem comparar els clons TCRG / TCRB entre biòpsies cutànies síncrones de llocs diferents però també seqüencials de pacients amb MF i dermatosis no limfomes. Aquestes observacions suggereixen que l'estratègia de realitzar múltiples biòpsies de pell per detectar clons de limfòcits T idèntics incrementaria l'especificitat sense comprometre la sensibilitat en el diagnòstic diferencial de la MF vs. dermatosis inflamatòries.(238)

Des de l'any 1990 varis articles han estudiat l'ocurrència de reordenaments gènics del TCR diferents (heterogeneïtat clonal) a biòpsies cutànies múltiples de LCCT. (232,233,238,262,272,284,299) Els resultats d'aquests treballs en la detecció de clons de cèl·lules T addicionals ha estat molt variable (0-80% dels pacients). Aquestes investigacions alimenten el debat sobre l'origen dels LCCT i, particularment la MF, suggerint que la població de cèl·lules tumorals sovint està formada per múltiples clons que mostren una progressió multilínia.(300) D'acord amb aquesta teoria l'evolució de les cèl·lules neoplàstiques segueix els mateixos principis que l'evolució de les espècies controlada per les mutacions i la selecció.(300,301) Així, doncs, s'accepta la possibilitat d'identificar múltiples clons de cèl·lules T, cadascun amb un reordenament gènic del TCR diferent, als pacients amb LCCT, MF i SS. Tanmateix, aquestes publicacions són difícils de comparar per diversos motius. En primer lloc, perquè la definició d'heterogeneïtat clonal no sempre és la mateixa i, en segon lloc, perquè s'han utilitzat protocols diferents per analitzar els reordenaments clonals bàsicament del TCRG.(232)

Vega *et al.* varen identificar heterogeneïtat clonal a aproximadament el 30% (5/18) dels pacients amb MF en el transcurs de la malaltia. Addicionalment, els investigadors varen trobar clons no persistents, amb reordenaments gènics diferents, en un 9% dels casos (2/22). Els autors d'aquest treball també analitzaren disset malalts diagnòsticats de MF amb múltiples biòpsies cutànies síncrones de localitzacions diferents. En aquest grup de pacients, observaren una associació estadísticament significativa

entre la detecció al diagnòstic d'un reordenament gènic del TCRG idèntic (homogeneïtat clonal) a les múltiples biòpsies de pell síncrones i la probabilitat de progressió clínica de la malaltia, independentment de l'estadi clínic.(284)

Al present estudi a una sèrie relativament àmplia de pacients amb MF amb múltiples biòpsies cutànies seqüencials o síncrones, una cinquena part varen presentar progressió o recidiva de la malaltia durant el període de seguiment. D'aquests casos amb MF progressiva, un 90% van mostrar el mateix clon (homogeneïtat clonal) a les biòpsies de pell múltiples (taula suplementària 11). No obstant, aquestes diferències no van ser estadísticament significatives ( $p = 0.656$ ), a diferència, dels resultats publicats per Vega i col·laboradors.(284) Abans d'establir unes conclusions definitives en relació amb el punt anterior, seria convenient realitzar estudis amb una mida mostral més gran.

Diversos mecanismes podrien explicar l'heterogeneïtat clonal a la MF i, per extensió, als LCCT. S'ha proposat que les lesions inicials emergeixen d'una activació oligoclonal de cèl·lules T, en la que certs superantígens com algunes proteïnes bacterianes, podrien exercir-hi un paper.(302) A més a més, una barreja de clons tumorals i de cèl·lules reactives també podria justificar, parcialment, l'heterogeneïtat clonal a les lesions cutànies de MF inicial. La selecció clonal sota la influència de determinats tractaments i la progressió en la transformació oncogènica també podrien explicar, d'alguna manera, la presència de múltiples clons de cèl·lules T.(262,284)

Menció especial mereix la identificació de clons de cèl·lules T diferents a la meitat dels casos de MFF en els que s'havia dut a terme l'anàlisi genotípica del TCR a més d'una biòpsia cutània. Mantaka *et al.* varen publicar la seva experiència amb vint-i-dues biòpsies en parafina o congelat de vuit pacients amb MFF, cinc (62.5%) dels quals varen presentar clons de limfòcits T múltiples al llarg del curs de la malaltia. Amb aquestes troballes els autors suggereixen que l'estimulació crònica de les cèl·lules T contribueix al desenvolupament de la MFF. Tot i així, es requereixen estudis amb un major nombre de pacients per demostrar si la detecció de múltiples clons T diferents és més freqüent a la MFF que a la MF convencional i, si aquests clons múltiples tenen un impacte pronòstic.(233)

Per altra banda, vàrem estudiar un grup de pacients diagnosticats d'un LCCB dels quals es disposava de resultats de l'anàlisi genotípica a més d'una biòpsia cutània. En un 88.2% dels casos es va demostrar un patró molecular homogeni a totes les mostres de pell obtingudes d'un mateix pacient. Contràriament, es va identificar un patró molecular heterogeni a les biòpsies cutànies seqüencials de dos pacients (11.8%) diagnosticats de LCPCF. Ambdós pacients havien assolit una resposta completa i es trobaven vius sense malaltia al cap de 108 i 69 mesos de seguiment.

Existeixen escasses publicacions en les que s'hagi tractat la comparació dels clons a les biòpsies cutànies de LCCB. Cerroni *et al.* varen detectar bandes de la mateixa longitud en fol·licles diferents d'una mateixa mostra obtinguts mitjançant microdissecció de raig làser en sis de dotze pacients amb LCPCF amb un patró histològic fol·licular. (153) Fujiwara i col·laboradors varen demostrar la presència de clons de cèl·lules B idèntics en el 55% (11/20) dels pacients amb LCCB i en el 0% (0/12) dels infiltrats limfoides benignes estudiats. En canvi, aquests autors varen identificar quatre casos (tres LCPCF i un LCPZM) amb clons diferents entre les biòpsies de pell obtingudes de localitzacions anatòmiques diferents. És destacable que en aquest treball realitzat amb, com a mínim, dues biòpsies cutànies en parafina per cada pacient (dotze amb LCPZM i vuit amb LCPCF) utilitzant el protocol de PCR BIOMED-2 per IGH i IGK detecten més freqüentment heterogeneïtat clonal als LCPCF (3/8, 38%) que als LCPZM (1/12, 8%).(148) Aquests resultats van en la mateixa línia que les nostres troballes: LCPCF (2/7, 28.6%) i LCPZM (0/10, 0%). Tot i que aquestes diferències poden estar relacionades amb una mida de la mostra petita, és intrigant la possibilitat que també estiguin relacionades amb diferències biològiques com ara una capacitat intrínseca per desenvolupar una segona malaltia primària. Els autors conclouen que la presència de clons idèntics és altament suggestiva d'un limfoma. Tanmateix, les seves troballes suggereixen que un subgrup de LCCB a localitzacions diferents, especialment LCPCF, pugui representar tumors primaris diferents en lloc d'una sola malaltia disseminada. No obstant, aquests resultats haurien de ser confirmats en estudis amb un nombre de casos més gran.(148)

#### 6.4. Valor diagnòstic i pronòstic de l'anàlisi genotípica a les mostres de sang perifèrica

Al present estudi es va obtenir un resultat monoclonal a la sang perifèrica en el 52.8% dels casos de LCP estudiats. Tanmateix, la comparació dels clons identificats a la sang perifèrica i a les biòpsies cutànies corresponents, mitjançant la caracterització de la longitud dels fragments clonals a partir de l'anàlisi de fragments fluorescents, tan sols va demostrar un clon idèntic als dos compartiments en un 12.2% dels casos. Així, doncs, el clon detectat a la sang perifèrica, principalment a través del test de PCR TCRG, no estava relacionat amb el de la pell a la immensa majoria dels casos.

Els casos amb un clon idèntic a la sang perifèrica i a la pell varen ser pacients diagnosticats de LCCT, majoritàriament SS i, ocasionalment MF. Al final d'un període de seguiment mitjà llarg s'havien produït set defuncions pel limfoma, tres morts per una altra causa (carcinoma urotelial o insuficiència respiratòria) i, hi havia cinc persones vives amb la malaltia.

A l'anàlisi genotípica de les mostres de sang perifèrica dels pacients diagnosticats d'un LCCB es va trobar un patró monoclonal en el 21.4% dels casos. A tots els sis casos, el clon identificat a la sang perifèrica va ser diferent del de les mostres de pell. De fet, tots els pacients que mostraven un reordenament de IGH idèntic a la pell i a la sang perifèrica estaven afectats per una neoplàsia limfoide B sistèmica.

L'interès per conèixer el valor diagnòstic i la possible significació pronòstica dels resultats de clonalitat a la sang perifèrica dels pacients amb LCCT ha motivat la publicació de diversos estudis.(203,240,271,277,283,303-306) La SS és el prototip de LCCT amb una expressió hemoperifèrica clara, constituint un criteri imprescindible pel seu diagnòstic.(1,18) Tanmateix, existeixen resultats contradictoris sobre l'estadi de la resta de LCCT en el qual té lloc la disseminació de les cèl·lules clonals a la sang perifèrica. Veelken *et al.* varen descriure l'any 1995 dos pacients amb MF estadi I amb cèl·lules T clonals circulants utilitzant un mètode sensible de PCR i protecció a les RNases. (307) Al llarg dels successius anys, diversos autors varen publicar unes freqüències de detecció de clonalitat sanguínia als estadis inicials (IA-IIA) de la MF que oscil·laven entre el 4.3% i el 52.5%.(257,277,305,306) Concretament, alguns d'aquests treballs

demostraven clons a la sang perifèrica relacionats amb els de la pell en un rang del 9.1% al 38.9% dels casos de MF en estadi inicial.(257,271,277) La distribució sovint multifocal de les lesions cutànies de MF, fins i tot als estadis inicials de la malaltia, juntament amb la recirculació fisiològica de les cèl·lules T amb tropisme cutani recolzaria, segons alguns investigadors, la hipòtesi d'una disseminació hematògena precoç a la MF. Tot això, sumat a l'aparició de cada vegada tècniques moleculars més sensibles justificaria la detecció freqüent de clonalitat a la sang perifèrica dels pacients amb MF, fins i tot, durant els estadis inicials en els que la càrrega tumoral és massa petita per ser detectada a través de l'estudi citomorfològic o de la citometria de flux.(277,283,306)

Amb la nostra experiència, només un nombre reduït de pacients (4/44, 9.1%) amb MF en estadi inicial (IA-IIA) mostra un clon idèntic a la sang perifèrica i a la pell. Aquesta és una freqüència inferior a la descrita per Beylot-Barry *et al.* del 15% (7/47), en canvi, idèntica a la publicada per Delfau-Larue *et al.* del 9.1% (6/66) i clarament inferior a la del grup del Muche i col·laboradors (14/36, 38.9%).(257,271,277) Per altra banda, si ens fixem en el global de pacients diagnosticats de MF vàrem observar un clon de limfòcits T a alguna mostra de sang perifèrica relacionat amb el de la pell en un 8.3% dels casos analitzats. Un resultat lleugerament inferior respecte a l'estudi amb un nombre de pacients més gran, el de Delfau-Larue *et al.* amb un 12.5% (11/88) de casos clonals idèntics a ambdós teixits.(271) Contràriament, altres treballs han presentat unes xifres de clonalitat a la sang perifèrica idèntica a la cutània més elevada (25.4% - 42.5%).(257,277,283) Una de les raons principals d'aquestes diferències podria ser els aspectes tècnics, tenint en compte la diversitat d'encebadors utilitzats per amplificar els segments gènics del TCRG, així com, l'heterogeneïtat en els mètodes per avaluar la identitat dels reordenaments clonals (electroforesi en gel amb gradient desnaturalitzant o de temperatura o electroforesi capil·lar combinada amb l'anàlisi de fragments fluorescents).(283)

Al present estudi, la majoria de clons T identificats a les mostres de sang perifèrica eren diferents als clons de les biòpsies cutànies dels pacients amb MF. Aquestes poblacions de limfòcits T clonals circulants no relacionades amb les de la pell han estat identificades per múltiples autors.(257,271,277,283) Alguns d'ells han suggerit el terme '*expansió de cèl·lules T de significació indeterminada*' per descriure aquest fenomen.(283) Aquestes poblacions clonals s'han observat més freqüentment en individus

majors de seixanta anys, d'acord amb la detecció de cèl·lules T monoclonals a la sang perifèrica de subjectes sans per sobre els seixanta-cinc anys d'edat.(308,309) En concordança amb aquestes observacions, la mediana d'edat dels participants del present estudi amb clons de cèl·lules T dominants a la sang perifèrica va ser significativament superior a la dels pacients diagnosticats de LCP, LCCT, MF i MF en estadis inicials sense clon sanguini (figures 19 i 20). En alguns casos, especialment als LCCT en estadis inicials, aquests clons de cèl·lules T a la sang perifèrica no relacionats amb els de la pell podrien correspondre amb una població clonal de cèl·lules CD8+ i CD4+ activades amb una acció anti-tumoral.(257,310)

El valor pronòstic de la identificació d'un clon de cèl·lules T idèntic a la pell i a la sang perifèrica ha estat estudiat per alguns autors.(17,257,306) Fraser-Andrews *et al.* varen demostrar que la presència d'un clon de cèl·lules T a la sang perifèrica era una variable pronòstica independent a la MF en termes de supervivència als deu anys (50% als casos sense clon vs. 30% als casos clonals).(306) Beylot-Barry *et al.* també varen identificar la detecció del mateix clon a la sang perifèrica i a la pell com un factor pronòstic independent de progressió de la MF/SS.(257) Agar *et al.* varen descriure una pitjor supervivència global i específica de la malaltia als pacients amb MF/SS que mostraven un clon T idèntic a ambdós teixits sense evidència morfològica d'afectació sanguínia (B0b) respecte als pacients sense clon a la sang perifèrica (B0a).(17)

Al present estudi vàrem demostrar que la presència d'un clon de cèl·lules T idèntic a la pell i a la sang perifèrica s'associava amb una reducció estadísticament significativa de la supervivència global i específica de la malaltia als cinc i deu anys del diagnòstic del LCP, el LCCT o la MF/SS. En canvi, aquestes diferències no es van observar en les corbes de supervivència dels pacients amb MF de qualsevol estadi. Així mateix, l'anàlisi univariable va posar de manifest la troballa d'un clon idèntic a ambdós teixits com un factor de risc per a la mortalitat global i específica de la malaltia amb unes HR entre 4.8 i 13.4 respecte als casos només clonals a la pell. No obstant, l'anàlisi multivariable ajustada pel gènere, l'edat i l'estadi clínic al diagnòstic no va mostrar que la presència d'un clon idèntic fos un factor de risc independent de mortalitat. Cal tenir molt en compte, a l'hora d'interpretar aquests resultats, que a la nostra cohort de pacients amb un clon idèntic a la sang perifèrica i a la pell, el 53.3% estaven afectats per una SS. Una variant leucemitzada de LCCT amb un curs clínic agressiu i una mediana de

supervivència de quatre anys.(42) Dels vuit pacients amb SS amb un clon idèntic a la sang perifèrica i a la pell, cinc varen ser èxits per progressió del limfoma al llarg d'un període de seguiment mitjà de 43.6 mesos (mediana = 44 mesos i rang = 11 - 90 mesos). Així, doncs, el predomini de pacients amb SS i les característiques pròpies de la neoplàsia impacten decididament en l'obtenció d'aquests resultats estadístics sobre la significació pronòstica.

Al nostre estudi no sembla que la detecció d'un clon de cèl·lules T diferent a la sang perifèrica i a la pell sigui un factor de pronòstic advers, en relació amb la mortalitat global i específica de la malaltia, als pacients amb LCP, LCCT, MF/SS i MF. De fet, aquells pacients amb MF en els que es demostra aquests clons T diferents, fins i tot, tindrien una supervivència específica de la malaltia als deu anys del diagnòstic més favorable en comparació amb els casos únicament clonals a la pell (91.8% vs. 79.6%). Una possible explicació davant aquesta observació, seria la presència de poblacions limfoides clonals a la sang perifèrica d'alguns pacients que exercirien una acció immunològica enfront de les cèl·lules tumorals afavorint un major control de la neoplàsia. No obstant, no vàrem identificar diferències en les ràtios CD4/CD8 a la sang perifèrica entre els casos de MF amb clon no relacionat i els casos no clonals (mitjana = 2.2, mediana = 2 i rang = 0.2 - 5.9).

L'anàlisi d'una sèrie de mostres de sang perifèrica obtingudes de pacients diagnosticats de diverses dermatosis no limfomes va evidenciar un 53.6% (30/56) dels casos amb alguna mostra de sang perifèrica clonal. La immensa majoria eren clons només identificats a la sang perifèrica (32.1%) o no relacionats amb els de la pell (17.9%). A més a més, la mediana d'edat dels pacients amb clons a la sang perifèrica era significativament superior a la dels casos no clonals (78.5 vs. 60.5 anys,  $p = 0.001$ ). Només a dos pacients de cinquanta-sis es va identificar un clon idèntic a ambdós compartiments, un dels quals un home de seixanta-quatre anys a la primera visita que seguia controls per una eritrodèrmia idiopàtica clonal que, finalment, va progressar a una SS al cap de 10.2 anys de l'inici del seguiment. Casos com aquest, posen de manifest el valor diagnòstic de l'anàlisi genotípica a la pell i a la sang perifèrica dels pacients amb eritrodèrmia. També subratllen la importància d'un seguiment estret dels pacients amb eritrodèrmies en els que es demostrï una població clonal circulant idèntica al clon de



cèl·lules T dominant de la pell, malgrat que, durant molt de temps no compleixin els criteris diagnòstics suficients d'una variant eritrodèrmica de LCCT.(271)

Els LTCD30+ són el segon grup més freqüent de LCCT i mostren unes particularitats clíniques (curs alternant remissions amb recidives i la possibilitat d'associar altres limfomes malignes en un 10-20% dels casos) que podrien suggerir la persistència de les poblacions clonals de cèl·lules T a la sang perifèrica d'aquests pacients. A la nostra experiència, vàrem analitzar trenta-nou mostres de sang perifèrica de vint pacients diagnosticats de LTCD30+. A nou pacients (45%) es va observar un clon de limfòcits T a la sang perifèrica, tanmateix, tots eren diferents als clons identificats a les biòpsies cutànies. Aquests resultats són molt concordants amb els publicats per Humme *et al.* l'any 2009. Aquests investigadors varen trobar la meitat (14/28) dels casos de LTCD30+ clonals a la sang perifèrica, però, l'anàlisi dels fragments fluorescents amplificats amb la PCR BIOMED-2 pel TCRG va revelar pics clonals diferents a ambdós compartiments. Aquestes observacions suggereixen una naturalesa reactiva de les cèl·lules T clonals de la sang perifèrica identificades als malalts amb LTCD30+.(240)

En resum, l'anàlisi genotípica de les mostres de sang perifèrica als pacients amb una sospita diagnòstica de LCP és útil. La identificació d'un clon de cèl·lules T idèntic a la pell i a la sang perifèrica proporciona una evidència addicional a favor del diagnòstic d'un LCCT (16/96 (16.7%) vs. 1/55 (1.8%),  $p = 0.006$ ) respecte a les dermatosis no limfomes. Aquesta observació té un especial interès en els pacients eritrodèrmics, atès que recolza el diagnòstic d'una variant eritrodèrmica de LCCT.(271) De fet, al nostre estudi, tots els nou casos d'eritrodèrmies en els que es va demostrar el mateix clon a la sang perifèrica i a la pell varen acabar complint els criteris diagnòstics de SS. Des del punt de vista del valor pronòstic, la demostració d'un clon idèntic a ambdós teixits s'associa a una pitjor supervivència global i específica de la malaltia al conjunt dels pacients amb LCCT i als casos de MF/SS. A més a més, quan s'avaluen els resultats de clonalitat a la sang perifèrica, és convenient tenir present la freqüent ocurrència de clons no relacionats amb els de la pell, sobretot, a individus majors de seixanta-cinc anys.

