



UNIVERSITÀ POLITECNICA DELLE MARCHE

**Dottorato di Ricerca in Salute dell'uomo
Ciclo XVI**

Clinica di Dermatologia e Venereologia

Aspetti biomolecolari dei linfomi cutanei

**Relatore: Chiar.ma
*Prof.ssa Annamaria Offidani***

**Tesi di:
*Dott.ssa Katia Giuliodori***

A.A. 2016- 2017

Ai miei figli...

INDICE

CAPITOLO 1: LINFOMI CUTANEI.....	1
1.1 - Introduzione	1
1.2 – Epidemiologia e patogenesi.....	2
1.2.1 – Cellula d’origine	4
1.2.2 – Immunopatogenesi.....	8
1.2.3 – Patogenesi molecolare	11
1.3 - Classificazione	14
1.4 – Micosi fungoide.....	18
1.5 – Sindrome di Sézary.....	29
1.6 – Terapia.....	33
CAPITOLO 2: CELLULE ENDOTELIALI PROGENITRICI.....	47
2.1 – Introduzione.....	47
2.2 – Identificazione e caratterizzazione delle cellule endoteliali progenitrici	51
2.3 – Alterazioni angiogenetiche nei linfomi cutaneiT	58
CAPITOLO 3: MICRORNA.....	61
3.1 – Introduzione.....	61

3.2 – Formazione e processamento dei microRNA	62
3.3 – Relazione tra microRNA e linfomi cutanei T.....	68
STUDIO SPERIMENTALE.....	71
Obiettivo dello studio	71
Materiali e metodi.....	72
Risultati.....	84
Discussione.....	87
Conclusioni.....	93
BIBLIOGRAFIA	95

CAPITOLO 1: LINFOMI CUTANEI

1.1 - INTRODUZIONE

I linfomi cutanei rappresentano un notevole gruppo nell'ambito delle patologie linfoproliferative e, tra i linfomi extranodali, sono al secondo posto, per ordine di frequenza, dopo quelli del tratto gastroenterico, costituendo circa il 7% di tutti i linfomi.

Con il termine di linfoma primitivo cutaneo (CPL) si intende una proliferazione monoclonale di cellule linfoide a primitiva insorgenza cutanea.^{1,2}

Circa il 75% dei (CPL) mostrano un fenotipo caratteristico a cellule T, mentre meno del 25 % sono linfomi a cellule B.

Queste forme di linfoma hanno un'incidenza variabile a seconda della posizione geografica e dell'origine etnica della popolazione: in Asia, in alcuni stati degli USA e nel bacino del Mar dei Caraibi, infatti, risultano più diffusi alcuni linfomi a cellule T in relazione alla diffusione endemica del virus oncotrasformante HTLV-1.³

Il primo a parlare di linfomi fu Jean-Louis Alibert (1768-1837) che nel 1814 descrisse una strana alterazione della cute, paragonata a un fungo simil tumorale, che descrisse in dettaglio sotto il nome di "Micosi Fungoide" nel 1832.

Nonostante Alibert diede un nome alla patologia, potrebbe essere un errore affermare che egli fu il primo a descrivere il linfoma cutaneo in quanto, a quel

tempo, l'eziologia dell'alterazione era completamente sconosciuta. La prima relazione tra la Micosi Fungoide e il sistema linfoide venne intuata nel 1869, mediante gli studi microscopici di Xavier Gillot e Louis Antoine Ranvier (1835-1922) a Parigi. I due studiosi chiarirono che la Micosi Fungoide era causata dalla rigenerazione del tessuto linfoide nella cute e la considerarono come la manifestazione cutanea di un linfoma, alla quale diedero in nome di "linfadenite cutanea".

Nel 1876 Bazin e collaboratori definirono i tre stadi della malattia (chiazze, placche e noduli).

Infine furono Lutzner e collaboratori che nel 1975 introdussero il termine linfomi cutanei a cellule T (CTCL) per descrivere un gruppo di linfomi maligni con primaria manifestazione cutanea.

1.2 - EPIDEMIOLOGIA E PATOGENESI

L'European Organization for Research and Treatment of Cancer (EORTC) e la World Health Organization (WHO) hanno pubblicato una classificazione per i linfomi cutanei nel 2005.¹ Al contrario dei linfomi non-Hodgkin linfonodali che sono per la maggior parte derivati da cellule B, circa il 75% dei linfomi cutanei primitivi sono derivati da cellule T, due terzi dei quali classificati come micosi fungoide (MF) e sindrome di Sézary. (SS).¹⁻⁵ L'incidenza dei linfomi

cutanei T (CTCL) è aumentata ed è attualmente pari a 6.4 per milione di abitanti, in base ai dati registrati dalla Surveillance Epidemiology and End Results (SEER), con la più alta incidenza tra i maschi e gli Afro-Americani.⁴ L'incidenza dei CTCL aumenta significativamente con l'età, con una mediana alla diagnosi di circa 50 anni e un aumento di incidenza di 4 volte in pazienti sopra i 70 anni.^{4,6}

Gli studi epidemiologici non hanno identificato fattori di rischio ambientali o virali associate ai principali sottotipi di CTCL, con l'eccezione dell'infezione di HTLV-1 nelle leucemie/linfomi a cellule T dell'adulto.⁷ Recenti studi hanno comunque suggerito che i farmaci possono indurre una linfoproliferazione o un discrasia delle cellule T guidate dall'antigene.^{8,9} Un recente lavoro ha esaminato un gruppo di pazienti con MF ipertesi in terapia con idroclorotiazide che sono stati confrontati con pazienti affetti da MF, ipertesi che non usavano idroclorotiazide: questi ultimi avevano più probabilità di avere una malattia di stadio I e avevano meno probabilità di avere un riarrangiamento clonale del gene TCR.⁹

Ancora più importante, in un sottoinsieme di questi pazienti, è stata osservata una risposta completa o parziale alla sospensione dell'idroclorotiazide. In tre pazienti, il CTCL si è ripresentato dopo aver reintrodotta l'idroclorotiazide, e successivamente è andato in remissione con la sua sospensione. Mentre questi

risultati potrebbero essere interpretati come una reazione a farmaco, in particolare uno pseudolinfoma indotto da farmaci, gli autori di questo studio suppongono che l'idroclorotiazide possa essere associata a linfoproliferazione delle cellule T indotta dall'antigene e potrebbe servire da trigger per la MF. Inoltre, poichè una varietà di altri farmaci può innescare una reazione che imita la MF, in questi pazienti dovrebbero essere eseguiti un'attenta anamnesi farmacologica, eliminando qualsiasi farmaco sospetto. Anche le caratteristiche genetiche individuali sono implicate nello sviluppo dei CTCL. I rari casi di MF familiare e la rilevazione di specifici alleli HLA classe II in associazione con casi di MF sporadici e familiari suggeriscono che i fattori genetici dell'ospite possono contribuire allo sviluppo della MF.¹⁰⁻¹² Mentre il ruolo dei fattori genetici e ambientali nella patogenesi della CTCL non è ancora chiaro, sono stati realizzati importanti studi sull'ontogenesi della malattia, sulla patogenesi molecolare e sulla disfunzione immunitaria associata alla malattia.¹³⁻¹⁶