## 6.5. Limitacions

Les limitacions principals del present estudi són les pròpies de molts treballs retrospectius: l'heterogeneïtat en la recollida d'algunes dades i la no disponibilitat de certa informació d'alguns participants. Per exemple, durant els primers anys d'aplicació del protocol de PCR BIOMED-2, es realitzava majoritàriament només el TCRG per estudiar els casos sospitosos de LCCT. En canvi, en els darrers anys s'analitza freqüentment de forma sistemàtica el TCRG i el TCRB.

Per altra banda, aquest ha estat un estudi realitzat a un únic centre (Hospital del Mar de Barcelona) que, malgrat disposar d'un dispensari monogràfic referent en el diagnòstic i el tractament dels pacients amb LCP, ocasionalment ha condicionat algunes anàlisis estadístiques per una mida mostral reduïda. En aquest sentit, atès que tan sols disposàvem de cinc casos de MF amb un clon de limfòcits T relacionat a la pell i a la sang perifèrica ha estat impossible estudiar la significació pronòstica d'aquest factor al marge dels casos de SS.

Finalment, malgrat un esforç per establir la correlació clinicopatològica i de les troballes immunofenotípiques com a *gold standard* pel diagnòstic dels LCCB de curs indolent. La detecció de clonalitat al 100% dels casos suggereix que l'anàlisi genotípica podria haver estat un element rellevant per inclinar el diagnòstic diferencial amb les HLC a favor d'un LCCB de curs indolent. La manca d'uns criteris diagnòstics clars acceptats pel LCPZM / LCPCF, independents dels estudis de clonalitat, afecten a la interpretació dels resultats.





## CONCLUSIONS

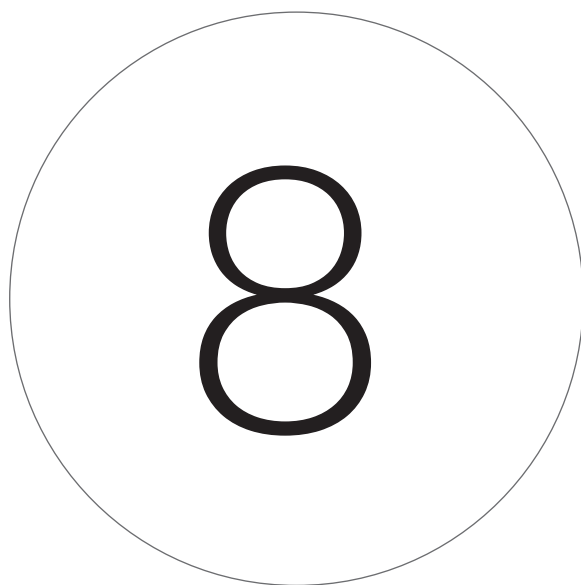


## CONCLUSIONS

---

1. El protocol de PCR EuroClonality / BIOMED-2 a les biòpsies de pell en parafina ha mostrat una sensibilitat del 91.9% (137/149) i una especificitat del 80% (144/180) en el diagnòstic diferencial dels limfomes cutanis primaris vs. diverses dermatosis inflamatòries caracteritzades per infiltrats limfoides.
2. La prova del TCRB va demostrar una major sensibilitat que el TCRG (78.3% vs. 69.6%,  $p = 0.424$ ) amb gairebé la mateixa especificitat (90.9% vs. 91.8%) en el diagnòstic de la micosi fungoide en estadis inicials (IA-IIA). La pràctica combinada d'ambdós tests diagnòstics TCRG + TCRB millorava la sensibilitat diagnòstica fins al 89.1%, tot i que, s'acompanyava d'una reducció de l'especificitat al 85.5%.
3. L'estudi dels reordenaments complets del gen IGH (VH-JH) va evidenciar un resultat clonal a la majoria dels casos de limfomes cutanis de cèl·lules B (sensibilitat = 85.7%). L'ús addicional de les proves per IGK incrementava la sensibilitat diagnòstica al 100%, tanmateix, amb una certa pèrdua d'especificitat (82.4% vs. 70.6%,  $p = 0.5$ ). Per altra banda, un resultat monoclonal o policlonal a les biòpsies de pell de processos limfoproliferatius B no ha demostrat ser un factor predictor de la probabilitat de resposta completa.
4. La comparació de la longitud dels pics clonals entre les biòpsies cutànies d'un mateix individu obtingudes de diferents localitzacions anatòmiques i/o en diferents moments evolutius de la malaltia va posar de manifest heterogeneïtat clonal en 11/80 (13.8%) dels casos de limfoma cutani primari. No es van detectar diferències estadísticament significatives en les proporcions d'heterogeneïtat clonal entre els estadis inicials de la micosi fungoide (5/24, 20.8%) i els estadis avançats (3/13, 23.1%).
5. A més de la meitat (37/60, 60%) dels pacients diagnosticats de micosi fungoide s'identifica un clon de limfòcits T a la sang perifèrica, tanmateix, la immensa majoria són clons no relacionats amb els de la pell, sense que aquests tinguin una significació pronòstica adversa.





## LÍNIAS DE FUTUR DE LA INVESTIGACIÓ





## LÍNIES DE FUTUR DE LA INVESTIGACIÓ

El protocol de PCR BIOMED-2 per estudiar els reordenaments gènics del TCR/IG ha demostrat la seva utilitat en l'estratègia diagnòstica de les proliferacions limfoides cutànies. No obstant, aquestes tècniques mesuren la longitud dels productes d'amplificació de la PCR com a substitut de la seqüència del TCR/IG. Tenint en compte aquest principi, es podria donar el cas d'interpretar com a monoclonal un pic que, en realitat, representa una barreja de seqüències diferents, no clonals que comparteixen la mateixa mida.

A la darrera dècada, s'han publicat alguns treballs que utilitzen les tecnologies de NGS/HTS per detectar la clonalitat als casos amb una sospita diagnòstica de LCCT. Aquests mètodes permeten identificar i quantificar les seqüències de nucleòtids exactes de les regions amb una major variabilitat (CDR3) del TCRG i del TCRB. L'ús d'aquestes tècniques emergents proporciona una quantitat d'informació sense precedents sobre les poblacions de cèl·lules T a una mostra biològica, en fresc, congelada o inclosa en parafina. S'ha demostrat la utilitat de la HTS del TCRB per monitoritzar la malaltia mínima residual i la resposta terapèutica als pacients amb SS post-trasplantament de progenitors hematopoètics al·logènics.(311) Alguns estudis han descrit una sensibilitat i/o especificitat superior per distingir els LCCT, particularment la MF en estadis inicials, de diverses dermatosis inflamatòries benignes.(16,243) La seqüenciació del TCR també facilita el diagnòstic de les recidives del LCCT i permet detectar una disseminació hematògena d'escasses cèl·lules T malignes indetectables amb els mitjans habituals.(16,242) A més a més, la metodologia NGS/HTS permet comparar les seqüències de nucleòtids exactes presents a diferents teixits d'un mateix pacient i, determinar amb una precisió més elevada, si els clons són idèntics o diferents.(16,243,245) Alguns autors han investigat el valor pronòstic de la HTS del TCRB identificant una freqüència del clon tumoral elevada (> 25%) a les biòpsies cutànies com el millor predictor de progressió de la malaltia i de reducció de la supervivència als pacients amb MF en estadi inicial.(244)

Les tècniques de seqüenciació (NGS/HTS) resulten, encara, proves costoses i no disponibles a tots els laboratoris de diagnòstic molecular, així i tot, els avantatges rellevants anteriorment esmentats, respecte a les tècniques de PCR BIOMED-2 d'ús

generalitzat actualment, auguren un rol cada vegada més important en el diagnòstic molecular dels limfomes cutanis. L'elevada sensibilitat i precisió de la tecnologia NGS/HTS permetrà aprofundir en el coneixement de les relacions entre els clons limfoides tumorals i el microambient, així com, sobre la distribució de les poblacions clonals de cèl·lules T (idèntiques o diferents) de la pell i de les localitzacions extracutànies. Tanmateix, aquestes tècniques tan valuoses difícilment esdevindran una prova diagnòstica única dels limfomes cutanis, subratllant la necessitat d'una bona correlació entre la presentació clínica, les troballes histopatològiques, immunofenotípiques i moleculars.(16)

Per altra banda, tenint en compte que els limfomes cutanis són unes neoplàsies poc freqüents, es requereixen estudis multicèntrics a fi d'assolir una mida mostral que permeti extreure unes conclusions sòlides. En aquest sentit, des de l'any 2015 s'ha posat en marxa el projecte PROCLIP (PROspective International Cutaneous Lymphoma Prognostic Index). És un sistema de bases de dades, segures, a través d'una pàgina web dissenyat específicament per recopilar informació clínica, histopatològica, immunohistoquímica, molecular, radiològica, terapèutica, etc. dels limfomes cutanis. (24,312-315) Els resultats de l'anàlisi genotípica mitjançant diferents metodologies (protocol de PCR BIOMED-2, HTS) també formen part d'aquest registre, que té com a objectiu principal desenvolupar un índex pronòstic pels pacients amb limfoma cutani. Segurament, la recopilació d'informació d'un nombre considerable de casos atesos als centres de referència d'arreu del món en el diagnòstic i el maneig dels limfomes cutanis, contribuirà decididament a aclarir, entre altres, algunes de les principals incògnites sobre el valor diagnòstic i pronòstic de l'anàlisi genotípica als limfomes cutanis.







## BIBLIOGRAFIA



## BIBLIOGRAFIA

---

1. Willemze R, Cerroni L, Kempf W, Berti E, Facchetti F, Swerdlow SH, et al. The 2018 update of the WHO-EORTC classification for primary cutaneous lymphomas. *Blood*. 2019;133(16):1703–14.
2. Willemze R, Jaffe ES, Burg G, Cerroni L, Berti E, Swerdlow SH, et al. WHO-EORTC classification for cutaneous lymphomas. *Blood*. 2005;105(10):3768–85.
3. Groves FD, Linet MS, Travis LB, Devesa SS. Cancer surveillance series: non-Hodgkin's lymphoma incidence by histologic subtype in the United States from 1978 through 1995. *J Natl Cancer Inst*. 2000;92(15):1240–51.
4. Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, Jaffe ES, Pileri SA, Stein H, Thiele J, Vardiman JW (Eds). *WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues*. 4th ed. Lyon: IARC; 2008.
5. Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, Jaffe ES, Pileri SA, Stein H, Thiele J (Eds): *WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues (Revised 4th edition)*. Lyon: IARC; 2017.
6. Elder DE, Massi D, Scolyer RA, Willemze R (Eds). *WHO Classification of Skin Tumours*. 4th ed. Lyon: IARC; 2018.
7. Cerroni L. Mycosis fungoides-clinical and histopathologic features, differential diagnosis, and treatment. *Semin Cutan Med Surg*. 2018;37(1):2-10.
8. Fink-Puches R, Chott A, Ardigó M, Simonitsch I, Ferrara G, Kerl H, et al. The spectrum of cutaneous lymphomas in patients less than 20 years of age. *Pediatr Dermatol*. 2004;21(5):525–33.
9. Jawed SI, Myskowski PL, Horwitz S, Moskowitz A, Querfeld C. Primary cutaneous T-cell lymphoma (mycosis fungoides and Sézary syndrome): Part I. Diagnosis: clinical and histopathologic features and new molecular and biologic markers. *J Am Acad Dermatol*. 2014;70(2):205.e1-16.



10. Pimpinelli N, Olsen EA, Santucci M, Vonderheid E, Haeffner AC, Stevens S, et al. Defining early mycosis fungoides. *J Am Acad Dermatol*. 2005;53(6):1053–63.
11. Salhany KE, Cousar JB, Greer JP, Casey TT, Fields JP, Collins RD. Transformation of cutaneous T cell lymphoma to large cell lymphoma. A clinicopathologic and immunologic study. *Am J Pathol*. 1988;132(2):265–77.
12. Willemze R. Mycosis fungoides variants-clinicopathologic features, differential diagnosis, and treatment. *Semin Cutan Med Surg*. 2018;37(1):11–7.
13. Massone C, Crisman G, Kerl H, Cerroni L. The prognosis of early mycosis fungoides is not influenced by phenotype and T-cell clonality. *Br J Dermatol*. 2008;159(4):881–6.
14. Ponti R, Quaglino P, Novelli M, Fierro MT, Comessatti A, Peroni A, et al. T-cell receptor gamma gene rearrangement by multiplex polymerase chain reaction/heteroduplex analysis in patients with cutaneous T-cell lymphoma (mycosis fungoides/Sézary syndrome) and benign inflammatory disease: correlation with clinical, histological and immunophenotypical findings. *Br J Dermatol*. 2005;153(3):565–73.
15. Matos TR, de Rie MA, Teunissen MBM. Research Techniques Made Simple: High-Throughput Sequencing of the T-Cell Receptor. *J Invest Dermatol*. 2017;137(6):e131–8.
16. Kirsch IR, Watanabe R, O'Malley JT, Williamson DW, Scott LL, Elco CP, et al. TCR sequencing facilitates diagnosis and identifies mature T cells as the cell of origin in CTCL. *Sci Transl Med*. 2015;7(308):308ra158.
17. Agar NS, Wedgeworth E, Crichton S, Mitchell TJ, Cox M, Ferreira S, et al. Survival outcomes and prognostic factors in mycosis fungoides/Sézary syndrome: validation of the revised International Society for Cutaneous Lymphomas/European Organisation for Research and Treatment of Cancer staging proposal. *J Clin Oncol*. 2010;28(31):4730–9.

18. Olsen E, Vonderheid E, Pimpinelli N, Willemze R, Kim Y, Knobler R, et al. Revisions to the staging and classification of mycosis fungoides and Sézary syndrome: a proposal of the International Society for Cutaneous Lymphomas (ISCL) and the cutaneous lymphoma task force of the European Organization of Research and Treatment of Cancer (EORTC). *Blood*. 2007;110(6):1713–22.
19. Trautinger F, Eder J, Assaf C, Bagot M, Cozzio A, Dummer R, et al. European Organisation for Research and Treatment of Cancer consensus recommendations for the treatment of mycosis fungoides/Sézary syndrome – Update 2017. *Eur J Cancer*. 2017;77:57–74.
20. Kempf W, Zimmermann AK, Mitteldorf C. Cutaneous lymphomas—An update 2019. *Hematol Oncol*. 2019;37(S1):43–7.
21. Jawed SI, Myskowski PL, Horwitz S, Moskowitz A, Querfeld C. Primary cutaneous T-cell lymphoma (mycosis fungoides and Sézary syndrome): Part II. Prognosis, management, and future directions. *J Am Acad Dermatol*. 2014;70(2):223.e1-17.
22. Scarisbrick JJ, Prince HM, Vermeer MH, Quaglino P, Horwitz S, Porcu P, et al. Cutaneous lymphoma international consortium study of outcome in advanced stages of mycosis fungoides and sézary syndrome: Effect of specific prognostic markers on survival and development of a prognostic model. *J Clin Oncol*. 2015;33(32):3766–73.
23. Scarisbrick JJ, Kim YH, Whittaker SJ, Wood GS, Vermeer MH, Prince HM, et al. Prognostic factors, prognostic indices and staging in mycosis fungoides and Sézary syndrome: where are we now? *Br J Dermatol*. 2014;170(6):1226–36.
24. Scarisbrick JJ, Quaglino P, Prince HM, Papadavid E, Hodak E, Bagot M, et al. The PROCLIP international registry of early-stage mycosis fungoides identifies substantial diagnostic delay in most patients. *Br J Dermatol*. 2019;181(2):350-7.
25. Kazakov DV, Burg G, Kempf W. Clinicopathological spectrum of mycosis fungoides. *J Eur Acad Dermatol Venereol*. 2004;18(4):397–415.

26. Nashan D, Faulhaber D, Ständer S, Luger TA, Stadler R. Mycosis fungoides: a dermatological masquerader. *Br J Dermatol.* 2007;156(1):1–10.
27. Martínez-Escala ME, González BR, Guitart J. Mycosis fungoides variants. *Surg Pathol Clin.* 2014;7(2):169–89.
28. Muniesa C, Estrach T, Pujol RM, Gallardo F, Garcia-Muret P, Climent J, et al. Folliculotropic mycosis fungoides: clinicopathological features and outcome in a series of 20 cases. *J Am Acad Dermatol.* 2010;62(3):418–26.
29. Gerami P, Guitart J. The spectrum of histopathologic and immunohistochemical findings in folliculotropic mycosis fungoides. *Am J Surg Pathol.* 2007;31(9):1430–8.
30. Van Doorn R, Scheffer E, Willemze R. Follicular mycosis fungoides, a distinct disease entity with or without associated follicular mucinosis: a clinicopathologic and follow-up study of 51 patients. *Arch Dermatol.* 2002;138(2):191–8.
31. Gerami P, Rosen S, Kuzel T, Boone SL, Guitart J. Folliculotropic mycosis fungoides: an aggressive variant of cutaneous T-cell lymphoma. *Arch Dermatol.* 2008;144(6):738–46.
32. Van Santen S, Roach REJ, Van Doorn R, Horvath B, Bruijn MS, Sanders CJG, et al. Clinical staging and prognostic factors in Folliculotropic Mycosis Fungoides. *JAMA Dermatol.* 2016;152(9):992–1000.
33. Hodak E, Amitay-Laish I, Atzmony L, Prag-Naveh H, Yanichkin N, Barzilai A, et al. New insights into folliculotropic mycosis fungoides (FMF): A single-center experience. *J Am Acad Dermatol.* 2016;75(2):347–55.
34. van Santen S, van Doorn R, Neelis KJ, Daniëls LA, Horváth B, Bruijn MS, et al. Recommendations for treatment in folliculotropic mycosis fungoides: report of the Dutch Cutaneous Lymphoma Group. *Br J Dermatol.* 2017;177(1):223–8.

35. Haghighi B, Smoller BR, LeBoit PE, Warnke RA, Sander CA, Kohler S. Pagetoid reticulosis (Woringer-Kolopp disease): an immunophenotypic, molecular, and clinicopathologic study. *Mod Pathol*. 2000;13(5):502–10.
36. LeBoit PE. Granulomatous slack skin. *Dermatol Clin*. 1994;12(2):375–89.
37. Shah A, Safaya A. Granulomatous slack skin disease: a review, in comparison with mycosis fungoides. *J Eur Acad Dermatol Venereol*. 2012;26(12):1472–8.
38. Kempf W, Ostheeren-Michaelis S, Paulli M, Lucioni M, Wechsler J, Audring H, et al. Granulomatous mycosis fungoides and granulomatous slack skin: a multi-center study of the cutaneous lymphoma histopathology task force group of the European Organization for Research and Treatment of Cancer (EORTC). *Arch Dermatol*. 2008;144(12):1609–17.
39. Campbell JJ, Clark RA, Watanabe R, Kupper TS. Sézary syndrome and mycosis fungoides arise from distinct T-cell subsets: a biologic rationale for their distinct clinical behaviors. *Blood*. 2010;116(5):767–71.
40. Sokolowska-Wojdylo M, Wenzel J, Gaffal E, Lenz J, Speuser P, Erdmann S, et al. Circulating clonal CLA(+) and CD4(+) T cells in Sézary syndrome express the skin-homing chemokine receptors CCR4 and CCR10 as well as the lymph node-homing chemokine receptor CCR7. *Br J Dermatol*. 2005;152(2):258–64.
41. Spicknall KE. Sézary syndrome—clinical and histopathologic features, differential diagnosis, and treatment. *Semin Cutan Med Surg*. 2018;37(1):18–23.
42. Kubica AW, Davis MDP, Weaver AL, Killian JM, Pittelkow MR. Sézary syndrome: a study of 176 patients at Mayo Clinic. *J Am Acad Dermatol*. 2012;67(6):1189–99.
43. Trotter MJ, Whittaker SJ, Orchard GE, Smith NP. Cutaneous histopathology of Sézary syndrome: a study of 41 cases with a proven circulating T-cell clone. *J Cutan Pathol*. 1997;24(5):286–91.

44. Klemke CD, Booken N, Weiss C, Nicolay JP, Goerdts S, Felcht M, et al. Histopathological and immunophenotypical criteria for the diagnosis of Sézary syndrome in differentiation from other erythrodermic skin diseases: a European Organisation for Research and Treatment of Cancer (EORTC) Cutaneous Lymphoma Task Force Study of 97 cases. *Br J Dermatol*. 2015;173(1):93–105.
45. Çetinözman F, Jansen PM, Vermeer MH, Willemze R. Differential expression of Programmed Death-1 (PD-1) in Sézary syndrome and mycosis fungoides. *Arch Dermatol*. 2012;148(12):1379–85.
46. Nagler AR, Samimi S, Schaffer A, Vittorio CC, Kim EJ, Rook AH. Peripheral blood findings in erythrodermic patients: importance for the differential diagnosis of Sézary syndrome. *J Am Acad Dermatol*. 2012;66(3):503–8.
47. Scarisbrick JJ, Hodak E, Bagot M, Stranzenbach R, Stadler R, Ortiz-Romero PL, et al. Blood classification and blood response criteria in mycosis fungoides and Sézary syndrome using flow cytometry: recommendations from the EORTC cutaneous lymphoma task force. *Eur J Cancer*. 2018;93:47–56.
48. Hurabielle C, Thonnart N, Ram-Wolff C, Sicard H, Bensussan A, Bagot M, et al. Usefulness of KIR3DL2 to diagnose, follow-up, and manage the treatment of patients with Sézary syndrome. *Clin Cancer Res*. 2017;23(14):3619–27.
49. Boonk SE, Zoutman WH, Marie-Cardine A, van der Fits L, Out-Luiting JJ, Mitchell TJ, et al. Evaluation of immunophenotypic and molecular biomarkers for Sézary syndrome using standard operating procedures: a multicenter study of 59 patients. *J Invest Dermatol*. 2016;136(7):1364–72.
50. Nicolay JP, Felcht M, Schledzewski K, Goerdts S, Géraud C. Sézary syndrome: old enigmas, new targets. *J Dtsch Dermatol Ges*. 2016;14(3):256–64.
51. Wu XS, Lonsdorf AS, Hwang ST. Cutaneous T-cell lymphoma: roles for chemokines and chemokine receptors. *J Invest Dermatol*. 2009;129(5):1115–9.

52. Prasad A, Rabionet R, Espinet B, Zapata L, Puiggros A, Melero C, et al. Identification of gene mutations and fusion genes in patients with Sézary syndrome. *J Invest Dermatol.* 2016;136(7):1490–9.
53. Chevret E, Merlio JP. Sézary syndrome: translating genetic diversity into personalized medicine. *J Invest Dermatol.* 2016;136(7):1319–24.
54. Kempf W, Kerl K, Mitteldorf C. Cutaneous CD30-positive T-cell lymphoproliferative disorders- clinical and histopathologic features, differential diagnosis, and treatment. *Semin Cutan Med Surg.* 2018;37(1):24–9.
55. Kempf W. A new era for cutaneous CD30-positive T-cell lymphoproliferative disorders. *Semin Diagn Pathol.* 2017;34(1):22–35.
56. Kadin M, Levi E, Kempf W. Progression of lymphomatoid papulosis to systemic lymphoma is associated with escape from growth inhibition by transforming growth factor- $\beta$  and CD30 ligand. *Ann N Y Acad Sci.* 2001;941(1):59–68.
57. Bekkenk MW, Geelen FAMJ, Van Voorst Vader PC, Heule F, Geerts ML, Van Vloten WA, et al. Primary and secondary cutaneous CD30+ lymphoproliferative disorders: a report from the Dutch Cutaneous Lymphoma Group on the long-term follow-up data of 219 patients and guidelines for diagnosis and treatment. *Blood.* 2000;95(12):3653–61.
58. 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.
59. Macaulay WL. Lymphomatoid papulosis. A continuing self-healing eruption, clinically benign-histologically malignant. *Arch Dermatol.* 1968;97(1):23–30.

60. De Souza A, El-Azhary RA, Camilleri MJ, Wada DA, Appert DL, Gibson LE. In search of prognostic indicators for lymphomatoid papulosis: a retrospective study of 123 patients. *J Am Acad Dermatol*. 2012;66(6):928–37.
61. Pujol RM, García Muret MP, Bergua P, Bordes R, Alomar A. Oral involvement in lymphomatoid papulosis. Report of two cases and review of the literature. *Dermatology*. 2005;210(1):53–7.
62. Kempf W. Cutaneous CD30-positive lymphoproliferative disorders. *Surg Pathol Clin*. 2014;7(2):203–28.
63. 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.
64. El Shabrawi-Caelen L, Kerl H, Cerroni L. Lymphomatoid papulosis: reappraisal of clinicopathologic presentation and classification into subtypes A, B, and C. *Arch Dermatol*. 2004;140(4):441–7.
65. 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.
66. Kempf W, Kazakov DV, Schärer L, Rütten A, Mentzel T, Paredes BE, et al. Angioinvasive lymphomatoid papulosis: a new variant simulating aggressive lymphomas. *Am J Surg Pathol*. 2013;37(1):1–13.
67. Kempf W, Mitteldorf C, Karai LJ, Robson A. Lymphomatoid papulosis - making sense of the alphabet soup: a proposal to simplify terminology. *J Dtsch Dermatol Ges*. 2017;15(4):390–4.

68. de Souza A, Camilleri MJ, Wada DA, Appert DL, Gibson LE, El-Azhary RA. Clinical, histopathologic, and immunophenotypic features of lymphomatoid papulosis with CD8 predominance in 14 pediatric patients. *J Am Acad Dermatol.* 2009;61(6):993–1000.
69. Greisser J, Palmedo G, Sander C, Kutzner H, Kazakov DV, Roos M, et al. Detection of clonal rearrangement of T-cell receptor genes in the diagnosis of primary cutaneous CD30+ lymphoproliferative disorders. *J Cutan Pathol.* 2006;33(11):711–5.
70. Chott A, Vonderheid EC, Olbricht S, Miao NN, Balk SP, Kadin ME. The same 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.
71. Davis TH, Morton CC, Miller-Cassman R, Balk SP, Kadin ME. Hodgkin's disease, lymphomatoid papulosis, and cutaneous t-cell lymphoma derived from a common t-cell clone. *N Engl J Med.* 1992;326(17):1115–22.
72. De La Garza Bravo MM, Patel KP, Loghavi S, Curry JL, Torres Cabala CA, Cason RC, et al. Shared clonality in distinctive lesions of lymphomatoid papulosis and mycosis fungoides occurring in the same patients suggests a common origin. *Hum Pathol.* 2015;46(4):558–69.
73. Liu HL, Hoppe RT, Kohler S, Harvell JD, Reddy S, Kim YH. CD30+ cutaneous lymphoproliferative disorders: The Stanford experience in lymphomatoid papulosis and primary cutaneous anaplastic large cell lymphoma. *J Am Acad Dermatol.* 2003;49(6):1049–58.
74. Melchers RC, Willemze R, Vermaat JSP, Jansen PM, Daniëls LA, Putter H, et al. Outcomes of rare patients with a primary cutaneous CD30+ lymphoproliferative disorder developing extracutaneous disease. *Blood.* 2020;135(10):769–73.



75. Macgrogan G, Vergier B, Dubus P, Beylot-Barry M, Belleanne G, Delaunay M, et al. CD30-positive cutaneous large cell lymphomas. A comparative study of clinicopathologic and molecular features of 16 cases. *Am J Clin Pathol*. 1996;105(4):440–50.
76. DeCoteau JF, Butmarc JR, Kinney MC, Kadin ME. The t(2;5) chromosomal translocation is not a common feature of primary cutaneous CD30+ lymphoproliferative disorders: comparison with anaplastic large-cell lymphoma of nodal origin. *Blood*. 1996;87(8):3437–41.
77. Oschlies I, Lisfeld J, Lamant L, Nakazawa A, D'Amore ESG, Hansson U, et al. ALK-positive anaplastic large cell lymphoma limited to the skin: clinical, histopathological and molecular analysis of 6 pediatric cases. A report from the ALCL99 study. *Haematologica*. 2013;98(1):50–6.
78. Prieto-Torres L, Rodriguez-Pinilla SM, Onaindia A, Ara M, Requena L, Piris M. CD30-positive primary cutaneous lymphoproliferative disorders: molecular alterations and targeted therapies. *Haematologica*. 2019;104(2):226–35.
79. 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.
80. 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.
81. Prince HM, Kim YH, Horwitz S, Dummer R, Scarisbrick J, Quaglino P, et al. Brentuximab vedotin or physician's choice in CD30-positive cutaneous T-cell lymphoma (ALCANZA): an international, open-label, randomised, phase 3, multicentre trial. *Lancet*. 2017;390(10094):555–66.

82. Kumar S, Krenacs L, Medeiros J, Elenitoba-Johnson KSJ, Greiner TC, Sorbara L, et al. Subcutaneous panniculitic T-cell lymphoma is a tumor of cytotoxic T lymphocytes. *Hum Pathol.* 1998;29(4):397–403.
83. Willemze R, Jansen PM, Cerroni L, Berti E, Santucci M, Assaf C, et al. Subcutaneous panniculitis-like T-cell lymphoma: definition, classification, and prognostic factors: an EORTC Cutaneous Lymphoma Group Study of 83 cases. *Blood.* 2008;111(2):838–45.
84. Massone C, Lozzi GP, Egberts F, Fink-Puches R, Cota C, Kerl H, et al. The protean spectrum of non-Hodgkin lymphomas with prominent involvement of subcutaneous fat. *J Cutan Pathol.* 2006;33(6):418–25.
85. Bosisio F, Boi S, Caputo V, Chiarelli C, Oliver F, Ricci R, et al. Lobular panniculitic infiltrates with overlapping histopathologic features of lupus panniculitis (lupus profundus) and subcutaneous T-cell lymphoma: a conceptual and practical dilemma. *Am J Surg Pathol.* 2015;39(2):206–11.
86. Gallardo F, Pujol RM. Subcutaneous panniculitic-like T-cell lymphoma and other primary cutaneous lymphomas with prominent subcutaneous tissue involvement. *Dermatol Clin.* 2008;26(4):529–40.
87. Magro CM, Crowson AN, Kovatich AJ, Burns F. Lupus profundus, indeterminate lymphocytic lobular panniculitis and subcutaneous T-cell lymphoma: a spectrum of subcuticular T-cell lymphoid dyscrasia. *J Cutan Pathol.* 2001;28(5):235–47.
88. Kong Y, Dai B, Kong J, Zhou X, Lu H, Shen L, et al. Subcutaneous panniculitis-like T-cell lymphoma: a clinicopathologic, immunophenotypic, and molecular study of 22 Asian cases according to WHO-EORTC classification. *Am J Surg Pathol.* 2008;32(10):1495–502.
89. Salhany KE, Macon WR, Choi JK, Elenitsas R, Lessin SR, Felgar RE, et al. Subcutaneous panniculitis-like T-cell lymphoma: clinicopathologic, immunophenotypic, and genotypic analysis of alpha/beta and gamma/delta subtypes. *Am J Surg Pathol.* 1998;22(7):881–93.

90. López-Lerma I, Peñate Y, Gallardo F, Martí RM, Mitxelena J, Bielsa I, et al. Subcutaneous panniculitis-like T-cell lymphoma: Clinical features, therapeutic approach, and outcome in a case series of 16 patients. *J Am Acad Dermatol*. 2018;79(5):892–8.
91. Lee WJ, Lee MH, Won CH, Chang SE, Choi JH, Moon KC, et al. Comparative histopathologic analysis of cutaneous extranodal natural killer/T-cell lymphomas according to their clinical morphology. *J Cutan Pathol*. 2016;43(4):324–33.
92. Mraz-Gernhard S, Natkunam Y, Hoppe RT, LeBoit P, Kohler S, Kim YH. Natural killer/natural killer-like T-cell lymphoma, CD56+, presenting in the skin: an increasingly recognized entity with an aggressive course. *J Clin Oncol*. 2001;19(8):2179–88.
93. Takata K, Hong ME, Sitthinamsuwan P, Loong F, Tan SY, Liao JY, et al. Primary cutaneous NK/T-cell lymphoma, nasal type and CD56-positive peripheral T-cell lymphoma: a cellular lineage and clinicopathologic study of 60 patients from Asia. *Am J Surg Pathol*. 2015;39(1):1–12.
94. Yu JB, Zuo Z, Tang Y, Zhao S, Zhang YC, Bi CF, et al. Extranodal nasal-type natural killer/T-cell lymphoma of the skin: a clinicopathologic study of 16 cases in China. *Hum Pathol*. 2009;40(6):807–16.
95. Geller S, Myskowski PL, Pulitzer M. NK/T-cell lymphoma, nasal type,  $\gamma\delta$  T-cell lymphoma, and CD8-positive epidermotropic T-cell lymphoma—clinical and histopathologic features, differential diagnosis, and treatment. *Semin Cutan Med Surg*. 2018;37(1):30–8.
96. Gru AA, Jaffe ES. Cutaneous EBV-related lymphoproliferative disorders. *Semin Diagn Pathol*. 2017;34(1):60–75.
97. 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.

98. Au WY, Weisenburger DD, Intragumtornchai T, Nakamura S, Kim WS, Sng I, et al. Clinical differences between nasal and extranasal natural killer/T-cell lymphoma: a study of 136 cases from the International Peripheral T-Cell Lymphoma Project. *Blood*. 2009;113(17):3931–7.
99. Ahn HK, Suh C, Chuang SS, Suzumiya J, Ko YH, Kim SJ, et al. Extranodal natural killer/T-cell lymphoma from skin or soft tissue: suggestion of treatment from multinational retrospective analysis. *Ann Oncol*. 2012;23(10):2703–7.
100. Yamaguchi M, Suzuki R, Oguchi M. Advances in the treatment of extranodal NK/T-cell lymphoma, nasal type. *Blood*. 2018;131(23):2528–40.
101. Toro JR, Beaty M, Sorbara L, Turner ML, White J, Kingma DW, et al.  $\gamma\delta$  T-cell lymphoma of the skin: a clinical, microscopic, and molecular study. *Arch Dermatol*. 2000;136(8):1024–32.
102. Toro JR, Liewehr DJ, Pabby N, Sorbara L, Raffeld M, Steinberg SM, et al. Gamma-delta T-cell phenotype is associated with significantly decreased survival in cutaneous T-cell lymphoma. *Blood*. 2003;101(9):3407–12.
103. Guitart J, Weisenburger DD, Subtil A, Kim E, Wood G, Duvic M, et al. Cutaneous  $\gamma\delta$  T-cell lymphomas: a spectrum of presentations with overlap with other cytotoxic lymphomas. *Am J Surg Pathol*. 2012;36(11):1656–65.
104. Garcia-Herrera A, Song JY, Chuang SS, Villamor N, Colomo L, Pittaluga S, et al. Nonhepatosplenic  $\gamma\delta$  T-cell lymphomas represent a spectrum of aggressive cytotoxic T-cell lymphomas with a mainly extranodal presentation. *Am J Surg Pathol*. 2011;35(8):1214–25.
105. Berti E, Cerri A, Cavicchini S, Delia D, Soligo D, Alessi E, et al. Primary cutaneous  $\gamma\delta$  T-cell lymphoma presenting as disseminated pagetoid reticulosis. *J Invest Dermatol*. 1991;96(5):718–23.

106. Merrill ED, Agbay R, Miranda RN, Aung PP, Tetzlaff MT, Young KH, et al. Primary cutaneous T-cell lymphomas showing gamma-delta ( $\gamma\delta$ ) phenotype and predominantly epidermotropic pattern are clinicopathologically distinct from classic primary cutaneous  $\gamma\delta$  T-cell lymphomas. *Am J Surg Pathol.* 2017;41(2):204–15.
107. 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.
108. Robson A, Assaf C, Bagot M, Burg G, Calonje E, Castillo C, et al. Aggressive epidermotropic cutaneous CD8+ lymphoma: a cutaneous lymphoma with distinct clinical and pathological features. Report of an EORTC Cutaneous Lymphoma Task Force Workshop. *Histopathology.* 2015;67(4):425–41.
109. Marzano A V., Ghislanzoni M, Gianelli U, Caputo R, Alessi E, Berti E. Fatal CD8+ epidermotropic cytotoxic primary cutaneous T-cell lymphoma with multiorgan involvement. *Dermatology.* 2005;211(3):281–5.
110. Guitart J, Martinez-Escala ME, Subtil A, Duvic M, Pulitzer MP, Olsen EA, et al. Primary cutaneous aggressive epidermotropic cytotoxic T-cell lymphomas: reappraisal of a provisional entity in the 2016 WHO classification of cutaneous lymphomas. *Mod Pathol.* 2017;30(5):761–72.
111. Massone C, Chott A, Metze D, Kerl K, Citarella L, Vale E, et al. Subcutaneous, blastic natural killer (NK), NK/T-cell, and other cytotoxic lymphomas of the skin: a morphologic, immunophenotypic, and molecular study of 50 patients. *Am J Surg Pathol.* 2004;28(6):719–35.
112. Beltraminelli H, Leinweber B, Kerl H, Cerroni L. Primary cutaneous CD4+ small-/medium-sized pleomorphic T-cell lymphoma: a cutaneous nodular proliferation of pleomorphic T lymphocytes of undetermined significance? A study of 136 cases. *Am J Dermatopathol.* 2009;31(4):317–22.

113. Çetinözman F, Jansen PM, Willemze R. Expression of programmed death-1 in primary cutaneous CD4-positive small/medium-sized pleomorphic T-cell lymphoma, cutaneous pseudo-T-cell lymphoma, and other types of cutaneous T-cell lymphoma. *Am J Surg Pathol.* 2012;36(1):109–16.
114. Garcia-Herrera A, Colomo L, Camós M, Carreras J, Balague O, Martinez A, et al. Primary cutaneous small/medium CD4+ T-cell lymphomas: a heterogeneous group of tumors with different clinicopathologic features and outcome. *J Clin Oncol.* 2008;26(20):3364–71.
115. James E, Sokhn JG, Gibson JF, Carlson K, Subtil A, Girardi M, et al. CD4 + primary cutaneous small/medium-sized pleomorphic T-cell lymphoma: a retrospective case series and review of literature. *Leuk Lymphoma.* 2015;56(4):951–7.
116. Rodríguez Pinilla SM, Roncador G, Rodríguez-Peralto JL, Mollejo M, García JF, Montes-Moreno S, et al. Primary cutaneous CD4+ small/medium-sized pleomorphic T-cell lymphoma expresses follicular T-cell markers. *Am J Surg Pathol.* 2009;33(1):81–90.
117. Grogg KL, Jung S, Erickson LA, McClure RF, Dogan A. Primary cutaneous CD4-positive small/medium-sized pleomorphic T-cell lymphoma: a clonal T-cell lymphoproliferative disorder with indolent behavior. *Mod Pathol.* 2008;21(6):708–15.
118. Petrella T, Maubec E, Cornillet-Lefebvre P, Willemze R, Pluot M, Durlach A, et al. Indolent CD8-positive lymphoid proliferation of the ear: a distinct primary cutaneous T-cell lymphoma? *Am J Surg Pathol.* 2007;31(12):1887–92.
119. Kluk J, Kai A, Koch D, Taibjee SM, O'Connor S, Persic M, et al. Indolent CD8-positive lymphoid proliferation of acral sites: three further cases of a rare entity and an update on a unique patient. *J Cutan Pathol.* 2016;43(2):125–36.