1.2.1 – Cellula d'origine

Le cellule T naive, quando incontrano antigeni nei linfonodi drenanti dalla cute, esprimono inducibilmente l'antigene linfocitario cutaneo (CLA) che lega la E-selectina e i recettori delle chemochine (ad es. CCR4, CCR8, CCR10) necessari per il loro successivo reclutamento a livello cutaneo.¹⁷⁻¹⁹ L'espansione clonale

delle cellule T attivate è seguita dalla loro differenziazione in più sottoinsiemi di cellule effettrici e di memoria. Le cellule di memoria centrale (TCM) mantengono la capacità di accedere al sangue periferico e ai linfonodi. Le cellule di memoria effettrici (TEM), al contrario, migrano in siti extranodali, compresa la cute, dove rimarrà un sottogruppo, come cellule di memoria residenti nel tessuto (TRM). La maggior parte delle cellule T nella cute sono TRM^{17,20}, esprimono un recettore di antigene ad alta affinità²¹ e hanno un profilo distinto di espressione genica²². Le cellule T clonali nella MF sono comunemente TRM derivate, spiegando così la loro tendenza a restare confinate alla cute²³. Gli studi di immunofenotipo dimostrano che le cellule T maligne in pazienti con varianti CTCL leucemiche (SS e MF con coinvolgimento secondario leucemico) esprimono CCR7 e L-selectina, in maniera simile alle TCM²⁴. Questa differenza fondamentale nella cellula di origine presunta tra SS (derivata da TCM) e MF (derivata da TRM) è coerente con il loro comportamento clinico distinto, in quanto la TCM si può trovare sia nel sangue periferico, nel linfonodo e nella cute e sono cellule di lunga vita resistenti all'apoptosi, mentre le cellule TRM in sospensione non riescono a circolare nel sangue periferico, rimanendo fisse nella cute²⁴.

Inoltre è stata descritta a livello cutaneo una popolazione di re-circolazione di cellule T di memoria migratoria CCR7 + L-selettivo (TMM). Pertanto, un

sottogruppo di pazienti con MF che mostrano un interessamento secondario leucemico, con coinvolgimento dermico più significativo e linfadenopatia dermatopatica, possono presentare un clone derivato da TMM²⁰. La tesi secondo cui i sottotipi MF e SS provengono da differenti sottogruppi di cellule T è coerente con l'ibridazione genomica comparativa (CGH) e i dati del profilo dell'espressione genica che dimostrano che questi sottotipi CTCL sono geneticamente distinti ^{25,26}. Le cellule T regolatorie (Treg) che esprimono il fattore di trascrizione FoxP3 sono importanti per mantenere la tolleranza verso il self e formare un sottogruppo minore di cellule T residenti a livello cutaneo. Heid e collaboratori hanno dimostrato che le cellule T maligne in un sottogruppo di pazienti con Sézary possono essere derivate da cellule Treg, in quanto il clone maligno in questi pazienti non solo ha espresso FoxP3 e sopprime le cellule T convenzionali, ma possiede un promotore FoxP3 demetilato ²⁷. Rimangono incertezze sul fatto che un sottogruppo di pazienti con Sézary abbia un clone derivato da cellule di Treg residenziali o se queste cellule acquisiscano in modo aberrante un fenotipo Treg durante l'evoluzione della malattia ²⁸. Ad esempio, le cellule dendritiche immature, che sono prevalenti nel CTCL ²⁹, possono aumentare l'espressione di FoxP3 nelle cellule T maligne ³⁰. Pertanto, un sottogruppo di pazienti con SS sembra avere un clone derivato da Treg (o "Treg-like"), anche se le implicazioni prognostiche e

terapeutiche di questa osservazione devono ancora essere chiarite. Contrariamente alle cellule T regolatorie, che rappresentano una minoranza di cellule T residenti cutanee, la maggior parte delle cellule T nella cute produce citochine caratterizzate da sotto-settori differenti di effettori T, compresi Th1, Th2 e Th17. Questa eterogeneità delle cellule T effettive aumenta la possibilità che gli studi futuri possano sub-classificare i CTCL in base a questi sottogruppi di cellule T^{31,32}. È interessante notare che la MF / SS è legata all'espressione di geni associati a Th2 (ad es. GATA-3) e alla produzione di citochine associate alla Th2 (ad es. IL-4, IL-5, IL-13), aumentando la possibilità che un significativo sottoinsieme dei pazienti possa avere cloni derivanti da Th2³³⁻³⁷. In alternativa, mutazioni ricorrenti che attivano percorsi di segnalazione specifici (ad es. NFAT, NFκB, JAK / STAT) possono promuovere l'acquisizione di un particolare fenotipo indipendente dalla cellula d'origine³⁸. La differenziazione delle cellule T è associata a notevole plasticità. Pertanto, il fenotipo di cellule T maligne può essere sia eterogeneo sia altamente dipendente dai segnali che provengono dall'interno del microambiente^{30, 39, 40}. Poiché il paesaggio genetico e la cellula di origine presunta sono ulteriormente definiti in sottoinsiemi di CTCL, incluso MF / SS, si può prevedere che questi dati possano avere un impatto significativo sulla classificazione, stratificazione dei rischi e trattamento di queste malattie.

1.2.2 – Immunopatogenesi

La creazione di linee cellulari a lunga sopravvivenza derivate dai CTCL è impegnativa, poiché queste cellule vanno incontro spesso a morte spontanea durante la cultura in vitro ^{41, 42}. Pertanto, la resistenza all'apoptosi osservata in vivo è improbabile che sia dovuta solo ad una resistenza intrinseca all'apoptosi. Piuttosto, sono i fattori estrinseci presenti all'interno del microambiente del tumore che possono contribuire alla crescita e alla sopravvivenza delle cellule T maligne, dati sostenuti dall'osservazione che l'integrazione citochinica o l'aggiunta di segnali co-stimolatori delle cellule T supporta la crescita delle cellule T maligne in vitro. ^{41,43,44} Sia il profilo dell'espressione genica sia gli studi immunoistochimici hanno recentemente evidenziato l'importante contributo delle cellule non maligne, compresi i macrofagi, nella patogenesi dei linfomi Hodgkin e non Hodgkin. ⁴⁵⁻⁴⁷ Allo stesso modo, le cellule T maligne cutanee sono frequentemente associate a cellule dendritiche e studi su base immunoistochimica hanno chiaramente dimostrato un'abbondanza di macrofagi e cellule dendritiche associati a linfomi, molti dei quali possono essere attivamente reclutati nel microambiente del tumore da chemochine derivate dal tumore. ^{29,48}

Queste cellule derivate da monociti promuovono direttamente la tumorigenesi, attraverso la produzione di fattori che promuovono la crescita e la sopravvivenza delle cellule tumorali, e indirettamente, sostenendo l'angiogenesi tumorale e sopprimendo l'immunità anti-tumorale dell'ospite.⁴⁹

Ad esempio, si è dimostrato che le cellule dendritiche derivate dai monociti possono sostenere la sopravvivenza a lungo termine delle cellule T maligne durante la cultura in vitro.⁴² Più recentemente, si è dimostrato che i monociti del sangue periferico (e la loro progenie) sono in grado di sostenere la crescita delle cellule T maligne in vitro, conferire resistenza alla chemioterapia e promuovere l'attecchimento tumorale nei topi immunodeficienti.²⁹

L'IL-10 linfoma-derivata, che è sovra-espressa in pazienti con malattia in stadio avanzato e refrattaria alle terapie⁵⁰, compromette la maturazione delle cellule dendritiche associate al linfoma, rendendole immunologicamente incompetenti, promuovendone così la fuga dalla sorveglianza immunitaria antitumorale. Inoltre, le cellule dendritiche associate ai linfomi esprimono il ligando B7-H1 co-inibitorio della cellula T (PD-L1, CD274), che inibisce direttamente la proliferazione delle cellule T-tumore-specifiche e indirettamente compromette l'immunità tumorale promuovendo l'induzione di cellule T regolatorie soppressive⁵¹. Pertanto, i macrofagi associati ai linfomi e le cellule dendritiche sembrano svolgere un ruolo importante nella linfoma-

genesi cutanea delle cellule T e contribuiscono all'evasione e alla soppressione dell'immunità anti-tumorale dell'ospite.