120. Greenblatt D, Ally M, Child F, Scarisbrick J, Whittaker S, Morris S, et al. Indolent CD8+ lymphoid proliferation of acral sites: a clinicopathologic study of six patients with some atypical features. *J Cutan Pathol*. 2013;40(2):248–58.
121. Kempf W, Kazakov DV, Cozzio A, Kamarashev J, Kerl K, Plaza T, et al. Primary cutaneous CD8+ small- to medium-sized lymphoproliferative disorder in extra-facial sites: clinicopathologic features and concept on their classification. *Am J Dermatopathol*. 2013;35(2):159–66.
122. Li JY, Guitart J, Pulitzer MP, Subtil A, Sundram U, Kim Y, et al. Multicenter case series of indolent small/medium-sized CD8+ lymphoid proliferations with predilection for the ear and face. *Am J Dermatopathol*. 2014;36(5):402–8.
123. Wobser M, Roth S, Reinartz T, Rosenwald A, Goebeler M, Geissinger E. CD68 expression is a discriminative feature of indolent cutaneous CD8-positive lymphoid proliferation and distinguishes this lymphoma subtype from other CD8-positive cutaneous lymphomas. *Br J Dermatol*. 2015;172(6):1573–80.
124. Willemze R. CD30-negative cutaneous T-cell lymphomas other than mycosis fungoides. *Surg Pathol Clin*. 2014;7(2):229–52.
125. Bekkenk MW, Vermeer MH, Jansen PM, Van Marion AMW, Canninga-van Dijk MR, Kluin PM, et al. Peripheral T-cell lymphomas unspecified presenting in the skin: analysis of prognostic factors in a group of 82 patients. *Blood*. 2003;102(6):2213–9.
126. Lee MH, Choi ME, Won CH, Chang SE, Lee MW, Choi JH, et al. Comparative clinicopathologic analysis of cutaneous peripheral T-cell lymphoma, not otherwise specified, according to primary tumor site. *J Am Acad Dermatol*. 2019;80(6):1771–4.
127. Pileri A, Agostinelli C, Fuligni F, Broccoli A, Gunnella S, Sabattini E, et al. Primary cutaneous peripheral T-cell lymphoma not otherwise specified a rare and aggressive lymphoma. *J Eur Acad Dermatol Venereol*. 2018;32(10):e373–6.

128. Aderhold K, Carpenter L, Brown K, Donato A. Primary cutaneous peripheral T-cell lymphoma not otherwise specified: a rapidly progressive variant of cutaneous T-cell lymphoma. *Case Rep Oncol Med*. 2015;2015:1–3.
129. Wallett A, Ibbetson JS, Kearney D, Newland K, Sidhu S. Cutaneous manifestations of peripheral T-cell lymphoma, not otherwise specified: a case series highlighting the diagnostic challenges for this heterogeneous group. *Australas J Dermatol*. 2015;56(3):197–201.
130. Tolkachjov SN, Weenig RH, Comfere NI. Cutaneous peripheral T-cell lymphoma, not otherwise specified: a single-center prognostic analysis. *J Am Acad Dermatol*. 2016;75(5):992–9.
131. Chen ST, Barnes J, Duncan L. Primary cutaneous B-cell lymphomas- clinical and histopathologic features, differential diagnosis, and treatment. *Semin Cutan Med Surg*. 2018;37(1):49–55.
132. Vermeer MH, Willemze R. Recent advances in primary cutaneous B-cell lymphomas. *Curr Opin Oncol*. 2014;26(2):230–6.
133. Peñate Y, Servitje O, Machan S, Fernández-de-Misa R, Estrach MT, Acebo E, et al. The first year of the AEVD Primary Cutaneous Lymphoma Registry. *Actas Dermosifiliogr*. 2018;109(7):610–6.
134. Senff NJ, Hoefnagel JJ, Jansen PM, Vermeer MH, van Baarlen J, Blokx WA, et al. Reclassification of 300 primary cutaneous B-cell lymphomas according to the new WHO-EORTC classification for cutaneous lymphomas: comparison with previous classifications and identification of prognostic markers. *J Clin Oncol*. 2007;25(12):1581–7.
135. Servitje O, Muniesa C, Benavente Y, Monsálvez V, Garcia-Muret MP, Gallardo F, et al. Primary cutaneous marginal zone B-cell lymphoma: response to treatment and disease-free survival in a series of 137 patients. *J Am Acad Dermatol*. 2013;69(3):357–65.



136. Rijlaarsdam U, Bakels V, van Oostveen JW, Gordijn RJL, Geerts ML, Meijer CJLM, et al. Demonstration of clonal immunoglobulin gene rearrangements in cutaneous B-cell lymphomas and pseudo-B-cell lymphomas: differential diagnostic and pathogenetic aspects. *J Invest Dermatol.* 1992;99(6):749–54.
137. Cerroni L, Zöchling N, Pütz B, Kerl H. Infection by *Borrelia burgdorferi* and cutaneous B-cell lymphoma. *J Cutan Pathol.* 1997;24(8):457–61.
138. Guitart J, Deonizio J, Bloom T, Martinez-Escala ME, Kuzel TM, Gerami P, et al. High incidence of gastrointestinal tract disorders and autoimmunity in primary cutaneous marginal zone B-cell lymphomas. *JAMA Dermatol.* 2014;150(4):412–8.
139. Mitteldorf C, Kempf W. Cutaneous pseudolymphoma—A review on the spectrum and a proposal for a new classification. *J Cutan Pathol.* 2020;47(1):76–97.
140. Schafernak KT, Variakojis D, Goolsby CL, Tucker RM, Martínez-Escala ME, Smith FA, et al. Clonality assessment of cutaneous B-cell lymphoid proliferations: a comparison of flow cytometry immunophenotyping, molecular studies, and immunohistochemistry/in situ hybridization and review of the literature. *Am J Dermatopathol.* 2014;36(10):781–95.
141. Swerdlow SH. Cutaneous marginal zone lymphomas. *Semin Diagn Pathol.* 2017;34(1):76–84.
142. Suárez AL, Pulitzer M, Horwitz S, Moskowitz A, Querfeld C, Myskowski PL. Primary cutaneous B-cell lymphomas: Part I. Clinical features, diagnosis, and classification. *J Am Acad Dermatol.* 2013;69(3):329.e1-13.
143. Servitje O, Gallardo F, Estrach T, Pujol RM, Blanco A, Fernández-Sevilla A, et al. Primary cutaneous marginal zone B-cell lymphoma: a clinical, histopathological, immunophenotypic and molecular genetic study of 22 cases. *Br J Dermatol.* 2002;147(6):1147–58.

144. Van Maldegem F, Van Dijk R, Wormhoudt TAM, Kluin PM, Willemze R, Cerroni L, et al. The majority of cutaneous marginal zone B-cell lymphomas expresses class-switched immunoglobulins and develops in a T-helper type 2 inflammatory environment. *Blood*. 2008;112(8):3355–61.
145. Edinger JT, Kant JA, Swerdlow SH. Cutaneous marginal zone lymphomas have distinctive features and include 2 subsets. *Am J Surg Pathol*. 2010;34(12):1830–41.
146. Morales AV, Arber DA, Seo K, Kohler S, Kim YH, Sundram UN. Evaluation of B-cell clonality using the BIOMED-2 PCR method effectively distinguishes cutaneous B-cell lymphoma from benign lymphoid infiltrates. *Am J Dermatopathol*. 2008;30(5):425–30.
147. Ferrara G, Cusano F, Robson A, Stefanato CM. Primary cutaneous marginal zone B-cell lymphoma with anetoderma: spontaneous involution plus de novo clonal expansion. *J Cutan Pathol*. 2011;38(4):342–5.
148. Fujiwara M, Morales AV, Seo K, Kim YH, Arber DA, Sundram UN. Clonal identity and differences in primary cutaneous B-cell lymphoma occurring at different sites or time points in the same patient. *Am J Dermatopathol*. 2013;35(1):11–8.
149. Peñate Y, Hernández-Machín B, Pérez-Méndez LI, Santiago F, Rosales B, Servitje O, et al. Intralesional rituximab in the treatment of indolent primary cutaneous B-cell lymphomas: an epidemiological observational multicentre study. The Spanish Working Group on Cutaneous Lymphoma. *Br J Dermatol*. 2012;167(1):174–9.
150. Senff NJ, Noordijk EM, Kim YH, Bagot M, Berti E, Cerroni L, et al. European Organization for Research and Treatment of Cancer and International Society for Cutaneous Lymphoma consensus recommendations for the management of cutaneous B-cell lymphomas. *Blood*. 2008;112(5):1600–9.

151. Kodama K, Massone C, Chott A, Metze D, Kerl H, Cerroni L. Primary cutaneous large B-cell lymphomas: clinicopathologic features, classification, and prognostic factors in a large series of patients. *Blood*. 2005;106(7):2491-7.
152. Zinzani PL, Quaglino P, Pimpinelli N, Berti E, Baliva G, Rupoli S, et al. Prognostic factors in primary cutaneous B-cell lymphoma: The Italian Study Group for Cutaneous Lymphomas. *J Clin Oncol*. 2006;24(9):1376-82.
153. Cerroni L, Arzberger E, Pütz B, Höfler G, Metze D, Sander CA, et al. Primary cutaneous follicle center cell lymphoma with follicular growth pattern. *Blood*. 2000;95(12):3922-8.
154. Hoefnagel JJ, Vermeer MH, Jansen PM, Fleuren GJ, Meijer CJLM, Willemze R. Bcl-2, Bcl-6 and CD10 expression in cutaneous B-cell lymphoma: further support for a follicle centre cell origin and differential diagnostic significance. *Br J Dermatol*. 2003;149(6):1183-91.
155. Mirza I, Macpherson N, Paproski S, Gascoyne RD, Yang B, Finn WG, et al. Primary cutaneous follicular lymphoma: an assessment of clinical, histopathologic, immunophenotypic, and molecular features. *J Clin Oncol*. 2002;20(3):647-55.
156. Gellrich S, Rutz S, Golembowski S, Jacobs C, Von Zimmermann M, Lorenz P, et al. Primary cutaneous follicle center cell lymphomas and large B cell lymphomas of the leg descend from germinal center cells. A single cell polymerase chain reaction analysis. *J Invest Dermatol*. 2001;117(6):1512-20.
157. Cerroni L, Volkenandt M, Rieger E, Peter Soyer H, Kerl H. Bcl-2 protein expression and correlation with the interchromosomal 14;18 translocation in cutaneous lymphomas and pseudolymphomas. *J Invest Dermatol*. 1994;102(2):231-5.
158. Child FJ, Russell-Jones R, Woolford AJ, Calonje E, Photiou A, Orchard G, et al. Absence of the t(14;18) chromosomal translocation in primary cutaneous B-cell lymphoma. *Br J Dermatol*. 2001;144(4):735-44.

159. Aguilera NS, Tomaszewski MM, Moad JC, Bauer FA, Taubenberger JK, Abbondanzo SL. Cutaneous follicle center lymphoma: a clinicopathologic study of 19 cases. *Mod Pathol*. 2001;14(9):828–35.
160. Pham-Ledard A, Cowppli-Bony A, Doussau A, Prochazkova-Carlotti M, Laharanne E, Jouary T, et al. Diagnostic and prognostic value of BCL2 rearrangement in 53 patients with follicular lymphoma presenting as primary skin lesions. *Am J Clin Pathol*. 2015;143(3):362–73.
161. Kim BK, Surti U, Pandya A, Cohen J, Rabkin MS, Swerdlow SH. Clinicopathologic, immunophenotypic, and molecular cytogenetic fluorescence in situ hybridization analysis of primary and secondary cutaneous follicular lymphomas. *Am J Surg Pathol*. 2005;29(1):69–82.
162. Szablewski V, Ingen-Housz-Oro S, Baia M, Delfau-Larue M-H, Copie-Bergman C, Ortonne N. Primary cutaneous follicle center lymphomas expressing BCL2 protein frequently harbor BCL2 gene break and may present 1p36 deletion: a study of 20 cases. *Am J Surg Pathol*. 2016;40(1):127–36.
163. Lawnicki LC, Weisenburger DD, Aoun P, Chan WC, Wickert RS, Greiner TC. The t(14;18) and bcl-2 expression are present in a subset of primary cutaneous follicular lymphoma: association with lower grade. *Am J Clin Pathol*. 2002;118(5):765–72.
164. Streubel B, Scheucher B, Valencak J, Huber D, Petzelbauer P, Trautinger F, et al. Molecular cytogenetic evidence of t(14;18)(IGH;BCL2) in a substantial proportion of primary cutaneous follicle center lymphomas. *Am J Surg Pathol*. 2006;30(4):529–36.
165. Espinet B, García-Herrera A, Gallardo F, Baró C, Salgado R, Servitje O, et al. FOXP1 molecular cytogenetics and protein expression analyses in primary cutaneous large B cell lymphoma, leg-type. *Histol Histopathol*. 2011;26(2):213–21.

166. Koens L, Vermeer MH, Willemze R, Jansen PM. IgM expression on paraffin sections distinguishes primary cutaneous large B-cell lymphoma, leg type from primary cutaneous follicle center lymphoma. *Am J Surg Pathol.* 2010;34(7):1043-8.
167. Menguy S, Gros A, Pham-Ledard A, Battistella M, Ortonne N, Comoz F, et al. MYD88 somatic mutation is a diagnostic criterion in primary cutaneous large B-cell lymphoma. *J Invest Dermatol.* 2016;136(8):1741-4.
168. Vermeer MH, Geelen FA, van Haselen CW, van Voorst Vader PC, Geerts ML, van Vloten WA, et al. Primary cutaneous large B-cell lymphomas of the legs. A distinct type of cutaneous B-cell lymphoma with an intermediate prognosis. Dutch Cutaneous Lymphoma Working Group. *Arch Dermatol.* 1996;132(11):1304-8.
169. Schrader AMR, Jansen PM, Vermeer MH, Kleiverda JK, Vermaat JSP, Willemze R. High incidence and clinical significance of MYC rearrangements in primary cutaneous diffuse large B-cell lymphoma, leg type. *Am J Surg Pathol.* 2018;42(11):1488-94.
170. Jaffe ES. Navigating the cutaneous B-cell lymphomas: avoiding the rocky shoals. *Mod Pathol.* 2020;33(Suppl 1):96-106.
171. Hoefnagel JJ, Dijkman R, Basso K, Jansen PM, Hallermann C, Willemze R, et al. Distinct types of primary cutaneous large B-cell lymphoma identified by gene expression profiling. *Blood.* 2005;105(9):3671-8.
172. Koens L, Zoutman WH, Ngarmllertsirichai P, Przybylski GK, Grabarczyk P, Vermeer MH, et al. Nuclear factor- $\kappa$ B pathway-activating gene aberrancies in primary cutaneous large B-cell lymphoma, leg type. *J Invest Dermatol.* 2014;134(1):290-2.
173. Pham-Ledard A, Cappellen D, Martinez F, Vergier B, Beylot-Barry M, Merlio J-P. MYD88 somatic mutation is a genetic feature of primary cutaneous diffuse large B-cell lymphoma, leg type. *J Invest Dermatol.* 2012;132(8):2118-20.

174. Pham-Ledard A, Prochazkova-Carlotti M, Andrique L, Cappellen D, Vergier B, Martinez F, et al. Multiple genetic alterations in primary cutaneous large B-cell lymphoma, leg type support a common lymphomagenesis with activated B-cell-like diffuse large B-cell lymphoma. *Mod Pathol.* 2014;27(3):402–11.
175. Ducharme O, Beylot-Barry M, Pham-Ledard A, Bohers E, Viailly PJ, Bandres T, et al. Mutations of the B-cell receptor pathway confer chemoresistance in primary cutaneous diffuse large B-cell lymphoma leg type. *J Invest Dermatol.* 2019;139(11):2334-2342.e8.
176. Grange F, Beylot-Barry M, Courville P, Maubec E, Bagot M, Vergier B, et al. Primary cutaneous diffuse large B-cell lymphoma, leg type: clinicopathologic features and prognostic analysis in 60 cases. *Arch Dermatol.* 2007;143(9):1144–50.
177. Grange F, Joly P, Barbe C, Bagot M, Dalle S, Ingen-Housz-Oro S, et al. Improvement of survival in patients with primary cutaneous diffuse large B-cell lymphoma, leg type, in France. *JAMA Dermatol.* 2014;150(5):535–41.
178. Dijkman R, Tensen CP, Jordanova ES, Knijnenburg J, Hoefnagel JJ, Mulder AA, et al. Array-based comparative genomic hybridization analysis reveals recurrent chromosomal alterations and prognostic parameters in primary cutaneous large B-cell lymphoma. *J Clin Oncol.* 2006;24(2):296–305.
179. Pham-Ledard A, Beylot-Barry M, Barbe C, Leduc M, Petrella T, Vergier B, et al. High frequency and clinical prognostic value of MYD88 L265P mutation in primary cutaneous diffuse large B-cell lymphoma, leg-type. *JAMA Dermatol.* 2014;150(11):1173–9.
180. Senff NJ, Zoutman WH, Vermeer MH, Assaf C, Berti E, Cerroni L, et al. Fine-mapping chromosomal loss at 9p21: correlation with prognosis in primary cutaneous diffuse large B-cell lymphoma, leg type. *J Invest Dermatol.* 2009;129(5):1149–55.

181. Kim YH, Willemze R, Pimpinelli N, Whittaker S, Olsen EA, Ranki A, et al. TNM classification system for primary cutaneous lymphomas other than mycosis fungoides and Sézary syndrome: a proposal of the International Society for Cutaneous Lymphomas (ISCL) and the Cutaneous Lymphoma Task Force of the European Organization of Research and Treatment of Cancer (EORTC). *Blood*. 2007;110(2):479–84.
182. Olsen EA. Evaluation, diagnosis, and staging of cutaneous lymphoma. *Dermatol Clin*. 2015;33(4):643–54.
183. Kempf W, Mitteldorf C. Pathologic diagnosis of cutaneous lymphomas. *Dermatol Clin*. 2015;33(4):655–81.
184. Malachowski SJ, Sun J, Chen PL, Seminario-Vidal L. Diagnosis and management of cutaneous B-cell lymphomas. *Dermatol Clin*. 2019;37(4):443–54.
185. Nicolay JP, Wobser M. Cutaneous B-cell lymphomas - pathogenesis, diagnostic workup, and therapy. *J Dtsch Dermatol Ges*. 2016;14(12):1207–24.
186. Romero-Pérez D, Blanes Martínez M, Encabo-Durán B. Cutaneous pseudolymphomas. *Actas Dermosifiliogr*. 2016;107(8):640–51.
187. Gómez Orbaneja J, Iglesias Diez L, Sánchez Lozano JL, Conde Salazar L. Lymphomatoid contact dermatitis: a syndrome produced by epicutaneous hypersensitivity with clinical features and a histopathologic picture similar to that of mycosis fungoides. *Contact Dermatitis*. 1976;2(3):139–43.
188. Magro CM, Daniels BH, Crowson AN. Drug induced pseudolymphoma. *Semin Diagn Pathol*. 2018;35(4):247–59.
189. Toro JR, Sander CA, LeBoit PE. Persistent pigmented purpuric dermatitis and mycosis fungoides: simulant, precursor, or both? A study by light microscopy and molecular methods. *Am J Dermatopathol*. 1997;19(2):108–18.

190. Citarella L, Massone C, Kerl H, Cerroni L. Lichen sclerosus with histopathologic features simulating early mycosis fungoides. *Am J Dermatopathol.* 2003;25(6):463–5.
191. Petit T, Cribier B, Bagot M, Wechsler J. Inflammatory vitiligo-like macules that simulate hypopigmented mycosis fungoides. *Eur J Dermatol.* 2003;13(4):410–2.
192. Arps DP, Chen S, Fullen DR, Hristov AC. Selected inflammatory imitators of mycosis fungoides: histologic features and utility of ancillary studies. *Arch Pathol Lab Med.* 2014;138(10):1319–27.
193. Ram-Wolff C, Martin-Garcia N, Bensussan A, Bagot M, Ortonne N. Histopathologic diagnosis of lymphomatous versus inflammatory erythroderma: a morphologic and phenotypic study on 47 skin biopsies. *Am J Dermatopathol.* 2010;32(8):755–63.
194. Sentis HJ, Willemze R, Scheffer E. Histopathologic studies in Sézary syndrome and erythrodermic mycosis fungoides: a comparison with benign forms of erythroderma. *J Am Acad Dermatol.* 1986;15(6):1217–26.
195. Çetinözman F, Jansen PM, Willemze R. Expression of programmed death-1 in skin biopsies of benign inflammatory vs. lymphomatous erythroderma. *Br J Dermatol.* 2014;171(3):499–504.
196. Boonk SE, Çetinözman F, Vermeer MH, Jansen PM, Willemze R. Differential expression of TOX by skin-infiltrating T cells in Sézary syndrome and erythrodermic dermatitis. *J Cutan Pathol.* 2015;42(9):604–9.
197. Gniadecki R, Lukowsky A. Monoclonal T-cell dyscrasia of undetermined significance associated with recalcitrant erythroderma. *Arch Dermatol.* 2005;141(3):361–7.
198. Burg G, Dummer R, Kempf W. Dyscrasias with “undetermined significance.” *Arch Dermatol.* 2005;141(3):382–4.



199. Winkelmann RK, Buechner SA, Diaz-Perez JL. Pre-Sézary syndrome. *J Am Acad Dermatol.* 1984;10(6):992-9.
200. Kempf W. CD30+ lymphoproliferative disorders: histopathology, differential diagnosis, new variants, and simulators. *J Cutan Pathol.* 2006;33(Suppl 1):58-70.
201. Gallardo F, Barranco C, Toll A, Pujol RM. CD30 antigen expression in cutaneous inflammatory infiltrates of scabies: a dynamic immunophenotypic pattern that should be distinguished from lymphomatoid papulosis. *J Cutan Pathol.* 2002;29(6):368-73.
202. Kempf W, Kazakov DV, Palmedo G, Fraitag S, Schaerer L, Kutzner H. Pityriasis lichenoides et varioliformis acuta with numerous CD30 + cells: a variant mimicking lymphomatoid papulosis and other cutaneous lymphomas. A clinicopathologic, immunohistochemical, and molecular biological study of 13 cases. *Am J Surg Pathol.* 2012;36(7):1021-9.
203. Theodorou I, Delfau-Larue MH, Bigorgne C, Lahet C, Cochet G, Bagot M, et al. Cutaneous T-cell infiltrates: analysis of T-cell receptor  $\gamma$  gene rearrangement by polymerase chain reaction and denaturing gradient gel electrophoresis. *Blood.* 1995;86(1):305-10.
204. Bakels V, Van Oostveen JW, Van der Putte SCJ, Meijer CJLM, Willemze R. Immunophenotyping and gene rearrangement analysis provide additional criteria to differentiate between cutaneous T-cell lymphomas and pseudo-T-cell lymphomas. *Am J Pathol.* 1997;150(6):1941-9.
205. Flaig MJ, Schuhmann K, Sander CA. Impact of molecular analysis in the diagnosis of cutaneous lymphoid infiltrates. *Semin Cutan Med Surg.* 2000;19(2):87-90.
206. Holm N, Flaig MJ, Yazdi AS, Sander CA. The value of molecular analysis by PCR in the diagnosis of cutaneous lymphocytic infiltrates. *J Cutan Pathol.* 2002;29(8):447-52.

207. Alessi E, Coggi A, Venegoni L, Merlo V, Gianotti R. The usefulness of clonality for the detection of cases clinically and/or histopathologically not recognized as cutaneous T-cell lymphoma. *Br J Dermatol*. 2005;153(2):368-71.
208. Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S. Desarrollo del linfocito y reordenamiento del gen del receptor para el antígeno. En: Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S, editores. *Inmunología celular y molecular*. 9ª ed. Barcelona: Elsevier; 2018. p.179-207.
209. Tonegawa S. Somatic generation of antibody diversity. *Nature*. 1983;302(5909):575-81.
210. Davis MM, Bjorkman PJ. T-cell antigen receptor genes and T-cell recognition. *Nature*. 1988;334(6181):395-402.
211. van Dongen JJM, Langerak AW, Brüggemann M, Evans PAS, Hummel M, Lavender FL, et al. Design and standardization of PCR primers and protocols for detection of clonal immunoglobulin and T-cell receptor gene recombinations in suspect lymphoproliferations: report of the BIOMED-2 Concerted Action BMH4-CT98-3936. *Leukemia*. 2003;17(12):2257-317.
212. IMGT Repertoire (IG and TR) 1. Locus and genes [Internet]. [cited 2020 Apr 30]. Available from: <http://www.imgt.org/IMGTrepertoire/LocusGenes/index.html#G>
213. IMGT Education [Internet]. [cited 2020 May 1]. Available from: <http://www.imgt.org/IMGTeducation/>
214. Lefranc MP. Nomenclature of the human immunoglobulin heavy (IGH) genes. *Exp Clin Immunogenet*. 2001;18(2):100-16.
215. Lefranc MP. Nomenclature of the human immunoglobulin kappa (IGK) genes. *Exp Clin Immunogenet*. 2001;18(3):161-74.

216. LeFranc MP. Nomenclature of the human immunoglobulin lambda (IGL) genes. *Exp Clin Immunogenet.* 2001;18(4):242–54.
217. Lefranc MP, Lefranc G. *The immunoglobulin factsbook.* 1st ed. London: Academic Press; 2001.
218. Lefranc MP, Lefranc G. *The T cell receptor factsbook.* 1st ed. London: Academic Press; 2001.
219. Gallardo F, Bellosillo B, Serrano S, Pujol RM. Genotypic analysis in primary cutaneous lymphomas using the standardized BIOMED-2 polymerase chain reaction protocols. *Actas Dermosifiliogr.* 2008;99(8):608–20.
220. Küppers R, Klein U, Hansmann ML, Rajewsky K. Cellular origin of human B-cell lymphomas. *N Engl J Med.* 1999;341(20):1520–9.
221. Arnold A, Cossman J, Bakhshi A, Jaffe ES, Waldmann TA, Korsmeyer SJ. Immunoglobulin-gene rearrangements as unique clonal markers in human lymphoid neoplasms. *N Engl J Med.* 1983;309(26):1593–9.
222. Bertness V, Kirsch I, Hollis G, Johnson B, Bunn PA. T-cell receptor gene rearrangements as clinical markers of human T-cell lymphomas. *N Engl J Med.* 1985;313(9):534–8.
223. Raess PW, Bagg A. The role of molecular pathology in the diagnosis of cutaneous lymphomas. *Pathol Res Int.* 2012;2012:1–10.
224. Möbs M, Cerroni L, Flaig MJ, Lenze D, Hummel M, Assaf C. Molecular diagnostics in cutaneous lymphomas. *J Dtsch Dermatol Ges.* 2013;11(Suppl 4):25–35.
225. Jeffrey Medeiros L, Carr J. Overview of the role of molecular methods in the diagnosis of malignant lymphomas. *Arch Pathol Lab Med.* 1999;123(12):1189–207.

226. Wood GS, Haeffner A, Dummer R, Crooks CF. Molecular biology techniques for the diagnosis of cutaneous T-cell lymphoma. *Dermatol Clin*. 1994;12(2):231–41.
227. Langerak AW, Groenen PJTA, Brüggemann M, Beldjord K, Bellan C, Bonello L, et al. EuroClonality/BIOMED-2 guidelines for interpretation and reporting of Ig/TCR clonality testing in suspected lymphoproliferations. *Leukemia*. 2012;26(10):2159–71.
228. Sproul AM, Goodlad JR. Clonality testing of cutaneous lymphoid infiltrates: practicalities, pitfalls and potential uses. *J Hematopathol*. 2012;5:69–82.
229. Zhang B, Beck AH, Taube JM, Kohler S, Seo K, Zwerner J, et al. Combined use of PCR-based TCRG and TCRB clonality tests on paraffin-embedded skin tissue in the differential diagnosis of mycosis fungoides and inflammatory dermatoses. *J Mol Diagn*. 2010;12(3):320–7.
230. Felcht M, Booken N, Stroebel P, Goerdts S, Klemke CD. The value of molecular diagnostics in primary cutaneous B-cell lymphomas in the context of clinical findings, histology, and immunohistochemistry. *J Am Acad Dermatol*. 2011;64(1):135–43.
231. Yang H, Xu C, Tang Y, Wan C, Liu W, Wang L. The significance of multiplex PCR/heteroduplex analysis-based TCR- $\gamma$  gene rearrangement combined with laser-capture microdissection in the diagnosis of early mycosis fungoides. *J Cutan Pathol*. 2012;39(3):337–46.
232. Humme D, Lukowsky A, Gierisch M, Haider A, Vandersee S, Assaf C, et al. T-cell receptor gene rearrangement analysis of sequential biopsies in cutaneous T-cell lymphomas with the Biomed-2 PCR reveals transient T-cell clones in addition to the tumor clone. *Exp Dermatol*. 2014;23(7):504–8.
233. Mantaka P, Malecka A, Trøen G, Helsing P, Gjersvik P, Delabie J. Multiple distinct T-cell clones in folliculotropic mycosis fungoides. *Am J Dermatopathol*. 2014;36(12):972–6.

234. Moczko A, Dimitriou F, Kresbach H, Amarov B, Hoetzenecker W, Pascolo S, et al. Sensitivity and specificity of T-cell receptor PCR BIOMED-2 clonality analysis for the diagnosis of cutaneous T-cell lymphoma. *Eur J Dermatol.* 2020;30(1):12–5.
235. Sandberg Y, Heule F, Lam K, Lugtenburg PJ, Wolvers-Tettero ILM, van Dongen JJM, et al. Molecular immunoglobulin/T-cell receptor clonality analysis in cutaneous lymphoproliferations. Experience with the BIOMED-2 standardized polymerase chain reaction protocol. *Haematologica.* 2003;88(6):659–70.
236. Lukowsky A, Marchwat M, Sterry W, Gellrich S. Evaluation of B-cell clonality in archival skin biopsy samples of cutaneous B-cell lymphoma by immunoglobulin heavy chain gene polymerase chain reaction. *Leuk Lymphoma.* 2006;47(3):487–93.
237. Morgan SM, Hodges E, Mitchell TJ, Harris S, Whittaker SJ, Smith JL. Molecular analysis of T-cell receptor  $\beta$  genes in cutaneous T-cell lymphoma reveals J $\beta$ 1 bias. *J Invest Dermatol.* 2006;126(8):1893–9.
238. Thurber SE, Zhang B, Kim YH, Schrijver I, Zehnder J, Kohler S. T-cell clonality analysis in biopsy specimens from two different skin sites shows high specificity in the diagnosis of patients with suggested mycosis fungoides. *J Am Acad Dermatol.* 2007;57(5):782–90.
239. Goedel AL, Cornillet-Lefebvre P, Durlach A, Birembaut P, Bernard P, Nguyen P, et al. T-cell receptor  $\gamma$  gene rearrangement in cutaneous T-cell lymphoma: comparative study of polymerase chain reaction with denaturing gradient gel electrophoresis and GeneScan analysis. *Br J Dermatol.* 2009;162(4):822–9.
240. Humme D, Lukowsky A, Steinhoff M, Beyer M, Walden P, Sterry W, et al. Dominance of nonmalignant T-cell clones and distortion of the TCR repertoire in the peripheral blood of patients with cutaneous CD30+ lymphoproliferative disorders. *J Invest Dermatol.* 2009;129(1):89–98.

241. Lukowsky A, Muche JM, Möbs M, Assaf C, Humme D, Hummel M, et al. Evaluation of T-cell clonality in archival skin biopsy samples of cutaneous T-cell lymphomas using the biomed-2 PCR protocol. *Diagn Mol Pathol*. 2010;19(2):70–7.
242. Sufficool KE, Lockwood CM, Abel HJ, Hagemann IS, Schumacher JA, Kelley TW, et al. T-cell clonality assessment by next-generation sequencing improves detection sensitivity in mycosis fungoides. *J Am Acad Dermatol*. 2015;73(2):228-236.e2.
243. Rea B, Haun P, Emerson R, Vignali M, Farooqi M, Samimi S, et al. Role of high-throughput sequencing in the diagnosis of cutaneous T-cell lymphoma. *J Clin Pathol*. 2018;71(9):814–20.
244. De Masson A, O'Malley JT, Elco CP, Garcia SS, Divito SJ, Lowry EL, et al. High-throughput sequencing of the T cell receptor  $\beta$  gene identifies aggressive early-stage mycosis fungoides. *Sci Transl Med*. 2018;10(440):eaar5894.
245. Wang J, Rea B, Haun P, Emerson R, Kirsch I, Bagg A. High-throughput sequencing of the T-cell receptor  $\beta$  chain gene distinguishes 2 subgroups of cutaneous T-cell lymphoma. *J Am Acad Dermatol*. 2019;80(4):1148-1150.e1.
246. Lukowsky A, Muche JM, Sterry W, Audring H. Detection of expanded T cell clones in skin biopsy samples of patients with lichen sclerosus et atrophicus by T cell receptor- $\gamma$  polymerase chain reaction assays. *J Invest Dermatol*. 2000;115(2):254–9.
247. Magro C, Crowson AN, Kovatich A, Burns F. Pityriasis lichenoides: a clonal T-cell lymphoproliferative disorder. *Hum Pathol*. 2002;33(8):788–95.
248. Nihal M, Mikkola D, Horvath N, Gilliam AC, Stevens SR, Spiro TP, et al. Cutaneous lymphoid hyperplasia: a lymphoproliferative continuum with lymphomatous potential. *Hum Pathol*. 2003;34(6):617–22.

249. Bouloc A, Delfau-Larue MH, Lenormand B, Meunier F, Wechsler J, Thomine E, et al. Polymerase chain reaction analysis of immunoglobulin gene rearrangement in cutaneous lymphoid hyperplasias. *Arch Dermatol.* 1999;135(2):168–72.
250. Guitart J, Magro C. Cutaneous T-cell lymphoid dyscrasia: a unifying term for idiopathic chronic dermatoses with persistent T-cell clones. *Arch Dermatol.* 2007;143(7):921–32.
251. Vandergriff T, Nezafati KA, Susa J, Karai L, Sanguinetti A, Hynan LS, et al. Defining early mycosis fungoides: validation of a diagnostic algorithm proposed by the International Society for Cutaneous Lymphomas. *J Cutan Pathol.* 2015;42(5):318–28.
252. Dippel E, Assaf C, Hummel M, Schrag HJ, Stein H, Goerdts S, et al. Clonal T-cell receptor  $\gamma$ -chain gene rearrangement by PCR-based GeneScan analysis in advanced cutaneous T-cell lymphoma: a critical evaluation. *J Pathol.* 1999;188(2):146–54.
253. Böer A, Tirumalae R, Bresch M, Falk TM. Pseudoclonality in cutaneous pseudolymphomas: a pitfall in interpretation of rearrangement studies. *Br J Dermatol.* 2008;159(2):394–402.
254. Olsen EA, Whittaker S, Kim YH, Duvic M, Prince HM, Lessin SR, et al. Clinical end points and response criteria in mycosis fungoides and Sézary syndrome: a consensus statement of the International Society for Cutaneous Lymphomas, the United States Cutaneous Lymphoma Consortium, and the Cutaneous Lymphoma Task Force of the European Organisation for Research and Treatment of Cancer. *J Clin Oncol.* 2011;29(18):2598–607.
255. Stock C, Hielscher T. Package “DTComPair” Comparison of Binary Diagnostic Tests in a Paired Study Design [Internet]. [cited 2020 Jun 21]. Available from: <https://cran.r-project.org/web/packages/DTComPair/DTComPair.pdf>

256. Landis JR, Koch GG. The measurement of observer agreement for categorical data. *Biometrics*. 1977;33(1):159-74.
257. Beylot-Barry M, Sibaud V, Thiebaut R, Vergier B, Beylot C, Delaunay M, et al. Evidence that an identical T cell clone in skin and peripheral blood lymphocytes is an independent prognostic factor in primary cutaneous T cell lymphomas. *J Invest Dermatol*. 2001;117(4):920-6.
258. Cerroni L. Past, present and future of cutaneous lymphomas. *Semin Diagn Pathol*. 2017;34(1):3-14.
259. Cerroni L. Lymphoproliferative lesions of the skin. *J Clin Pathol*. 2006;59(8):813-26.
260. Volkenandt M, Wienecke R, Tiemann M. Detection of monoclonal lymphoid cell populations by polymerase chain reaction technology. *Dermatol Clin*. 1994;12(2):341-9.
261. Schachter O, Tabibian-Keissar H, Debby A, Segal O, Baum S, Barzilai A. Evaluation of the PCR-based T-cell receptor  $\beta$  clonality test in the diagnosis of early mycosis fungoides. *J Am Acad Dermatol*. 2020;83(5):1400-5.
262. Ponti R, Fierro MT, Quaglino P, Lisa B, di Celle Paola F, Michela O, et al. TCR $\gamma$ -c-hain gene rearrangement by PCR-based GeneScan: diagnostic accuracy improvement and clonal heterogeneity analysis in multiple cutaneous T-cell lymphoma samples. *J Invest Dermatol*. 2008;128(4):1030-8.
263. Blom B, Verschuren MCM, Heemskerk MHM, Bakker AQ, Van Gastel-Mol EJ, Wolvers-Tettero ILM, et al. TCR gene rearrangements and expression of the pre-T cell receptor complex during human T-cell differentiation. *Blood*. 1999;93(9):3033-43.