Oltre al ruolo del microambiente tumorale, l'ampia disfunzione dell'immunità cellulare - il macro-ambiente tumorale - è da tempo apprezzata nei CTCL e contribuisce alla significativa morbilità e mortalità associata a complicanze infettive osservate nei CTCL. Circa il 50% dei pazienti con CTCL, in particolare quelli con malattia avanzata, muore alla fine per complicanze infettive ⁵²⁻⁵⁴. Nel CTCL si possono osservare sia i difetti quantitativi sia qualitativi della cellula killer (NK) ^{55,56}, della cellula dendritica ⁵⁷ e dell'immunità cellulare mediata dalle cellule T. ⁵⁸⁻⁶⁰ Inoltre, il CTCL è associato ad una significativa perdita di cellule T di repertorio, analogo a quello osservato nell'infezione da HIV. In seguito ad analisi quantitative della regione beta-variabile del recettore delle cellule T (TCR) con citometria a flusso, si è osservato che nei pazienti con malattia avanzata e nella metà dei pazienti con malattia limitata, si ha una drammatica perdita di diversità del TCR. ⁶¹ Poiché la linfopenia è un fattore prognostico avverso in molte malattie ematologiche ⁶²⁻⁶⁷ e contribuisce indubbiamente alle complicanze infettive osservate nel CTCL, una migliore comprensione del meccanismo causale che porta a questa drammatica perdita di diversità delle cellule T può avere significative implicazioni terapeutiche.

1.2.3 – Patogenesi molecolare

Le traslocazioni cromosomiche ricorrenti che coinvolgono il gene IgH nel cromosoma 14 portano all'espressione aberrante di proteine anti-apoptotiche (ad es. Bcl-2) e oncogenetiche (ad es. CiclinD1, Myc) nei linfomi a cellule B.

Ad eccezione delle traslocazioni che coinvolgono il gene del fattore di regolazione interferone 4 (IRF4) (noto anche come MUM1) presenti in un sottogruppo di linfomi cutanei anaplastici a grandi cellule, le traslocazioni cromosomiche ricorrenti sono raramente osservate nei CTCL.⁶⁸⁻⁶⁹⁻⁷⁰⁻⁷⁴

Nonostante questo, un certo numero di vie che regolano la progressione e la sopravvivenza del ciclo cellulare sono state implicate nella patogenesi dei CTCL. La famiglia di fattori di trascrizione NF-kB (cioè c-rel, p65 / RelA, RelB, p50 / p105, p52 / p100) svolge un ruolo importante nello sviluppo normale delle linfociti, nell'attivazione e nella differenziazione attraverso la regolazione dei geni bersaglio coinvolti nella crescita cellulare, la sopravvivenza e la produzione di citochine. Vari meccanismi, ben descritti nei linfomi a cellule B, portano all'attivazione costitutiva di NF-kB, promuovendo la linfoma-genesi.⁷⁵ In modo simile, NF-kB è attivata costantemente nei CTCL.⁷⁶⁻⁷⁸ L'analisi immunohistochimica dei casi di MF ha dimostrato la localizzazione nucleare di p65 / RelA in oltre il 90% dei casi esaminati.⁷⁶

Inoltre, l'inibizione farmacologica di NF-kB nelle linee cellulari CTCL diminuisce l'attività di legame del DNA di NF-kB, promuovendo così la morte cellulare.⁷⁶⁻⁷⁹ Mentre i meccanismi molecolari che portano all'attivazione costitutiva di NF-kB nei CTCL sono poco compresi, l'osservazione che l'inibizione IKK down-regola l'attività di NF-kB implica gli elementi di attivazione IKK a monte.^{77, 78} I trasduttori di segnale e gli attivatori della trascrizione (STATs) sono una famiglia di sei fattori di trascrizione che diventano fosforilati da una delle quattro Janus chinasi (JAKs) associate al recettore a monte dopo la stimolazione della citocina. La localizzazione nucleare e il legame del DNA di STAT3 fosforilato sono stati dimostrati nei CTCL.^{80,81} Dopo la traslocazione nucleare, STAT3 regola direttamente un certo numero di geni bersaglio nei CTCL, tra cui quelli regolatori dell'apoptosi (ad esempio Bcl-2 / Bax), citochine (ad esempio IL-5, IL-13) e soppressori di segnalazione di citochine (ad esempio SOCS). Inoltre, STAT3 regola indirettamente l'espressione genica inducendo l'espressione di DNA metiltransferasi 1 (DNMT1), che promuove il silenziamento epigenetico dei geni del soppressore tumorale.⁸² Non sorprende quindi che l'inibizione farmacologica di STAT3 favorisca l'apoptosi nei CTCL.^{80,83-85} I meccanismi citogenetici che coinvolgono STAT5A e STAT5B o la loro attivazione in risposta alle citochine presenti all'interno del microambiente del tumore

suggeriscono un ruolo patogeno per altri STAT.^{40, 86-88} Le cellule T normali subiscono un processo controllato di morte cellulare dopo attivazione e proliferazione dipendente dall'antigene, mantenendo così l'omeostasi linfocitaria. I recettori di morte estrinseci, inclusi Fas (CD95), svolgono un ruolo importante nella regolazione di questo processo. Un certo numero di meccanismi, tra cui la metilazione del promotore,⁸⁹⁻⁹¹ le mutazioni del gene⁹² e la perdita del braccio lungo del cromosoma 10,⁹³ determinano una diminuzione dell'espressione di Fas in CTCL e una sensibilità ridotta all'apoptosi. Inoltre, la metilazione del promotore e l'instabilità epigenetica che conduce all'inattivazione di molti geni tumor soppressori, compresi quelli coinvolti nell'induzione dell'apoptosi, sembrano essere comunemente meccanismi coinvolti nella linfoma-genesi dei CTCL.⁹⁴ In aggiunta ai multipli difetti nell'apoptosi, è spesso osservata nei CTCL la regolazione aberrante del ciclo cellulare, compresa l'inattivazione del loco CDKN2A-CDKN2B.^{95,96} Sono state descritte anche l'up-regolazione del ciclo, compreso il ciclinD1 e la perdita di RB1.⁹⁷ Con l'avvento delle tecnologie sequenziali di ultima generazione e dello studio dei profili di espressione genica, sono stati identificati in un sottogruppo di CTCL ulteriori percorsi patogeni, compresi quelli che coinvolgono fattori di trascrizione che regolano la differenziazione delle cellule T,^{36,37} c-MYC,^{98, 99} RAS / RAF / MEK.^{100, 93, 101} Ad esempio, la

mutazione di funzione (S345F) nel gene della fosfolipasi C, gamma 1 (PLCG1) è stata recentemente osservata nel 19% dei casi di CTCL.³⁸ Questa mutazione è stata associata all'attivazione di NFAT e suggerisce che gli inibitori della calcineurina possono essere un approccio terapeutico razionale in questi pazienti.

1.3 - CLASSIFICAZIONE

I CPL sono singolarmente descritti nella classificazione unificata della WHO/EORTC del 2005 che nasce dalla revisione delle 2 precedenti classificazioni redatte rispettivamente dalla EORTC (Organizzazione Europea per la Ricerca e il Trattamento del Cancro) nel 1997 e poi dalla WHO (World Health Organization) nel 2001, sulla base dell'integrazione di dati clinici, istologici, immunofenotipici e genotipici. Questa classificazione ha una rilevanza clinica e prognostica e delinea in modo netto i CPL dalle corrispettive forme nodali.^{1,102}

Peculiare in questa nuova classificazione è l'intento di descrivere entità di linfoma rare ed eterogenee, che presentano specifici pattern immunoistochimici e molecolari, con conseguenti implicazioni dal punto di vista diagnostico e terapeutico.