264. Hayday AC, Saito H, Gillies SD, Kranz DM, Tanigawa G, Eisen HN, et al. Structure, organization, and somatic rearrangement of T cell gamma genes. *Cell*. 1985;40(2):259-69.
265. Kranz DM, Saito H, Heller M, Takagaki Y, Haas W, Eisen HN, et al. Limited diversity of the rearranged T-cell  $\gamma$  gene. *Nature*. 1985;313(6005):752-5.
266. Assaf C, Hummel M, Dippel E, Goerdts S, Müller HH, Anagnostopoulos I, et al. High detection rate of T-cell receptor beta chain rearrangements in T-cell lymphoproliferations by family specific polymerase chain reaction in combination with the GeneScan technique and DNA sequencing. *Blood*. 2000;96(2):640-6.
267. Bachelez H, Bioul L, Flageul B, Baccard M, Moulonguet-Michau I, Verola O, et al. Detection of clonal T-cell receptor  $\gamma$  gene rearrangements with the use of the polymerase chain reaction in cutaneous lesions of mycosis fungoides and Sézary syndrome. *Arch Dermatol*. 1995;131(9):1027-31.
268. Cordel N, Lenormand B, Courville P, Helot MF, Benichou J, Joly P. Usefulness of cutaneous T-cell clonality analysis for the diagnosis of cutaneous T-cell lymphoma in patients with erythroderma. *Arch Pathol Lab Med*. 2005;129(3):372-6.
269. Costa C, Gallardo F, Pujol RM, Espinet B, Bellosillo B, Estrach T, et al. Comparative analysis of TCR- $\gamma$  gene rearrangements by Genescan and polyacrylamide gel-electrophoresis in cutaneous T-cell lymphoma. *Acta Derm Venereol*. 2004;84(1):6-11.
270. Curcó N, Servitje O, Lluçà M, Bertran J, Limón A, Carmona M, et al. Genotypic analysis of cutaneous T-cell lymphoma: a comparative study of Southern blot analysis with polymerase chain reaction amplification of the T-cell receptor-gamma gene. *Br J Dermatol*. 1997;137(5):673-9.
271. Delfau-Larue MH, Laroche L, Wechsler J, Lepage E, Lahet C, Asso-Bonnet M, et al. Diagnostic value of dominant T-cell clones in peripheral blood in 363 patients presenting consecutively with a clinical suspicion of cutaneous lymphoma. *Blood*. 2000;96(9):2987-92.

272. Fierro MT, Ponti R, Titli S, Bonello L, Comessatti A, Novelli M, et al. TCR $\gamma$ -chain gene rearrangement by Genescan: incidence and significance of clonal heterogeneity in Sézary syndrome. *J Invest Dermatol.* 2010;130(9):2312–9.
273. Guitart J, Kaul K. A new polymerase chain reaction-based method for the detection of T-cell clonality in patients with possible cutaneous T-cell lymphoma. *Arch Dermatol.* 1999;135(2):158–62.
274. Kohler S, Jones CD, Warnke RA, Zehnder JL. PCR-heteroduplex analysis of T-cell receptor  $\gamma$  gene rearrangement in paraffin-embedded skin biopsies. *Am J Dermatopathol.* 2000;22(4):321–7.
275. Lukowsky A, Richter S, Dijkstal K, Sterry W, Muche JM. A T-cell receptor  $\gamma$  polymerase chain reaction assay using capillary electrophoresis for the diagnosis of cutaneous T-cell lymphomas. *Diagn Mol Pathol.* 2002;11(2):59–66.
276. Mielke V, Staib G, Boehncke WH, Duller B, Sterry W. Clonal disease in early cutaneous T-cell lymphoma. *Dermatol Clin.* 1994;12(2):351–60.
277. Muche JM, Lukowsky A, Asadullah K, Gellrich S, Sterry W. Demonstration of frequent occurrence of clonal T cells in the peripheral blood of patients with primary cutaneous T-cell lymphoma. *Blood.* 1997;90(4):1636–42.
278. Tok J, Szabolcs MJ, Silvers DN, Zhong J, Matsushima AY. Detection of clonal T-cell receptor  $\gamma$  chain gene rearrangements by polymerase chain reaction and denaturing gradient gel electrophoresis (PCR/DGGE) in archival specimens from patients with early cutaneous T-cell lymphoma: correlation of histologic findings with PCR/DGGE. *J Am Acad Dermatol.* 1998;38(3):453–60.
279. Wood GS, Tung RM, Haeffner AC, Crooks CF, Liao S, Orozco R, et al. Detection of clonal T-cell receptor  $\gamma$  gene rearrangements in early mycosis fungoides/Sézary syndrome by polymerase chain reaction denaturing gradient gel electrophoresis (PCR/DGGE). *J Invest Dermatol.* 1994;103(1):34–41.

- 280.** Delfau-Larue MH, Petrella T, Lahet C, Lebozec C, Bagot M, Roudot-Thoraval F, et al. Value of clonality studies of cutaneous T lymphocytes in the diagnosis and follow-up of patients with mycosis fungoides. *J Pathol.* 1998;184(2):185–90.
- 281.** Delfau-Larue MH, Dalac S, Lepage E, Petrella T, Wechsler J, Farcet JP, et al. Prognostic significance of a polymerase chain reaction-detectable dominant T-lymphocyte clone in cutaneous lesions of patients with mycosis fungoides. *Blood.* 1998;92(9):3376–80.
- 282.** Liebmann RD, Anderson B, McCarthy KP, Chow JWM. The polymerase chain reaction in the diagnosis of early mycosis fungoides. *J Pathol.* 1997;182(3):282–7.
- 283.** Muche JM, Sterry W, Gellrich S, Rzany B, Audring H, Lukowsky A. Peripheral blood T-cell clonality in mycosis fungoides and nonlymphoma controls. *Diagn Mol Pathol.* 2003;12(3):142–50.
- 284.** Vega F, Luthra R, Medeiros LJ, Dunmire V, Lee SJ, Duvic M, et al. Clonal heterogeneity in mycosis fungoides and its relationship to clinical course. *Blood.* 2002;100(9):3369–73.
- 285.** Costa C, Gallardo F, Bellosillo B, Espinet B, Pujol RM, Barranco C, et al. Analysis of T-cell receptor  $\gamma$  gene rearrangements by PCR-Genescan and PCR-polyacrylamide gel electrophoresis in early-stage mycosis fungoides/large-plaque parapsoriasis. *Dermatology.* 2003;207(4):418–9.
- 286.** Klemke CD, Dippel E, Dembinski A, Pnitz N, Assaf C, Hummel M, et al. Clonal T cell receptor  $\gamma$ -chain gene rearrangement by PCR-based GeneScan analysis in the skin and blood of patients with parapsoriasis and early-stage mycosis fungoides. *J Pathol.* 2002;197(3):348–54.
- 287.** Buechner SA, Winkelmann RK. Pre-Sézary erythroderma evolving to Sézary syndrome: a report of seven cases. *Arch Dermatol.* 1983;119(4):285–91.

288. Russell-Jones R, Whittaker S. T-cell receptor gene analysis in the diagnosis of Sézary syndrome. *J Am Acad Dermatol.* 1999;41(2 Pt 1):254–9.
289. Gallardo F, Costa C, Bellosillo B, Solé F, Estrach T, Servitje O, et al. Lymphomatoid papulosis associated with mycosis fungoides: clinicopathological and molecular studies of 12 cases. *Acta Derm Venereol.* 2004;84(6):463–8.
290. Alaibac M, Belloni-Fortina A, Mori M, Pigozzi B, Peserico A, Pimpinelli N. Immunoglobulin heavy chain variable region family expression in primary cutaneous follicle centre cell lymphomas. *Br J Dermatol.* 2001;144(4):862–5.
291. Hughes J, Weston S, Bennetts B, Prasad M, Angulo R, Jaworski R, et al. The application of a PCR technique for the detection of immunoglobulin heavy chain gene rearrangements in fresh or paraffin-embedded skin tissue. *Pathology.* 2001;33(2):222–5.
292. Signoretti S, Murphy M, Puddu P, DeCoteau JF, Faraggiana T, Kadin ME, et al. Clonality of cutaneous B-cell infiltrates determined by microdissection and immunoglobulin gene rearrangement. *Diagn Mol Pathol.* 1999;8(4):176–82.
293. Cerroni L, Signoretti S, Höfler G, Annessi G, Pütz B, Lackinger E, et al. Primary cutaneous marginal zone B-cell lymphoma: a recently described entity of low-grade malignant cutaneous B-cell lymphoma. *Am J Surg Pathol.* 1997;21(11):1307–15.
294. Ritter JH, Wick MR, Adesokan PN, Fitzgibbon JF, Zhu X, Humphrey PA. Assessment of clonality in cutaneous lymphoid infiltrates by polymerase chain reaction analysis of immunoglobulin heavy chain gene rearrangement. *Am J Clin Pathol.* 1997;108(1):60–8.
295. Child FJ, Woolford AJ, Calonje E, Russell-Jones R, Whittaker SJ. Molecular analysis of the immunoglobulin heavy chain gene in the diagnosis of primary cutaneous B cell lymphoma. *J Invest Dermatol.* 2001;117(4):984–9.

296. Perez M, Pacchiarotti A, Frontani M, Pescarmona E, Caprini E, Lombardo GA, et al. Primary cutaneous B-cell lymphoma is associated with somatically hypermuted immunoglobulin variable genes and frequent use of VH1-69 and VH4-59 segments. *Br J Dermatol.* 2010;162(3):611–8.
297. Wood GS, Ngan BY, Tung R, Hoffman TE, Abel EA, Hoppe RT, et al. Clonal rearrangements of immunoglobulin genes and progression to B cell lymphoma in cutaneous lymphoid hyperplasia. *Am J Pathol.* 1989;135(1):13–9.
298. Gallardo F, Pujol R, Bellosillo B, Ferrer D, García M, Barranco C, et al. Primary cutaneous B-cell lymphoma (marginal zone) with prominent T-cell component and aberrant dual (T and B) genotype; diagnostic usefulness of laser-capture microdissection. *Br J Dermatol.* 2006;154(1):162–6.
299. Bignon YJ, Fonck Y, Bernard D, Chassagne J, Ramos F, Chollet P, et al. Clonotypic heterogeneity in cutaneous T-cell lymphomas. *Cancer Res.* 1990;50(20):6620–5.
300. Rübber A, Kempf W, Kadin ME, Zimmermann DR, Burg G. Multilineage progression of genetically unstable tumor subclones in cutaneous T-cell lymphoma. *Exp Dermatol.* 2004;13(8):472–83.
301. Nowell PC. The clonal evolution of tumor cell populations. *Science.* 1976;194(4260):23–8.
302. Jackow CM, Cather JC, Hearne V, Asano AT, Musser JM, Duvic M. Association of erythrodermic cutaneous T-cell lymphoma, superantigen-positive *Staphylococcus aureus*, and oligoclonal T-cell receptor V $\beta$  gene expansion. *Blood.* 1997;89(1):32–40.
303. Weiss LM, Wood GS, Hu E, Abel EA, Hoppe RT, Sklar J. Detection of clonal T-cell receptor gene rearrangements in the peripheral blood of patients with mycosis fungoides/Sézary syndrome. *J Invest Dermatol.* 1989;92(4):601–4.

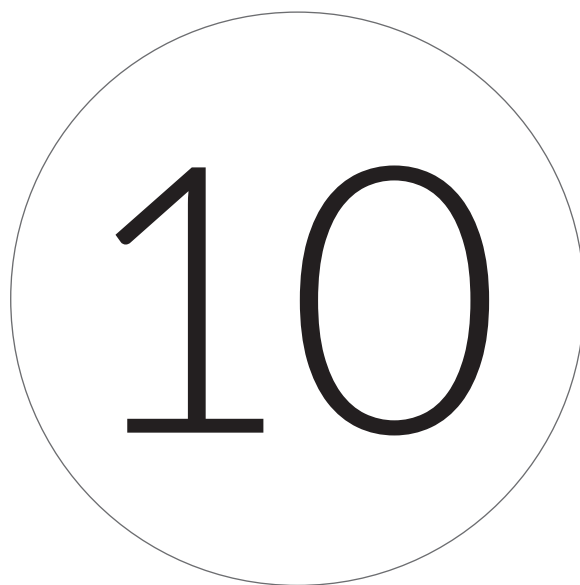
304. Whittaker SJ, Smith NP, Russell Jones R, Luzzatto L. Analysis of  $\beta$ ,  $\gamma$ , and  $\delta$  T-cell receptor genes in mycosis fungoides and Sézary syndrome. *Cancer*. 1991;68(7):1572–82.
305. Bakels V, Van Oostveen JW, Gordijn RLJ, Walboomers JMM, Meijer CJLM, Willemze R. Frequency and prognostic significance of clonal T-cell receptor  $\beta$ -gene rearrangements in the peripheral blood of patients with mycosis fungoides. *Arch Dermatol*. 1992;128(12):1602–7.
306. Fraser-Andrews EA, Woolford AJ, Russell-Jones R, Seed PT, Whittaker SJ. Detection of a peripheral blood T cell clone is an independent prognostic marker in mycosis fungoides. *J Invest Dermatol*. 2000;114(1):117–21.
307. Veelken H, Wood GS, Sklar J. Molecular staging of cutaneous T-cell lymphoma: evidence for systemic involvement in early disease. *J Invest Dermatol*. 1995;104(6):889–94.
308. Posnett DN, Sinha R, Kabak S, Russo C. Clonal populations of T cells in normal elderly humans: the T cell equivalent to “benign monoclonal gammopathy.” *J Exp Med*. 1994;179(2):609–18.
309. Schwab R, Szabo P, Manavalan JS, Weksler ME, Posnett DN, Pannetier C, et al. Expanded CD4+ and CD8+ T cell clones in elderly humans. *J Immunol*. 1997;158(9):4493–9.
310. Asadullah K, Friedrich M, Döcke WD, Jahn S, Volk HD, Sterry W. Enhanced expression of T-cell activation and natural killer cell antigens indicates systemic anti-tumor response in early primary cutaneous T-cell lymphoma. *J Invest Dermatol*. 1997;108(5):743–7.
311. Weng WK, Armstrong R, Arai S, Desmarais C, Hoppe R, Kim YH. Minimal residual disease monitoring with high-throughput sequencing of T cell receptors in cutaneous T cell lymphoma. *Sci Transl Med*. 2013;5(214):214ra171.

312. Alhusayen R, Piguet V. PROCLIPi: a step in the right direction to understand early mycosis fungoides? *Br J Dermatol.* 2019;181(2):231–2.
313. Molloy K, Jonak C, Woei-A-Jin FJSH, Guenova E, Busschots AM, Bervoets A, et al. Characteristics associated with significantly worse quality of life in mycosis fungoides/Sézary syndrome from the Prospective Cutaneous Lymphoma International Prognostic Index (PROCLIPi) study. *Br J Dermatol.* 2020;182(3):770–9.
314. Hodak E, Sherman S, Papadavid E, Bagot M, Querfeld C, Quaglino P, et al. Should we be imaging lymph nodes at initial diagnosis of early-stage mycosis fungoides? Results from the PROCLIPi international study. *Br J Dermatol.* 2020; doi: 10.1111/bjd.19303.
315. Quaglino P, Prince HM, Cowan R, Vermeer M, Papadavid L, Bagot M, et al. Treatment of early-stage mycosis fungoides: results from the PROspective Cutaneous Lymphoma International Study (PROCLIPi study). *Br J Dermatol.* 2020; doi: 10.1111/bjd.19252.









ANNEX



## ANNEX

Taula suplementària 1. Resum de les característiques dels pacients amb altres limfomes cutanis de cèl·lules T

	Altres LCCT indolents (n = 9)	Altres LCCT agressius (n = 9)	Altres LCCT Total (N = 18)
<b>Epidemiologia</b>			
Ràtio (M/F)	0.5 (3/6)	0.5 (3/6)	0.5 (6/12)
Edat al diagnòstic, anys mediana (rang)	45 (25 - 69)	67 (36 - 76)	53.5 (25 - 76)
<b>Clínica</b>			
Duració dels símptomes fins al diagnòstic, mesos mediana (rang)	2.6 (1.3 - 53.1)	14.3 (1.5 - 97.7)	5.5 (1.3 - 97.7)
<b>Resultats a la pell</b>			
Biòpsies de pell suma mediana (rang)	18 1 (1 - 5)	29 3 (1 - 5)	47 2 (1 - 5)
Biòpsies de pell seqüencials suma mediana (rang)	12 0 (0 - 5)	23 3 (0 - 5)	35 2 (0 - 5)
Clonalitat n/N (%)	9/9 (100)	9/9 (100)	18/18 (100)
Duració dels símptomes fins a la primera biòpsia clonal, mesos mediana (rang)	2.6 (1.3 - 49.3)	7.1 (1.5 - 85.2)	4.9 (1.3 - 85.2)
Homogeneïtat clonal n/N (%)	3/4 (75)	8/8 (100)	11/12 (91.7)
Heterogeneïtat clonal n/N (%)	1/4 (25)	0/8 (0)	1/12 (8.3)
<b>Resultats a la sang perifèrica</b>			
Mostres de sang perifèrica suma mediana (rang)	9 1 (0 - 3)	24 2 (1 - 5)	33 1 (0 - 5)
Clonalitat n/N (%)	2/7 (28.6)	8/9 (88.9)	10/16 (62.5)
Clon idèntic pell - sp n/N (%)	0/2 (0)	2/8 (25)	2/10 (20)

Clon diferent pell - sp n/N (%)	2/2 (100)	6/8 (75)	8/10 (80)
<b>Terapèutica</b>			
Teràpies dirigides a la pell suma mediana (rang)	15 1 (1 - 4)	18 2.5 (0 - 4)	33 2 (0 - 4)
Tractaments sistèmics suma mediana (rang)	6 0 (0 - 5)	26 3 (0 - 7)	32 1 (0 - 7)
Resposta global			
RC n (%)	8 (88.9)	0	8 (47.1)
RP n (%)	1 (11.1)	1 (12.5)	2 (11.8)
ORR n (%)	9 (100)	1 (12.5)	10 (58.8)
Estable n (%)	0	1 (12.5)	1 (5.9)
Progressió n (%)	0	4 (50)	4 (23.5)
Recidiva n (%)	0	2 (25)	2 (11.8)
<b>Evolució</b>			
Estat al darrer control			
Viu sense la malaltia n (%)	8 (88.9)	0	8 (47.1)
Viu amb la malaltia n (%)	1 (11.1)	3 (37.5)	4 (23.5)
Mort per la malaltia n (%)	0	5 (62.5)	5 (29.4)
Mort per altres causes n (%)	0	0	0
Temps de seguiment, mesos mediana (rang)	64.8 (6.8 - 198.6)	56.2 (5.6 - 132.6)	57 (5.6 - 198.6)

F, femení; LCCT, limfoma cutani de cèl·lules T; M, masculí; ORR, *objective response rate*; RC, resposta completa; RP, resposta parcial; sp, sang perifèrica.