Nel 2008 è stata pubblicata una nuova classificazione della WHO (2008, 4th edition) che rappresenta un aggiornamento delle entità precedentemente descritte; ognuna di esse viene singolarmente riconosciuta ed integrata in una classificazione generale dei linfomi nodali ed extranodali con piccole modifiche nella terminologia (tabella 1).¹⁰³

I CPL vengono distinti in linfomi cutanei a cellule T (CTCL), linfomi cutanei a cellule B (CBCL) e le cosiddette “neoplasie dei precursori emopoietici”, come la neoplasia ematodermica CD4+/CD56+ (linfoma blastico a cellule NK, ora denominato neoplasia blastica delle cellule dendritiche plasmocitoidi-BPDCN).

I CTCL rappresentano il 65% dei PCL e sono costituiti per il 90% dalle entità più conosciute, la micosi fungoide, la sindrome di Sezary e le malattie linfoproliferative primitive cutanee CD30+.

Altre entità rare erano state precedentemente definite nella classificazione della WHO, come il linfoma subcutaneo simil-panniculitico a cellule T (SPTL) e il linfoma primitivo cutaneo a cellule T γ/δ .

Queste due forme rare di linfoma sono fra loro indipendenti; studi recenti hanno confermato che per linfoma T subcutaneo simil-panniculitico si intende una forma di linfoma cutaneo con fenotipo TCR α/β (β -F1+) a decorso clinico

indolente, mentre il fenotipo γ/δ caratterizza il linfoma cutaneo T γ/δ che ha un comportamento molto aggressivo, simile al linfoma NK/T γ/δ .¹⁰⁴

Inoltre nel gruppo dei CTCL, vengono riconosciute singolarmente entità come il linfoma extranodale NK/T, nasal type, e la neoplasia ematodermica CD4+/CD56+.

I linfomi periferici T “unspecified” (PTCL/NOS, non otherwise specified; NAS, non altrimenti specificabili), già così definiti dalla WHO, rappresentano un gruppo non specifico di linfomi non suddivisibili in ulteriori sottogruppi in base alla morfologia, al fenotipo e alle tradizionali indagini molecolari. Includono il linfoma primitivo cutaneo a cellule T CD8+ citotossico aggressivo epidermotropo, il linfoma primitivo cutaneo a cellule T γ/δ e il linfoma primitivo cutaneo a piccole e medie cellule T CD4+ ma studi contemporanei hanno confermato che tali entità dovrebbero essere considerate delle entità provvisorie e separate dal gruppo dei PTCL/NOS, come viene riconosciuto dall’ultima classificazione della WHO.^{103,104}

Il gruppo dei CBCLs riconosce il linfoma primitivo cutaneo del centro follicolare come entità distinta, costituito da uno spettro di malattia che include casi con pattern di crescita follicolare, follicolare e diffuso, e diffuso, e il linfoma primitivo cutaneo diffuso a grandi cellule B, leg type, che comprende

quadri clinici coinvolgenti non solo le gambe ma anche altre sedi corporee. A questo gruppo viene affiancato anche il linfoma primitivo cutaneo a grandi cellule B (PBLBCL) “others”, che include rari casi di linfoma a grandi cellule B che non rientrano nella definizione di linfoma primitivo cutaneo a grandi cellule B, leg type.

Classificazione dei linfomi cutanei WHO/EORTC	Classificazione dei tessuti linfoidei WHO – linfomi cutanei (ICD-O Code)
Linfomi cutanei a cellule T e NK - Micosi fungoide (MF) - MF varianti e sottotipi MF follicolare Reticulosi pagetoide Granulomatous slack skin - Sindrome di Sezary - Leucemia/linfoma a cellule T dell'adulto (ATLL) - Disordini linfoproliferativi primitivi cutanei CD30+ Linfoma primitivo cutaneo anaplastico a grandi cellule (C-ALCL) Papulosi linfomatoide - Linfoma subcutaneo simil-panniculitico a cellule T (SPTL) - Linfoma extranodale a cellule T/NK, nasal type - Linfoma primitivo cutaneo a cellule T periferiche, “unspecified” Linfoma primitivo cutaneo a cellule T CD8+ aggressivo epidermotropo (provvisorio) Linfoma primitivo cutaneo a cellule T _/_ (provvisorio) Linfoma primitivo cutaneo a piccole e medie cellule T CD4+ pleomorfo (provvisorio)	Neoplasie a cellule T e NK mature - Micosi fungoide (MF) - MF varianti e sottotipi MF follicolare Reticulosi pagetoide Granulomatous slack skin - Sindrome di Sezary - Leucemia/linfoma a cellule T dell'adulto - Disordini linfoproliferativi primitivi cutanei CD30+ Linfoma primitivo cutaneo anaplastico a grandi cellule Papulosi linfomatoide - Linfoma subcutaneo simil-panniculitico a cellule T (fenotipo TCR a/b) - Linfoma extranodale a cellule T/NK, nasal type - Linfoma primitivo cutaneo a cellule T periferiche, sottotipi rari Linfoma primitivo cutaneo a cellule T CD8+ aggressivo epidermotropo (provvisorio) Linfoma primitivo cutaneo a cellule T _/_ (provvisorio) Linfoma primitivo cutaneo a piccole e medie cellule T CD4+ pleomorfo (provvisorio)
Linfomi cutanei a cellule B - Linfoma primitivo cutaneo a cellule B della zona marginale - Linfoma primitivo cutaneo del centro follicolare - Linfoma primitivo cutaneo diffuso a grandi cellule B, leg type - Linfoma primitivo cutaneo diffuso a grandi cellule B, altri - Linfoma primitivo cutaneo a grandi cellule B intravascolare	Neoplasie a cellule B mature - Linfoma extranodale della zona marginale dei tessuti linfoidei associati alla mucosa (MALT) - Linfoma primitivo cutaneo del centro follicolare - Linfoma primitivo cutaneo diffuso a grandi cellule B, leg type - Linfoma diffuso a grandi cellule B, NOS - Linfoma primitivo cutaneo a grandi cellule B intravascolare
Neoplasie dei precursori ematopoietici - Neoplasia ematodermica CD4+/CD56+ (linfoma blastico a cellule NK)	Neoplasie dei precursori - Neoplasia a cellule blastiche dendritiche plasmocitoidi

Tabella 1 Classificazione WHO/EORTC dei linfomi primitivi cutanei

1.4 - Micosi Fungoide

La Micosi Fungoide (MF) è il più frequente tipo tra tutti i linfomi cutanei a cellule T: ne rappresenta circa il 50%.

Colpisce preferenzialmente adulti ed anziani (età media 50 anni; rapporto M/F 2:1), sono descritti anche casi pediatrici e del giovane adulto.¹⁰⁵

Nella sua forma "classica" la MF è caratterizzata da tre stadi progressivi, rispettivamente stadio in chiazza (I), stadio in placca (II) e stadio tumorale (III), con o senza eritrodermia.

Tipica della MF è una storia naturale protratta, di solito associata ad una clinica relativamente indolente. Nello *stadio I* i pazienti si presentano con chiazze (dimensioni tra 1 e 5 cm) eritematose, non rilevate né infiltrate di solito localizzate in zone protette dall'esposizione solare come i glutei, la zona pubica, i fianchi, la parte bassa dell'addome, il petto e la superficie interna degli arti. Mentre è rara la localizzazione in zone foto-esposte come il viso e il dorso delle mani. Le chiazze possono diventare atrofiche e presentare teleangectasie e pigmentazione: in questo caso si usa il nome di poichilodermia. Un altro tipo di forma di MF a chiazza è quello ipopigmentato che colpisce in prevalenza soggetti di pelle scura e in età più giovanile rispetto alla classica MF a chiazze. Le lesioni si possono presentare come macule, chiazze o sottili placche localizzate prevalentemente al tronco. Vanno poste in diagnosi differenziale con la vitiligine e la tinea versicolor. Di solito tutte le lesioni della MF a chiazze sono asintomatiche o moderatamente pruriginose anche se alcuni pazienti possono riferire marcato prurito. Nello *stadio II* le chiazze divengono infiltrate,

palpabili e con margini rilevati (placca); spesso i pazienti mostrano contemporaneamente entrambe le lesioni (chiazze e placche), con distribuzione asimmetrica, in aree diverse o contigue. Le sedi più colpite sono glutei, tronco, inguine, ascelle e la regione mammaria anche se ogni area del corpo può essere colpita. Le lesioni sono generalmente asintomatiche o moderatamente pruriginose sebbene si possa anche presentare un prurito molto severo. Nello *stadio III*, la fase più avanzata della malattia, i pazienti possono presentare una serie combinata di lesioni che, oltre a chiazze e placche, comprendono noduli/tumori, spesso ulcerati e soggetti a complicanze settiche. Le lesioni tumorali possono insorgere "de novo" o progredire da preesistenti lesioni in placca. Di solito è presente un eritema diffuso associato a intenso prurito difficile da controllare e dolore per fissurazioni palmari. La differenza con la sindrome di Sézary dipende dal coinvolgimento o meno della componente ematologica. Il decorso della MF è di solito lungo, ma l'esatta cronologia della progressione tra le varie fasi della malattia non è prevedibile. Lo stadio tumorale si accompagna a viraggio in termini di maggiore aggressività della malattia, caratterizzato da un alto rischio di disseminazione extracutanea con interessamento dei corrispondenti linfonodi loco-regionali e quindi di organi a distanza.

L'istologia della MF varia a seconda dello stadio, e la diagnosi delle forme precoci rimane una delle maggiori sfide per gli anatomo-patologi.

Istologicamente la popolazione linfomatosa della MF è costituita da linfociti T con nuclei ipercromatici, convoluti (cerebriformi) e variabile tendenza epidermotropa. Nella gran parte dei casi esiste una buona corrispondenza fra stadio clinico lesionale e caratteristiche istopatologiche dell'infiltrato linfomatoso.¹⁰⁶

Nello *stadio I (in chiazza)* l'infiltrato, quantitativamente modesto, interessa il derma superficiale. Per molti anni le lesioni che successivamente saranno riconosciute come sede di malattia, presentano caratteristiche di aspecificità e, nella maggioranza dei casi, viene posta la diagnosi di eczema o psoriasi. Il periodo che intercorre tra la comparsa della lesione sulla cute e la definizione diagnostica di linfoma a cellule T è di 4-10 anni con una media di 6 anni. Le eruzioni sono tipicamente transitorie e possono ricomparire dopo una remissione spontanea sia nei siti già interessati che in quelli sani.

Nello *stadio II (in placca)* l'infiltrato diviene più denso; oltre ai linfociti sono presenti sparsi eosinofili, alcune plasmacellule ed istiociti. Citologicamente le cellule neoplastiche possono essere della stessa misura o più grandi dei normali piccoli linfociti. Esse spesso presentano scarso citoplasma con nuclei ipercromatici e di forma irregolare. L'architettura è quella di un infiltrato

polimorfo disposto a banda nel derma superficiale composto da istiociti, eosinofili, normali cellule linfoidi, plasmacellule e numero variabile di cellule CTCL. L'epidermide è generalmente infiltrata da cellule singole o da piccoli gruppi di cellule mononucleate circondate da un alone chiaro, detto microascesso di Pautrier.

Clinicamente si evidenziano chiazze eritemato-squamose e placche infiltrate di forma ovale o circolare con margini serpiginosi ben delimitati, generalmente a forma discoide. Le manifestazioni cutanee dapprima presentano fasi alterne di riacutizzazione e remissione clinica, quindi tendono ad acquisire caratteri di fissità aumentando gradualmente di dimensioni, coinvolgendo nuove aree cutanee ed infiltrandole maggiormente. La coalescenza di lesioni adiacenti forma lesioni estese che conferiscono un aspetto a carta geografica. Le lesioni tendono ad essere di colore uniforme, partendo da un eritema sino a un colore violaceo. Occasionalmente le lesioni sono ruvide, simulanti psoriasi, o sono associate con papule, vescicole e croste. Il prurito può essere un sintomo prominente. Molto raramente possono essere presenti bolle e pustole. E' stata anche descritta una forma verrucosa localizzata soprattutto al palmo delle mani, alla pianta dei piedi e alle pieghe cutanee. Poiché queste forme possono essere confuse con disordini cutanei non maligni, è sempre raccomandabile la biopsia della cute in uno stadio precoce.

Nello *stadio III (tumorale)* l'infiltrato linfomatoso si estende all'intero spessore del derma e talora al sottocute con un pattern diffuso e/o grossolanamente nodulare. Gli elementi neoplastici sono di medie e grandi dimensioni, pleomorfi; in questa fase l'epidermotropismo può risultare perso. Nel caso in cui la percentuale di grandi cellule sia quantitativamente superiore al 25% dell'intero infiltrato, diviene concreta la possibilità di una progressione/trasformazione in linfoma secondario a grandi cellule, con prognosi sfavorevole. I noduli possono insorgere ovunque ma prediligono la faccia e le pieghe cutanee (le ascelle, l'inguine, fossa antecubitale, il collo e nelle donne la zona inframammaria).

Nella gran parte dei casi di MF la popolazione linfomatosa ha un immunofenotipo T-periferico "helper" (CD2+, CD3+, BF1+, CD4+, CD5+, CD45RO+) spesso con perdita del CD7; sono stati segnalati anche rari casi di MF con fenotipo "suppressor" CD8+. Nella fase tumorale gli elementi neoplastici, in precedenza negativi, possono esprimere l'antigene CD30 che, nel caso specifico, assume una connotazione prognosticamente sfavorevole.

Le indagini di biologia molecolare evidenziano un riarrangiamento monoclonale per TCR ("T-cell-receptor") nella maggioranza delle MF in stadio in placca e tumorale; risultati variabili si ottengono invece nelle fasi iniziali di

malattia ove la percentuale di casi "riarrangiati" può risultare inferiore al 50%.

Al momento non sono descritte anomalie citogenetiche.

Una diagnosi di MF non può prescindere da un'accurata combinazione del quadro clinico con gli aspetti istopatologici ed immunomolecolari. Una delle maggiori difficoltà nella esatta identificazione della MF, soprattutto in fase iniziale, risiede proprio nella storia naturale della malattia, caratterizzata da un decorso protratto ed indolente con lesioni che possono essere facilmente scambiate per dermatiti a diversa eziologia (dermatiti superficiali eczematose, lichenoidi o psoriasiformi). Le recenti metodiche diagnostiche (immunoistochimica e biologia molecolare) non si sono purtroppo rivelate in grado, da sole, di fornire risposte conclusive. Modificazioni del profilo antigenico della popolazione T-linfocitaria (ad esempio la perdita del CD7) sono infatti osservabili anche in quadri flogistici. Ricordiamo che le indagini molecolari evidenziano, con sempre maggior frequenza, la presenza di popolazioni T oligoclonali in patologie quali il lichen planus, la pitiriasi lichenoidale, la dermatite spongiosa, etc. In sintesi, una diagnosi di MF in fase iniziale non è sempre agevole e può richiedere molto tempo ed una particolare cautela, che si traducono in un prolungato "follow-up" e nella necessità di multipli controlli biopsici sequenziali.