Taula suplementària 2. Resum de les característiques principals dels casos amb dermatosis no limfomes

	Dermatosis inflamatòries benignes (n = 117)	Eritrodèrmies benignes (n = 8)	Hiperplàsies limfoides cutànies (n = 19)	Dermatosis digitades (n = 31)	Dermatosis no limfomes Total (N = 180)
<b>Epidemiologia</b>					
Ràtio (M/F)	1.6 (72/45)	1 (4/4)	1.1 (10/9)	6.8 (27/4)	1.8 (115/65)
Edat a la primera visita, anys mediana (rang)	62 (0 - 92)	72 (41 - 82)	55 (24 - 83)	63 (28 - 79)	62 (0 - 92)
<b>Resultats a la pell</b>					
Biòpsies de pell suma mediana (rang)	140 1 (1 - 3)	27 3 (1 - 6)	24 1 (1 - 2)	50 1 (1 - 3)	249 1 (1 - 6)
Biòpsies de pell seqüencials suma mediana (rang)	31 0 (0 - 3)	22 3 (0 - 5)	10 0 (0 - 2)	26 0 (0 - 3)	89 0 (0 - 5)
Clonalitat n/N (%)	20/117 (17.1)	4/8 (50) <sup>†</sup>	7/19 (36.8)	4/31 (12.9)	36/180 (20)
Homogeneïtat clonal n/N (%)	1/3 (33.3)	/4	/3	/2	1/12 (8.3) <sup>§</sup>
Heterogeneïtat clonal n/N (%)	/3	/4	/3	/2	/12 <sup>§</sup>
<b>Resultats a la sang perifèrica</b>					
Mostres de sang perifèrica suma mediana (rang)	39 0 (0 - 5)	18 2.5 (0 - 4)	10 1 (0 - 1)	24 0 (0 - 3)	92 0 (0 - 5)
Clonalitat n/N (%)	15/28 (53.6)	5/6 (83.3)	1/10 (10)	9/11 (81.8)	30/56 (53.6)
Clon idèntic pell - sp n/N (%)	1/5 (20)	1/4 (25)	0/1 (0)	0/2 (0)	2/12 (16.7)
Clon diferent pell - sp n/N (%)	4/5 (80)	3/4 (75)	1/1 (100)	2/2 (100)	10/12 (83.3)

Terapèutica					
Resposta global					
RC n (%)	79 (67.5)	4 (50)	18 (94.7)	10 (32.3)	116 (64.4)
RP n (%)	28 (23.9)	2 (25)	1 (5.3)	10 (32.3)	41 (22.8)
ORR n (%)	107 (91.5)	6 (75)	19 (100)	20 (64.5)	157 (87.2)
Estable n (%)	10 (8.6)	1 (12.5)	0	11 (35.5)	22 (12.2)
Progressió n (%)	0	1 (12.5)	0	0	1 (0.6)
Recidiva n (%)	0	0	0	0	0
Evolució					
Estat al darrer control					
Viu sense la malaltia n (%)	64 (54.7)	3 (37.5)	17 (89.5)	9 (29)	97 (53.9)
Viu amb la malaltia n (%)	32 (27.4)	3 (37.5)	1 (5.3)	18 (58.1)	54 (30)
Mort per la malaltia n (%)	0	0	0	0	0
Mort per altres causes n (%)	21 (18)	2 (25)	1 (5.3)	4 (12.9)	29 (16.1)
Temps de seguiment, mesos mediana (rang)	46 (0.5 – 232.1)	44.3 (1.4 – 159.8)	30.3 (2.8 – 172.3)	57.2 (1.9 – 249.1)	45.9 (0.03 – 249.1)

F, femení; M, masculí; ORR, *objective response rate*; RC, resposta completa; RP, resposta parcial; sp, sang perifèrica.

† Algunes biòpsies de pell amb resultat clonal i altres amb resultat policlonal.

§ Dels dotze pacients amb dermatosis no limfomes als qui s'havia realitzat anàlisi genotípica a més d'una biòpsia cutània sincrona de llocs diferents o seqüencial, només es va identificar el mateix clon a un pacient diagnosticat de pitiriasi liquenoide crònica. Els onze pacients restants varen presentar un resultat monoclonal a una de les biòpsies i la resta va ser policlonal.

Les dades en vermell presenten diferències estadísticament significatives ( $p < 0.05$ ).

Taula suplementària 3. Mesures de precisió diagnòstica de les proves IGH (VH-JH), IGH (DH-JH) i IGK als limfomes cutanis primaris de la zona marginal

LCPZM (n = 18) vs. Infiltrats limfoides B cutanis benignes (n = 38)			
	IGH VH FR1-JH	IGH VH FR2-JH	IGH VH FR3-JH
Sensibilitat	61.1 (35.7 – 82.7)	55.6 (30.8 – 78.5)	50.0 (26.0 – 74.0)
Especificitat	97.4 (86.2 – 99.9)	92.1 (78.6 – 98.3)	94.7 (82.3 – 99.4)
VPP	91.7 (61.5 – 99.8)	76.9 (46.2 – 95.0)	81.8 (48.2 – 97.7)
VPN	84.1 (69.9 – 93.4)	81.4 (66.6 – 91.6)	80.0 (65.4 – 90.4)
<u>Tub A FR1 / Tub B FR2</u>		<u>Tub A FR1 / Tub C FR3</u>	<u>Tub B FR2 / Tub C FR3</u>
S p = 1.000 E p = 0.500 VPP p = 0.157 VPN p = 0.597		S p = 0.688 E p = 1.000 VPP p = 0.478 VPN p = 0.373	S p = 1.000 E p = 1.000 VPP p = 0.892 VPN p = 0.662
	IGH (VH-JH) <sup>#</sup>	IGH (VH-JH) + IGK (Vκ-Jκ i Vκ/intron-Kde) <sup>#</sup>	IGH (VH-JH) + IGH (DH-JH) + IGK (Vκ-Jκ i Vκ/ intron-Kde) <sup>#</sup>
Sensibilitat	83.3 (62.2 – 100)	100 (73.5 – 100)	100 (76.8 – 100)
Especificitat	82.4 (64.2 – 100)	70.6 (44.0 – 89.7)	40.9 (20.7 – 63.6)
VPP	76.9 (54.0 – 99.8)	70.6 (44.0 – 89.7)	51.9 (31.9 – 71.3)
VPN	87.5 (71.3 – 100)	100 (73.5 – 100)	100 (66.4 – 100)
<u>IGH (VH-JH)<sup>#</sup> / IGH (VH-JH) + IGK<sup>#</sup></u>		<u>IGH (VH-JH)<sup>#</sup> / IGH (VH-JH) + IGH (DH-JH) + IGK<sup>#</sup></u>	
S p = 0.500 E p = 0.500 VPP p = 0.368 VPN p = 0.158		S p = 0.250 E p = 0.004 VPP p = 0.016 VPN p = 0.084	

E, especificitat; FR, *framework regions*; IGH (DH-JH), reordenaments incomplets del gen de la cadena pesada de les immunoglobulines; IGH (VH-JH), reordenaments complets del gen de la cadena pesada de les immunoglobulines; IGK, cadena lleugera kappa de les immunoglobulines; Kde, *kappa deleting element*; LCPZM, limfoma cutani primari de la zona marginal; S, sensibilitat; VPN, valor predictiu negatiu; VPP, valor predictiu positiu.

Les dades es presenten com a percentatge i interval de confiança del 95%.

Les dades en vermell mostren diferències estadísticament significatives ( $p < 0.05$ ).

<sup>#</sup>Almenys un dels tests (tubs de PCR) positiu.



Taula suplementària 4. Mesures de precisió diagnòstica de les proves IGH (VH-JH), IGH (DH-JH) i IGK als limfomes cutanis primaris centre fol·liculars

LCPCF (n = 12) vs. Infiltrats limfoides B cutanis benignes (n = 38)			
	IGH VH FR1-JH	IGH VH FR2-JH	IGH VH FR3-JH
Sensibilitat	83.3 (51.6 - 97.9)	58.3 (27.7 - 84.8)	33.3 (9.9 - 65.1)
Especificitat	97.4 (86.2 - 99.9)	92.1 (78.6 - 98.3)	94.7 (82.3 - 99.4)
VPP	90.9 (58.7 - 99.8)	70.0 (34.8 - 93.3)	66.7 (22.3 - 95.7)
VPN	94.9 (82.7 - 99.4)	87.5 (73.2 - 95.8)	81.8 (67.3 - 91.8)
<u>Tub A FR1 / Tub B FR2</u>		<u>Tub A FR1 / Tub C FR3</u>	
S p = 0.375 E p = 0.500 VPP p = 0.125 VPN p = 0.161		S p = 0.109 E p = 1.000 VPP p = 0.300 VPN p = 0.055	
		<u>Tub B FR2 / Tub C FR3</u>	
		S p = 0.375 E p = 1.000 VPP p = 0.508 VPN p = 0.185	
	IGH (VH-JH) <sup>#</sup>	IGH (VH-JH) + IGK (Vκ-Jκ i Vκ/intron-Kde) <sup>#</sup>	IGH (VH-JH) + IGH (DH-JH) + IGK (Vκ-Jκ i Vκ/ intron-Kde) <sup>#</sup>
Sensibilitat	100 (73.5 - 100)	100 (63.1 - 100)	100 (71.5 - 100)
Especificitat	82.4 (64.2 - 100)	70.6 (44.0 - 89.7)	40.9 (20.7 - 63.6)
VPP	72.7 (46.4 - 99.0)	61.5 (31.6 - 86.1)	45.8 (25.6 - 67.2)
VPN	100 (89.7 - 100)	100 (73.5 - 100)	100 (66.4 - 100)
<u>IGH (VH-JH)<sup>#</sup> / IGH (VH-JH) + IGK<sup>#</sup></u>		<u>IGH (VH-JH)<sup>#</sup> / IGH (VH-JH) + IGH (DH-JH) + IGK<sup>#</sup></u>	
S p = 1.000 E p = 0.500 VPP p = 0.158 VPN p = 1.000		S p = 1.000 E p = 0.004 VPP p = 0.003 VPN p = 1.000	

E, especificitat; FR, *framework regions*; IGH (DH-JH), reordenaments incomplets del gen de la cadena pesada de les immunoglobulines; IGH (VH-JH), reordenaments complets del gen de la cadena pesada de les immunoglobulines; IGK, cadena lleugera kappa de les immunoglobulines; Kde, *kappa deleting element*; LCPCF, limfoma cutani primari centre fol·licular; S, sensibilitat; VPN, valor predictiu negatiu; VPP, valor predictiu positiu.

Les dades es presenten com a percentatge i interval de confiança del 95%.

Les dades en vermell mostren diferències estadísticament significatives ( $p < 0.05$ ).

<sup>#</sup> Almenys un dels tests (tubs de PCR) positiu.

Taula suplementària 5. Supervivència global i supervivència específica de la malaltia segons els resultats de clonalitat a les biòpsies cutànies i a les mostres de sang perifèrica dels pacients amb limfomes cutanis de cèl·lules T

LCCT (N = 87) Grup	SG			SEM		
	Mediana (anys)	5 anys (%)	10 anys (%)	Mediana (anys)	5 anys (%)	10 anys (%)
A (n = 28) Clon només a la pell		95.8	82		100	85.6
B (n = 44) Clon diferent a la sang perifèrica i a la pell	27.2	89.6	63.1	27.2	89.6	82.7
C (n = 15) Clon idèntic a la sang perifèrica i a la pell	4.6	46.7	35	4.6	50	50

LCCT, limfomes cutanis de cèl·lules T; SEM, supervivència específica de la malaltia; SG, supervivència global.

Taula suplementària 6. Supervivència global i supervivència específica de la malaltia segons els resultats de clonalitat a les biòpsies cutànies i a les mostres de sang perifèrica dels pacients amb micosi fungoide / síndrome de Sézary

MF/SS (N = 64) Grup	SG			SEM		
	Mediana (anys)	5 anys (%)	10 anys (%)	Mediana (anys)	5 anys (%)	10 anys (%)
A (n = 18) Clon només a la pell		100	79.6		100	79.6
B (n = 33) Clon diferent a la sang perifèrica i a la pell	27.2	96.6	65.3	27.2	96.6	87.8
C (n = 13) Clon idèntic a la sang perifèrica i a la pell	6.6	53.9	40.4		58.3	58.3

MF, micosi fungoide; SEM, supervivència específica de la malaltia; SG, supervivència global; SS, síndrome de Sézary.

Taula suplementària 7. Supervivència global i supervivència específica de la malaltia atenent els resultats de clonalitat a les biòpsies cutànies i a les mostres de sang perifèrica dels pacients amb micosi fungoide

MF (N = 55) Grup	SG			SEM		
	Mediana (anys)	5 anys (%)	10 anys (%)	Mediana (anys)	5 anys (%)	10 anys (%)
<b>A (n = 18)</b> Clon només a la pell		100	79.6		100	79.6
<b>B (n = 32)</b> Clon diferent a la sang perifèrica i a la pell	27.2	96.4	68.3	27.2	96.4	91.8
<b>C (n = 5)</b> Clon idèntic a la sang perifèrica i a la pell	35.6	100	75		100	100

MF, micosi fungoide; SEM, supervivència específica de la malaltia; SG, supervivència global.

Taula suplementària 8. Anàlisi univariable de factors amb possible significació pronòstica per a la supervivència global i la supervivència específica de la malaltia

(A) Limfomes cutanis primaris (N = 148)

Variable	ANÀLISI UNIVARIABLE					
	SG			SEM		
	HR	IC 95%	Valor p	HR	IC 95%	Valor p
<b>Gènere</b>						
Masculí	1			1		
Femení	0.9	0.5 – 1.8	0.796	1.5	0.6 – 4.0	0.406
<b>Edat al diagnòstic, anys</b>						
≤ 60	1			1		
> 60	<b>10.1</b>	<b>4.2 – 24.3</b>	<b>0.000</b>	<b>4.6</b>	<b>1.5 – 14.2</b>	<b>0.009</b>
<b>Estadi clínic al diagnòstic<sup>†</sup></b>						
Inicial (IA-IIA)	1			1		
Avançat (IIB-IVB)	<b>3.2</b>	<b>1.4 – 7.4</b>	<b>0.006</b>	<b>13.6</b>	<b>3.5 – 52.4</b>	<b>0.000</b>
<b>Clonalitat*</b>						
Grup A	1			1		
Grup B	2	0.8 – 5.2	0.162	3.2	0.7 – 15.5	0.146
Grup C	<b>6.4</b>	<b>2.2 – 18.4</b>	<b>0.001</b>	<b>13.4</b>	<b>2.7 – 66.1</b>	<b>0.001</b>

<sup>†</sup>n = 76 i \* n = 114.

## (B) Limfomes cutanis de cèl·lules T (N = 113)

Variable	ANÀLISI UNIVARIABLE					
	SG			SEM		
	HR	IC 95%	Valor p	HR	IC 95%	Valor p
<b>Gènere</b>						
Masculí	1			1		
Femení	1.2	0.6 – 2.4	0.675	1.6	0.6 – 4.5	0.349
<b>Edat al diagnòstic, anys</b>						
≤ 60	1			1		
> 60	<b>8.8</b>	<b>3.6 – 21.6</b>	<b>0.000</b>	<b>4.5</b>	<b>1.4 – 14.1</b>	<b>0.010</b>
<b>Estadi clínic al diagnòstic<sup>†</sup></b>						
Inicial (IA-IIA)	1			1		
Avançat (IIB-IVB)	<b>3.2</b>	<b>1.4 – 7.4</b>	<b>0.006</b>	<b>13.6</b>	<b>3.5 – 52.4</b>	<b>0.000</b>
<b>Clonalitat*</b>						
Grup A	1			1		
Grup B	1.6	0.5 – 4.8	0.435	1.8	0.4 – 8.8	0.458
Grup C	<b>4.8</b>	<b>1.5 – 15.8</b>	<b>0.010</b>	<b>6.7</b>	<b>1.4 – 32.9</b>	<b>0.019</b>

<sup>†</sup>n = 76 i \*n = 86.

## (C) Micosi fungoide i síndrome de Sézary (N = 76)

Variable	ANÀLISI UNIVARIABLE					
	SG			SEM		
	HR	IC 95%	Valor p	HR	IC 95%	Valor p
<b>Gènere</b>						
Masculí	1			1		
Femení	1.4	0.6 – 3.2	0.441	1.5	0.4 – 5.4	0.516
<b>Edat al diagnòstic, anys</b>						
≤ 60	1			1		
> 60	<b>10.5</b>	<b>3.5 – 31.4</b>	<b>0.000</b>	<b>6.2</b>	<b>1.3 – 29.5</b>	<b>0.021</b>
<b>Estadi clínic al diagnòstic</b>						
Inicial (IA-IIA)	1			1		
Avançat (IIB-IVB)	<b>3.2</b>	<b>1.4 – 7.4</b>	<b>0.006</b>	<b>13.6</b>	<b>3.5 – 52.4</b>	<b>0.000</b>
<b>Clonalitat*</b>						
Grup A	1			1		
Grup B	1.2	0.3 – 4.3	0.816	0.8	0.2 – 4.6	0.840
Grup C	3.5	0.9 – 13.9	0.074	3.5	0.6 – 18.7	0.146

\*n = 64.

## (D) Micosi fungoide (N = 66)

Variable	ANÀLISI UNIVARIABLE					
	SG			SEM		
	HR	IC 95%	Valor p	HR	IC 95%	Valor p
<b>Gènere</b>						
Masculí	1					
Femení	1	0.3 - 2.8	0.985			
<b>Edat al diagnòstic, anys</b>						
≤ 60	1			1		
> 60	<b>8</b>	<b>2.5 - 25.2</b>	<b>0.000</b>	1.9	0.3 - 13.7	0.511
<b>Estadi clínic al diagnòstic</b>						
Inicial (IA-IIA)	1			1		
Avançat (IIB-IVB)	0.8	0.2 - 3.6	0.749	3.8	0.5 - 27.0	0.178
<b>Clonalitat*</b>						
Grup A	1			1		
Grup B	0.9	0.2 - 3.3	0.850	0.4	0.1 - 3.1	0.402
Grup C	0.4	0.0 - 4.8	0.501			

\* n = 55. Grup A, clon només a la pell; Grup B, clon diferent a la sang perifèrica i a la pell; Grup C, clon idèntic a la sang perifèrica i a la pell; HR, *hazard ratio*; IC 95%, interval de confiança del 95%; SEM, supervivència específica de la malaltia; SG, supervivència global. Les dades en vermell presenten diferències estadísticament significatives (p < 0.05).