La storia naturale della micosi fungoide può avere una durata variabile da pochi mesi a molte decadi. In un paziente con normale aspettanza di vita, se non trattato od inadeguatamente trattato, la malattia tende a progredire verso stadi più avanzati. Tuttavia la diffusione ai linfonodi e agli organi interni viene osservata raramente (circa il 10-20% dei casi), poiché la maggior parte dei pazienti muore per sepsi secondaria a lesioni dermatologiche infettate, per lo più da *S. Aureus* o da *Ps. Aeruginosa*, o per cause assolutamente non correlate con la malattia. Anche in pazienti con interessamento esclusivamente cutaneo si rileva abbastanza frequentemente in fase avanzata un coinvolgimento degli organi interni soprattutto linfonodi, milza, fegato, polmoni. Infatti all'esame autoptico l'incidenza dell'impegno extracutaneo è del 70% e in ordine decrescente sono interessati linfonodi (61%), milza (52%), fegato (48%), polmoni (42%), midollo osseo (32%) e tratto gastrointestinale (31%).

I pazienti con MF sono stati divisi in tre gruppi prognostici:

- **prognosi favorevole** con sopravvivenza media maggiore ai 12 anni quando la malattia è allo stadio di placca senza coinvolgimento dei linfonodi, del sangue periferico e viscerale;
- **prognosi intermedia** con sopravvivenza media di 5 anni nella fase di nodulo, eritrodermia o malattia di placca con interessamento linfonodale o coinvolgimento del sangue periferico ma senza coinvolgimento viscerale;

- **cattiva prognosi** con sopravvivenza media di 2.5 anni in caso di coinvolgimento anche viscerale.

Pazienti con stadio clinico IA non hanno una sopravvivenza differente quando sono comparati con una popolazione controllo identica per età, sesso e razza.

Forme varianti della Micosi Fungoide

Entrambe le classificazioni WHO ed EORTC descrivono varianti della Micosi Fungoide:

a) Micosi Fungoide Follicolare con Mucinosi Follicolare

Clinicamente si presenta in forma di lesioni (papule e/o placche eritematose) che coinvolgono le strutture annessiali follicolari della testa e del collo; in altre sedi cutanee gli stessi pazienti possono comunque mostrare lesioni tipiche della MF classica. Istologicamente l'infiltrato cellulare e' tipicamente più follicolotropo che epidermotropo ed é costituito da linfociti T-"helper" CD4+, pleomorfi più spesso di piccole e medie dimensioni. E' frequente la deposizione di una variabile quantità di mucina in sede intra e periannessiale.

b) Reticulosi Pagetoide

Clinicamente si presenta in forma di chiazze e/o placche di discrete dimensioni, di aspetto verrucoso ipercheratosico; le lesioni, a lenta crescita, interessano di solito l'estremità inferiore degli arti. Vengono distinte una forma localizzata (malattia di Woringer-Kolopp) a prognosi estremamente favorevole ed una

forma disseminata (malattia di Ketrón-Goodman), quest'ultima con prognosi simile a quella della MF classica. Istologicamente l'infiltrato linfomatoso é costituito da elementi atipici, pleomorfi, di dimensioni variabili, con fenotipo T-periferico (CD4+/CD8- o CD8+/CD4-) caratterizzati da un peculiare e spiccato epidermotropismo; è frequente l'espressione dell'antigene CD30 almeno in una quota della popolazione neoplastica.

La classificazione standard per stadi della MF è il sistema TNMB (T= estensione del tumore primitivo; N= coinvolgimento linfonodale; M= coinvolgimento di siti metastatici; B= coinvolgimento ematico); questo sistema è stato proposto per la prima volta al Workshop NCI del 1978, ed è il seguente:

T (Cute):

T1: chiazze/placche limitate (<10% della superficie cutanea totale)

T2: chiazze/placche generalizzate (>10% della superficie corporea)

T3: presenza di tumori

T4: eritroderma generalizzato

N (linfonodi):

N0: linfonodi non coinvolti clinicamente

N1: linfonodi aumentati di dimensioni, istologicamente negativi (linfonodi reattivi)

N2: linfonodi non coinvolti clinicamente ma istologicamente positivi

N3: linfonodi aumentati di dimensioni e istologicamente coinvolti

M (metastasi viscerali):

M0: assenza di coinvolgimento viscerale

M1: coinvolgimento viscerale

B (sangue):

B0: assenza di cellule di Sézary circolanti (< 5% dei linfociti)

B1: cellule di Sézary circolanti (\geq 5% dei linfociti)

La stadiazione clinica complessiva è definita come segue:

- Stadio IA: T1 N0 M0
- Stadio IB: T2 N0 M0
- Stadio IIA: T1-2 N1 M0
- Stadio IIB: T3 N0-1 M0
- Stadio IIIA: T4 N0 M0
- Stadio IIIB: T4 N1 M0
- Stadio IVA: T1-4 N2-3 M0
- Stadio IVB: T1-4 N0-3 M1

1.5 - SINDROME DI SÉZARY

La sindrome di Sézary (SS) rientra nel gruppo dei CTCL ed è considerata una forma di linfoma/leucemia con interessamento della cute e del sangue periferico.

Storicamente la SS viene definita come una malattia caratterizzata dalla triade: eritrodermia, linfadenopatia generalizzata e la presenza di un clone neoplastico T-cellulare con nucleo cerebriforme (cellule di Sézary) nella cute, nei linfonodi e nel sangue periferico.¹⁰⁶

Dal punto di vista epidemiologico, la SS è una malattia rara che colpisce esclusivamente gli adulti. Essa rappresenta meno del 5% dei CTCL, con un'incidenza annua intorno allo 0,3 casi per milione di abitanti. Nelle ultime decadi si è notato un aumento dell'incidenza dei CTCL, probabilmente per un generale miglioramento delle capacità diagnostiche e dell'accesso alle cure. Sono più colpiti i bianchi, i maschi e l'incidenza aumenta con l'età.¹⁰⁷

La SS è caratterizzata dalla comparsa de novo o da precedente MF di un'eritrodermia spesso intensamente pruriginosa, che può essere associata ad intensa esfoliazione, edema e lichenificazione.

Sono altresì comuni: linfadenopatia, alopecia, onicodistrofia e ipercheratosi palmo-plantare. Negli stadi avanzati vi può essere interessamento oculare, che si manifesta con blefarocongiuntivite ed ectropion.

Per quanto riguarda le eritrodermie la diagnosi differenziale comprende: reazioni cutanee da farmaci, reticulosi attinica, reazioni pseudolinfomatose indotte da farmaci, gravi reazioni di tipo eczematoso, psoriasi, dermatite seborroica, parapsoriasi, pitiriasis rubra pilaris e stati di fotosensibilità (es. lupus e dermatomiosite).

Le cellule di Sézary sono linfociti atipici dotati di nucleo convulso o cerebriforme, presenti sia nella cute sia nel sangue.

La diagnosi della SS si basa su parametri clinici e strumentali (ecografia, TC e PET), sull'esame istologico-immunoistochimico di biopsie cutanee e/o linfonodali e sullo studio immunofenotipico ($CD4+/CD26-$, $CD7\pm$) e molecolare (clonalità e citogenetica) del sangue periferico e dell'aspirato midollare.

L'istologia nella SS può risultare simile a quella della MF, tuttavia l'infiltrato cellulare tende ad essere spesso monotono e l'epidermotropismo può a volte essere assente.

Da sottolineare è il fatto che in più di un terzo delle biopsie di pazienti con la SS il quadro istologico risulta non specifico, potendo riprodurre pattern presenti nelle patologie benigne di tipo infiammatorio (perivascolare superficiale, perivascolare superficiale e profondo, spongiotico, psoriasiforme, con infiltrato lichenoidale etc.). Questa situazione spesso rende difficoltosa una diagnosi e un

trattamento precoci. I linfonodi coinvolti mostrano in modo caratteristico un infiltrato di cellule di Sézary denso e monotono con perdita della normale architettura linfonodale. Anche il midollo osseo può a volte essere coinvolto, ma l'infiltrato è spesso sparso e maggiormente interstiziale.