Taula suplementària 9. Resum dels resultats de clonalitat a les biòpsies cutànies de LCCT i d'infiltrats limfoides T benignes mitjançant l'anàlisi per PCR

Referència	LCCT	Mostra	Protocol PCR	Sensibilitat n/N (%)	Especificitat n/N (%)
Schachter <i>et al.</i> (2020) (261)	MF estadi inicial	P	BIOMED-2 + AFF	TCRG: 13/30 (43) TCRB: 25/30 (83) TCRG + TCRB: 26/30 (87)	TCRG: 11/11 (100) TCRB: 11/11 (100) TCRG + TCRB: 11/11 (100)
Moczko <i>et al.</i> (2020) (234)	LCCT		BIOMED-2 + AFF	TCR (pic x 3): 116/169 (69) TCR (pic x 5): 101/169 (60)	TCR: 94/123 (76) TCR: 103/123 (84)
Rea <i>et al.</i> (2018) (243)	LCCT		NO BIOMED-2 + AFF	TCRG: 18/25 (72)	TCRG: 22/25 (88)
Kirsch <i>et al.</i> (2015) (16)	MF / SS	C o P	BIOMED-2 + AFF	TCRG: 27/39 (69)	
Sufficool <i>et al.</i> (2015) (242)	MF	P	BIOMED-2 + AFF	TCRG: 15/34 (44)	
De la Garza <i>et al.</i> (2015) (72)	PL + MF	P	NO BIOMED-2 + AFF BIOMED-2 + AFF	TCRG + TCRB: 10/11 (91)	
Mantaka <i>et al.</i> (2014) (233)	MFF	C o P	BIOMED-2 + AFF	TCRG: 8/8 (100) TCRB: 8/8 (100)	
Humme <i>et al.</i> (2014) (232)	LCCT	P	BIOMED-2 + AFF	TCRG: 25/28 (89) TCRB: 27/28 (96) TCRG + TCRB: 27/28 (96)	
Yang <i>et al.</i> (2012) (231)	MF estadi inicial	P	BIOMED-2 + AH NO BIOMED-2 + AH	TCRG: 3/7 (43) TCRG: 5/7 (71)	TCRG: 9/9 (100) TCRG: 9/9 (100)

Lukowsky <i>et al.</i> (2010) (241)	LCCT	P	BIOMED-2 + AFF	TCRG: 68/84 (81) TCRB: 62/80 (78) TCRG + TCRB: 73/84 (87)	TCRG: 15/15 (100) TCRB: 13/15 (87) TCRG + TCRB: 13/15 (87)
Zhang <i>et al.</i> (2010) (229)	MF	P	BIOMED-2 + AFF	TCRG: 44/69 (64) TCRB: 44/69 (64) TCRG + TCRB: 54/69 (78)	TCRG: 111/133 (83) TCRB: 111/133 (83) TCRG + TCRB: 98/133 (74)
Goedel <i>et al.</i> (2010) (239)	LCCT	C	BIOMED-2 + AFF	TCRG: 59/77 (77)	TCRG: 69/80 (86)
			NO BIOMED-2 + DGGE	TCRG: 57/77 (74)	TCRG: 69/80 (86)
Fierro <i>et al.</i> (2010) (272)	SS	C	NO BIOMED-2 + AFF	TCRG: 24/24 (100)	
Humme <i>et al.</i> (2009) (240)	LTCD30+	P	BIOMED-2 + AFF	TCRG: 23/28 (82)	TCRG: 10/10 (100)
Rodríguez Pinilla <i>et al.</i> (2009) (116)	TLPCP de cèl·lules CD4+ petites / mitjanes	P	BIOMED-2	TCRG + TCRB: 14/16 (88)	
Kong <i>et al.</i> (2008) (88)	LCCT subcutani similar a panniculitis	P	BIOMED-2 + AFF	TCRG: 10/15 (67) TCRB: 12/15 (80) TCRG + TCRB: 15/15 (100)	
Massone <i>et al.</i> (2008) (13)	MF estadi inicial	P	NO BIOMED-2 + AGGE	TCRG: 36/67 (54)	
García - Herrera <i>et al.</i> (2008) (114)	TLPCP de cèl·lules CD4+ petites / mitjanes	P	BIOMED-2 + AFF	TCRG: 11/17 (65) TCRB: 11/17 (65) TCRG + TCRB: 15/17 (88)	
Ponti <i>et al.</i> (2008) (262)	MF/SS	C	NO BIOMED-2 + AFF	TCRG: 180/203 (89)	TCRG: 58/58 (100)
			NO BIOMED-2 + AH	TCRG: 147/203 (72)	TCRG: 55/58 (95)

Thurber <i>et al.</i> (2007) (238)	MF	P	BIOMED-2 + AFF	TCRG: 19/23 (83)	TCRG: 22/23 (96)
Greisser <i>et al.</i> (2006) (69)	LTCD30+	P	NO BIOMED-2 + AFF	TCRG: 15/35 (43)	TCRG: 20/20 (100)
Morgan <i>et al.</i> (2006) (237)	MF / SS	F i P	BIOMED-2 + AFF	TCRG: 17/20 (85) TCRB: 15/20 (75) TCRG + TCRB: 18/20 (90)	
Ponti <i>et al.</i> (2005) (14)	MF / SS	C	NO BIOMED-2 + AH	TCRG: 162/194 (84)	TCRG: 345/353 (98)
Alessi <i>et al.</i> (2005) (207)	MF	C	NO BIOMED-2 + AH	TCRG: 18/36 (50)	TCRG: 76/80 (95)
Cordel <i>et al.</i> (2005) (268)	LCCT	C	NO BIOMED-2 + DGGE	TCRG: 48/61 (79)	TCRG: 68/79 (86)
Costa <i>et al.</i> (2004) (269)	LCCT	C i P	NO BIOMED-2 + AFF	TCRG: 17/25 (68)	TCRG: 7/7 (100)
			NO BIOMED-2 + AGGE	TCRG: 14/25 (56)	TCRG: 7/7 (100)
			NO BIOMED-2 + PAGE	TCRG: 17/25 (68)	TCRG: 7/7 (100)
Sandberg <i>et al.</i> (2003) (235)	LCCT	C	BIOMED-2 + AFF	TCRG: 18/25 (72) TCRB: 16/25 (64)	TCRG: 11/12 (92) TCRB: 11/12 (92)
			BIOMED-2 + AH	TCRG: 16/25 (64) TCRB: 15/25 (60)	TCRG: 11/12 (92) TCRB: 11/12 (92)
Costa <i>et al.</i> (2003) (285)	MF estadi inicial		NO BIOMED-2 + AFF	TCRG: 5/7 (71)	TCRG: 8/9 (89)
			NO BIOMED-2 + PAGE	TCRG: 3/7 (43)	TCRG: 8/9 (89)
Muche <i>et al.</i> (2003) (283)	MF	P	NO BIOMED-2 + AFF	TCRG: 47/64 (73)	



Vega <i>et al.</i> (2002) (284)	MF	P	NO BIOMED-2 + AFF	TCRG: 36/39 (92)	TCRG: 4/4 (100)
Klemke <i>et al.</i> (2002) (286)	MF estadi inicial	P	NO BIOMED-2 + AFF	TCRG: 8/12 (67)	TCRG: 21/26 (81)
Lukowsky <i>et al.</i> (2002) (275)	LCCT	P	NO BIOMED-2 + AFF	TCRG: 46/55 (84)	TCRG: 32/35 (91)
			NO BIOMED-2 + TGGE	TCRG: 45/55 (82)	TCRG: 33/35 (94)
Beylot - Barry <i>et al.</i> (2001) (257)	LCCT	C	NO BIOMED-2 + DGGE	TCRG: 59/85 (69)	
Delfau - Larue <i>et al.</i> (2000) (271)	LCCT	C	NO BIOMED-2 + DGGE	TCRG: 106/152 (70)	TCRG: 55/72 (76)
Kohler <i>et al.</i> (2000) (274)	LCCT	P	NO BIOMED-2 + AH	TCRG: 37/51 (73)	TCRG: 29/29 (100)
Assaf <i>et al.</i> (2000) (266)	MF estadi avançat / SS	C i P	NO BIOMED-2 + AFF	TCRG: 17/23 (74) TCRB: 23/23 (100)	TCRG: 12/12 (100) TCRB: 12/12 (100)
Dippel <i>et al.</i> (1999) (252)	MF estadi avançat / SS	P	NO BIOMED-2 + AFF	TCRG: 16/21 (76)	TCRG: 21/21 (100)
Guitart <i>et al.</i> (1999) (273)	LCCT	C	NO BIOMED-2 + SSCP	TCRG: 19/26 (73)	TCRG: 15/17 (88)
Delfau - Larue <i>et al.</i> (1998) (281)	MF	C	NO BIOMED-2 + DGGE	TCRG: 42/68 (62)	
Tok <i>et al.</i> (1998) (278)	LCCT	P	NO BIOMED-2 + DGGE	TCRG: 24/33 (73)	TCRG: 14/16 (88)
Delfau - Larue <i>et al.</i> (1998) (280)	MF	C	NO BIOMED-2 + DGGE	TCRG: 36/61 (59)	TCRG: 40/40 (100)
Curcó <i>et al.</i> (1997) (270)	LCCT	C	NO BIOMED-2 + PAGE	TCRG: 26/32 (81)	TCRG: 9/10 (90)

Muche <i>et al.</i> (1997) (277)	LCCT	P	NO BIOMED-2 + TGGE	TCRG: 46/58 (79)	TCRG: 40/40 (100)
Liebmann <i>et al.</i> (1997) (282)	MF estadi inicial	P	NO BIOMED-2 + PAGE	TCRG + TCRB: 18/23 (78)	TCRG + TCRB: 6/6 (100)
Bakels <i>et al.</i> (1997) (204)	LCCT	C	NO BIOMED-2 + DGGE	TCRG: 15/17 (88)	TCRG: 10/10 (100)
Bachelez <i>et al.</i> (1995) (267)	MF / SS	C	NO BIOMED-2 + PAGE	TCRG: 37/51 (73)	TCRG: 29/29 (100)
Theodorou <i>et al.</i> (1995) (203)	LCCT	C	NO BIOMED-2 + DGGE	TCRG: 62/94 (66)	TCRG: 49/53 (92)
Wood <i>et al.</i> (1994) (279)	MF / SS	C	NO BIOMED-2 + DGGE	TCRG: 61/68 (90)	TCRG: 99/105 (94)
Mielke <i>et al.</i> (1994) (276)	LCCT	P	NO BIOMED-2 + TGGE	TCRG: 47/69 (68)	TCRG: 109/116 (94)

AFF, anàlisi de fragments fluorescents; AGGE, electroforesi en gel d'agarosa; AH, anàlisi d'heterodúplex; C, congelat; DGGE, electroforesi en gel de gradient desnaturalitzant; F, fresc; LCCT, limfomes cutanis de cèl·lules T; LTCD30+, trastorns limfoproliferatius de cèl·lules T CD30+ cutanis primaris; MF, micosi fungoide; MFF, micosi fungoide folliculotropa; P, parafina; PAGE, electroforesi en gel de poliàcrilamida; PCR, reacció en cadena de la polimerasa; PL, papulosi limfomatoide; SS, síndrome de Sézary; SSCP, anàlisi de polimorfismes conformationals de cadena simple; TCRB, cadena beta del receptor de la cèl·lula T; TCRG, cadena gamma del receptor de la cèl·lula T; TGGE, electroforesi en gel de gradient de temperatura; TLPCP, trastorn limfoproliferatiu cutani primari.

Taula suplementària 10. Resum dels resultats de clonalitat a les biòpsies cutànies de LCCB i d'infiltrats limfoides B benignes mitjançant l'anàlisi per PCR

Referència	LCCB	Mostra	Protocol PCR	Sensibilitat n/N (%)	Especificitat n/N (%)
Schafernak <i>et al.</i> (2014) (140)	LCPZM, LCPCF i LCPDCBG, TC	P i C	BIOMED-2 + AFF	8/30 (27)	11/12 (92)
Fujiwara <i>et al.</i> (2013) (148)	LCPZM i LCPCF	P	BIOMED-2 + AFF	18/20 (90) IGK: 13/20 (65) IGH + IGK: 19/20 (95)	10/12 (83) IGK: 12/12 (100) IGH + IGK: 10/12 (83)
Felcht <i>et al.</i> (2011) (230)	LCPZM, LCPCF i LCPDCBG, TC	P	BIOMED-2 + AFF	10/17 (59) IGH (DH-JH): 8/17 (47) IGK: 10/10 (100) Σ: 16/17 (94)	9/9 (100) IGH (DH-JH): 9/9 (100) IGK: 7/9 (78) Σ: 7/9 (78)
Morales <i>et al.</i> (2008) (146)	LCPZM i LCPCF	P	BIOMED-2 + AFF	18/26 (69) IGK: 17/26 (65) IGH + IGK: 22/26 (85)	22/23 (96) IGK: 23/23 (100) IGH + IGK: 22/23 (96)
Lukowsky <i>et al.</i> (2006) (236)	LCPZM, LCPCF i LCPDCBG, TC	P	BIOMED-2 + AFF	24/43 (56)	
			NO BIOMED-2 + AFF	25/43 (58)	17/19 (89)
Sandberg <i>et al.</i> (2003) (235)	LCPZM, LCPCF i LCPDCBG, TC	C	BIOMED-2 + AFF	6/7 (86)	4/4 (100)
			BIOMED-2 + AH	6/7 (86)	4/4 (100)
Servitje <i>et al.</i> (2002) (143)	LCPZM	P i C	NO BIOMED-2 + PAGE	14/22 (64)	
Child <i>et al.</i> (2001) (295)	LCCB	C	NO BIOMED-2 + PAGE	31/39 (79)	6/6 (100)
Alaibac <i>et al.</i> (2001) (290)	LCPCF	C	NO BIOMED-2 + AGGE	11/15 (73)	

Hughes <i>et al.</i> (2001) (291)	LCCB	P i C	NO BIOMED-2 + PAGE	22/31 (71)	14/19 (74)
Cerroni <i>et al.</i> (2000) (153)	LCPCF	P	NO BIOMED-2 + GE	9/15 (60)	4/4 (100)
Signoretti <i>et al.</i> (1999) (292)	LCPZM i LCPCF	P	NO BIOMED-2 + PAGE	7/10 (70)	8/9 (89)
Bouloc <i>et al.</i> (1999) (249)	LCCB	C	NO BIOMED-2 + PAGE	35/53 (66)	23/24 (96)
Cerroni <i>et al.</i> (1997) (293)	LCPZM	P	NO BIOMED-2 + AGGE	21/29 (72)	
Ritter <i>et al.</i> (1997) (294)	LCCB	P	NO BIOMED-2 + PAGE	12/35 (34)	

AFF, anàlisi de fragments fluorescents; AGGE, electroforesi en gel d'agarosa; AH, anàlisi d'heterodúplex; C, congelat; GE, electroforesi en gel; IGH, cadena pesada de les immunoglobulines; IGH (DH-JH), reordenaments incomplets del gen de la cadena pesada de les immunoglobulines; IGK, cadena lleugera kappa de les immunoglobulines; LCCB, limfomes cutanis de cèl·lules B; LCPCF, limfoma cutani primari centre fol·licular; LCPDCBG, TC, limfoma cutani primari difús de cèl·lules B grans, tipus cama; LCPZM, limfoma cutani primari de la zona marginal; P, parafina; PAGE, electroforesi en gel de poliacrilamida; PCR, reacció en cadena de la polimerasa;  $\Sigma$ , reordenaments complets i incomplets del gen de la cadena pesada de les immunoglobulines + reordenaments del gen de la cadena lleugera kappa.

Totes les dades de sensibilitat i d'especificitat corresponen a l'anàlisi d'IGH, tret que, s'indiqui una altra prova.

**Taula suplementària 11. Correlació dels patrons de clonalitat i l'evolució clínica als pacients amb micosi fungoide i biòpsies cutànies múltiples (seqüencials o síncrones)**

	No progressió	Progressió #	Total
TCR idèntic	22	7	29
TCR diferent	7	1	8
Total	29	8	37

TCR, receptor de la cèl·lula T. # Inclou els casos amb progressió de la malaltia o recidiva segons les definicions de resposta publicades per E. Olsen *et al.*(254)

Test exacte de Fisher = 0.656.

**Figura suplementària 1. Supervivència global dels pacients diagnosticats de limfoma cutani de cèl·lules T atenent l'estatus clonal a la pell i a la sang perifèrica**

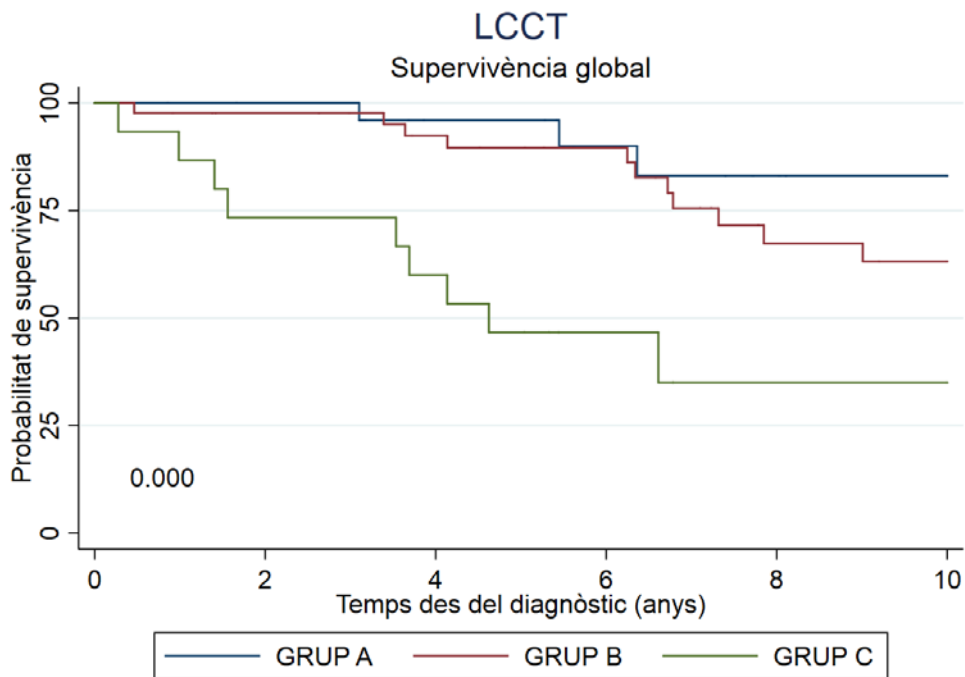


Figura suplementària 2. Supervivència global dels pacients diagnosticats de micosi fungoide / síndrome de Sézary atenent l'estatus clonal a la pell i a la sang perifèrica

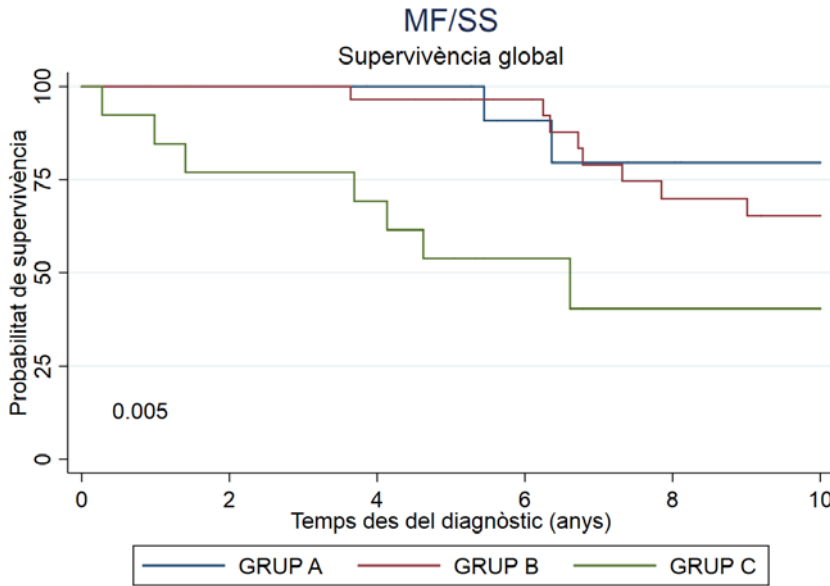
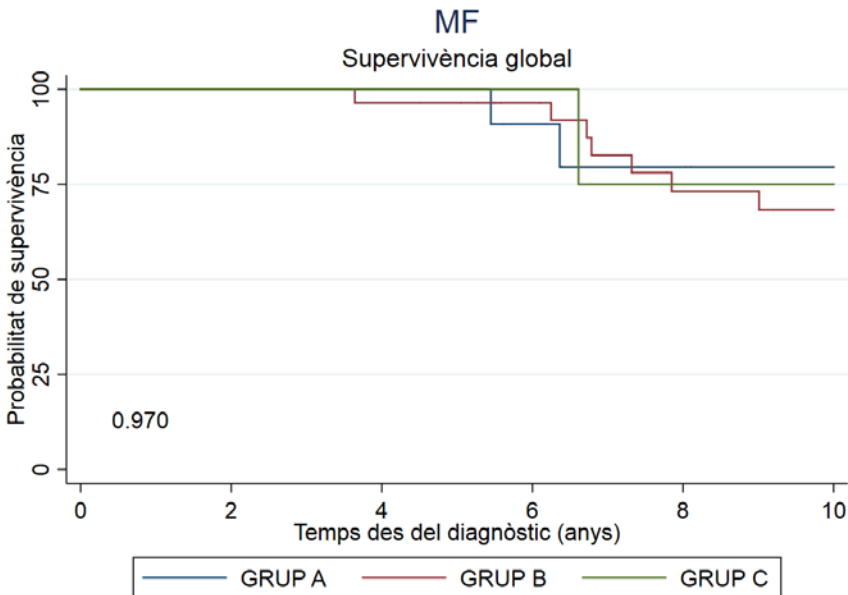


Figura suplementària 3. Supervivència global dels pacients diagnosticats de micosi fungoide en funció de l'estatus clonal a la pell i a la sang perifèrica



GRUP A, clon només a la pell; GRUP B, clon diferent a la sang perifèrica i a la pell; GRUP C, clon idèntic a la sang perifèrica i a la pell.









**Universitat Autònoma  
de Barcelona**

Programa de Doctorat en Medicina  
Departament de Medicina