Le cellule di Sézary da un punto di vista immunofenotipico rappresentano la proliferazione clonale di linfociti T helper CD4+ ed esprimono pertanto antigeni associati alle cellule T: CD2+, CD3+, CD5+, circa 2/3 sono CD7-, quasi tutte sono CD4+/CD8-, CD45RO+, CD26-, CD60+, CD49d-.

Sono possibili anche casi CD3+, CD4-/CD8+, in questi ultimi deve però essere considerata la diagnosi differenziale con la reticulosi atinica.

I geni del TCR spesso mostrano un riarrangiamento clonale. Non sono state identificate traslocazioni ricorrenti, ma il riscontro di un cariotipo alterato è un reperto comune in questa patologia.

La SS rientra nel gruppo degli E-CTCL (erythrodermic cutaneous T-cell lymphoma), linfomi cutanei a cellule T caratterizzati dalla presenza di eritrodermia (eritema diffuso a più dell'80% della superficie cutanea). In questo gruppo rientrano: la sindrome di Sézary (fase leucemica dei ECTCL), la micosi fungoide eritrodermica (E-MF), e gli E-CTCL NOS (not otherwise specified).

Le caratteristiche cliniche della SS si sviluppano solitamente "de novo" nel giro di un breve intervallo di tempo (SS variante classica), in alcuni casi invece sono

preceduti da prodromi quali la presenza di prurito o quadri di dermatite aspecifici, o infine possono insorgere da una tipica MF.

L'International Society for Cutaneous Lymphoma (ISCL) raccomanda che questi ultimi casi siano indicati come "SS preceduta da MF" o "SS secondaria", in ragione delle possibili differenze nel comportamento clinico e nella prognosi.

La percentuale di cellule di Sézary richiesta per la diagnosi di SS rimane una questione controversa.

I criteri minimi per fare diagnosi sono rappresentati da eritrodermia, un'istologia cutanea compatibile, >5% di cellule di Sézary circolanti e l'evidenza nel sangue periferico di un clone T cellulare.

L'ISCL ha proposto per la diagnosi di SS la presenza di uno o più dei seguenti criteri ematologici:

- (1) una conta assoluta di cellule di Sezary di almeno 1000cells/mm³,
- (2) un rapporto CD4/CD8>10 dovuto ad un incremento delle cellule CD4+ circolanti e/o la presenza su di essi di un immunofenotipo aberrante (per esempio, la perdita degli antigeni pan-T: CD2, CD3, o CD5, e/o CD4 e CD8),

(3) un'aumentata conta linfocitaria con l'evidenza di un clone T cellulare nel sangue periferico, evidenziato con la metodica di Southern blot o mediante PCR,

(4) presenza di anomalie cromosomiche sul clone T cellulare.¹⁰⁸⁻¹¹²

Stratificati in base alla conta delle cellule di Sézary (SC), i pazienti affetti da E-CTCL mostrano una mediana di sopravvivenza (MS) di 7,6 anni in caso di numero minore di 1000 SC/ μ L, di 5,4 se compreso tra 1000 e 10.000 SC/ μ L, e di 2,4 se maggiore di 10.000 SC/ μ L.

L'età avanzata, livelli elevati di lattato deidrogenasi (LDH) e una conta dei globuli bianchi (WBC) $>20.000/\mu$ L alla diagnosi sono stati associati a una cattiva prognosi.

Anche un elevato numero di CD60+ e uno basso di CD49d+ tra i CD4+ alla presentazione della malattia è risultato associato a minori probabilità di sopravvivenza.¹⁰⁸⁻¹¹²

1.6 - TERAPIA

Il trattamento dei linfomi primitivi cutanei richiede un intervento multidisciplinare nel quale sono coinvolti il dermatologo, il radioterapista e l'ematologo.

Il dermatologo osserva per primo il paziente, pone la diagnosi, completa lo staging della malattia e pianifica il trattamento topico o sistemico diretto alla cute. Il radioterapista è coinvolto già nella prima fase del trattamento per l'intervento su manifestazioni ancora limitate del linfoma o nel trattamento delle manifestazioni estese per l'intervento su tutta la cute (total skin electron beam). La collaborazione dell'ematologo è, in genere, richiesta per un piccolo numero di pazienti con malattia avanzata già ripetutamente trattati, resistenti o in recidiva dopo terapie tradizionali topiche o sistemiche.

I linfomi primitivi cutanei nella maggioranza delle varianti istologiche presentano infatti un decorso indolente ed una buona prognosi con una lunga sopravvivenza.

I linfomi primitivi cutanei B presentano una buona prognosi con elevata incidenza e lunga durata della remissione completa con le terapie locali (chirurgia, radioterapia) o con $\alpha 2$ -Interferone o la monochemioterapia.

La maggior parte dei pazienti dovrebbe essere trattata con la radioterapia locale o con la sola escissione chirurgica. Terapie sistemiche più aggressive del Clorambucil e dell'alfa interferone sono richieste da pochissimi pazienti. Nonostante la lunga sopravvivenza, le recidive sono frequenti (circa il 50%) e spesso non eradicabili. In considerazione tuttavia della lunga sopravvivenza la terapia dovrebbe mirare ad una buona palliazione con rischio minimo e con

scarsa influenza sulla qualità di vita. A volte però le recidive ripetute, le localizzazioni cutanee molto estese (di problematico trattamento locale) e, seppure rara e tardiva, la diffusione linfonodale e midollare della malattia, possono richiedere trattamenti più aggressivi come gli anticorpi monoclonali anti-CD20, la polichemioterapia e la chemioterapia sovramassimale.

Non esistono studi controllati che attraverso l'inquadramento diagnostico o la stratificazione prognostica sulla base di criteri clinico-biologici dimostrino l'utilità di un approccio sistemico, con l'intervento dell'ematologo, nel trattamento dei linfomi cutanei già all'esordio della malattia.

In un piccolo gruppo di pazienti, il linfoma cutaneo è aggressivo già all'esordio ed una malattia avanzata si osserva più frequentemente in pazienti che sono resistenti o hanno presentato una recidiva dopo ripetuti trattamenti con terapie tradizionali topiche o sistemiche.

In questi pazienti nessuna terapia è in grado di indurre una remissione stabile della malattia e la scelta del trattamento risulta difficile per l'eterogeneità clinica e biologica della patologia e per la tossicità cumulativa indotta dalle precedenti terapie associata spesso all'età avanzata dei pazienti.

In alcune varianti del linfoma, tuttavia, una più precisa definizione biologica e l'utilizzo di dati retrospettivi derivati da ampie casistiche possono permettere

di pianificare un trattamento che possa avere come obiettivo anche l'eradicazione della malattia linfomatosa.

I linfomi cutanei primitivi a cellule T (CTCL, Cutaneous T Cell Lymphoma), dei quali il sottotipo più frequente è rappresentato dalla Micosi Fungoide (MF), rispondono per lungo tempo ai trattamenti topici o sistemici di associazione con steroidi, UV e retinoidi o all' α 2-Interferone.

Altre varianti, come i CTCL a grandi cellule (Anaplastic Large Cell, ALC) CD30+ presentano remissioni complete dopo il solo trattamento chirurgico e l'aggiunta della radioterapia.

Gli stadi avanzati della MF, la Sindrome di Sezary (SS), gli ALC CD30-, e altre varianti rare come la Subcutaneous Panniculitis-like sono refrattari o rispondono solo per un breve periodo anche a trattamenti sistemici più aggressivi come la monochemioterapia, la polichemioterapia gli anticorpi monoclonali anti-CD52 o la chemioterapia sovramassimale con reinfusione di Cellule Staminali Emopoietiche (CSE) autologhe o il trapianto di CSE allogeniche.

Le associazioni polichemioterapiche più utilizzate nel trattamento dei linfomi cutanei in fase avanzata contengono un antraciclinico associato alla ciclofosfamide, alla vincristina e al prednisone (CHOP) o ad altri farmaci.^{113,114,115}

Dopo una risposta di breve durata (in media 7 mesi) soprattutto i CTCL in fase avanzata, recidivano e si presentano resistenti ad ulteriori trattamenti.

Le strategie di trattamento possono essere divise in 2 categorie: terapia locale cutanea e terapia sistemica. La terapia locale include PUVA, chemioterapia topica e radioterapia. La terapia sistemica include chemioterapia e altri agenti citotossici, fotoforesi, retinoidi, IFN e altri modificatori della risposta biologica. Nessuno studio ha dimostrato una superiorità di un trattamento topico e la scelta terapeutica dipende in genere dalle condizioni del paziente e dalla sua capacità di tollerare un trattamento piuttosto che un altro.

Il successo del trattamento è la remissione dei sintomi e il miglioramento delle lesioni cutanee.

Sebbene i pazienti trattati più aggressivamente possono presentare una remissione completa, questo gruppo presenta anche una maggiore tossicità. Tra i due gruppi non ci sono differenze significative tra la durata della sopravvivenza libera da malattia e la sopravvivenza mediana.

La terapia con UVB (raggi ultravioletti B) è efficace in pazienti con malattia con chiazze stadio I. L'83% dei pazienti con stadio I ha ottenuto una remissione completa a una media di 5 mesi dopo l'inizio della terapia a una frequenza di 3 volte a settimana. La durata media della remissione è di 22 mesi.¹¹⁶

La PUVA (psoralens plus ultraviolet light) terapia è un particolare tipo di trattamento che prevede l'uso di UVA in associazione a composti fotoattivati (derivati furocumarinici) in grado di inibire la sintesi sia di DNA sia di RNA mediante formazione di mono o bi-funzionali addotti alla timidina, mutazioni genetiche o alterazioni cromatidiche. Il trattamento consiste nell'assunzione per os di un farmaco fotosensibilizzante, 8-methoxypsoralen (8-MOP), seguita dopo 2 ore dall'esposizione a raggi ultravioletti UVA di elevata intensità ed ampia lunghezza d'onda. Le apparecchiature utilizzate emettono uno spettro continuo di raggi ultravioletti di lunghezza d'onda compresa tra i 320 e 400 nm, con picco di emissione tra i 350 e i 380 nm. Il tempo di esposizione iniziale si basa sul grado di pigmentazione cutanea prima della terapia e viene aumentata di seduta in seduta in base alla risposta del paziente ed alla comparsa di eritema. La dose iniziale è di 0.6 mg/Kg ingerita 2 ore prima dell'esposizione a UVA. La dose iniziale di UVA è di circa 1,5-3 J/cm² e può essere aumentata approssimativamente di 0,5 J/cm². Normalmente la frequenza delle sedute è 2-3 volte alla settimana fino alla completa scomparsa delle lesioni cutanee poi il trattamento può essere sospeso, anche se una terapia di mantenimento (1 volta a settimana o una volta ogni 3-4 settimane) è utile per prolungare la durata della remissione. Il tempo necessario per la scomparsa delle lesioni varia dai 2 ai 6 mesi. Una remissione completa si può ottenere nel 70-100% dei pazienti in stati

iniziali. Si è visto che i pazienti con lesioni eritematose o a placca rispondono maggiormente rispetto ai pazienti con malattia avanzata.

Gli effetti della terapia sono ben tollerati. Gli effetti collaterali includono nausea, dovuta allo psoralene, eritema e prurito. Un'esposizione a lungo termine agli UVA può inoltre aumentare l'incidenza di carcinomi cutanei e determinare la formazione di cataratta. Nonostante ciò la PUVA-terapia è in genere ben tollerata, efficace e può essere eseguita anche in sinergia con altri tipi di trattamento. Recentemente sono stati riportati casi di mielodisplasia legati alla terapia e un caso di leucemia acuta.

Recentemente la PUVA-terapia è stata associata all'interferone, con percentuali elevate di remissione completa (oltre 60%) anche in pazienti pretrattati con altre modalità terapeutiche. Il tasso di remissioni complete e la loro durata con questo trattamento combinato sono risultati maggiori di quelle riportate con singoli trattamenti.

La PUVA-terapia è ristretta a pazienti con malattia stadio I e II.

La fotoferesi prevede l'utilizzo degli psoraleni associati agli UVA.¹¹⁷ I pazienti assumono lo psoralene 2 ore prima del trattamento e vengono successivamente sottoposti ad una leucoaferesi con isolamento della frazione cellulare mononucleata. Le cellule vengono esposte agli UVA all'interno di un particolare dispositivo e poi reinfuse nel circolo ematico del paziente. Gli UVA

sono direttamente tossici per queste cellule che sono irradiate e in più le cellule irradiate e reinfuse stimolano una risposta selettiva contro le cellule maligne. Inizialmente la fotoforesi è eseguita per 2 giorni consecutivi una volta al mese. Seguono poi sei mesi di terapia mensile.

C'è una risposta del 73% in pazienti con CTCL refrattario alle terapie precedenti, la maggior parte dei quali hanno SS. Pazienti con SS, con conta linfocitaria di normali CD8+, rispondono bene alla terapia. La sopravvivenza media in questa coorte di pazienti è di circa 60 mesi. Un altro studio ha confrontato un gruppo di pazienti trattati con fotoforesi con un gruppo non trattato e ha preso in considerazione la clonalità delle cellule T. La sopravvivenza media dei pazienti trattati con fotoforesi è solo di 39 mesi e non è significativamente migliore rispetto al gruppo non trattato con fotoforesi. Si sta studiando una forma liquida di 8-MOP che è introdotto direttamente nella macchina da fotoforesi senza che il paziente debba ingerire lo psoralene. Gli effetti collaterali sono blandi ed includono nausea, flash e febbre.¹¹⁸

La chemioterapia topica può essere usata sia con mecloretamina (NH₂, nitrogen mustard (NM) o carmustina (BCNU).¹¹⁹

La terapia topica con NM è applicata quotidianamente per l'intera superficie corporea con una soluzione di 10 mg in 50 ml di soluzione acquosa. E' stata dimostrata una risposta completa del 51% e una risposta totale dell'81% in 43

pazienti con malattia allo stadio T1. Nella stesso studio c'è una risposta completa del 26% e totale del 70% tra 58 pazienti con malattia T2. Dopo 1 anno di trattamento con NM topica è stata evidenziata una risposta completa del 67% tra 41 pazienti con malattia T1 e del 40% tra 76 pazienti con T2. Il tempo medio di remissione per questo studio è di 4.4 mesi per T1 e 20.4 mesi per T2. Perciò NM topica è un trattamento efficace e conveniente.

I maggiori effetti collaterali di NM topica sono dermatite irritante o da contatto allergica, carcinomi squamocellulari e basocellulari secondari. Reazioni da ipersensibilità ritardata occorrono in più del 58% di pazienti. In questo caso bisogna interrompere la somministrazione e procedere con la desensibilizzazione.

In un follow up a lungo termine 11% di 331 pazienti trattati con NM topica ha una completa remissione per più di 8 anni. L'incidenza di carcinoma squamocellulare della cute è di 8.6 volte maggiore rispetto alla popolazione generale e l'incidenza di basalioma è di 1.8 volte. Analisi di questo studio è complicata dal fatto che molti pazienti sono stati anche trattati con altre modalità tipo radiazioni locali, TSEBT, ultraviolett phototerapy e chemioterapia sistemica.

BCNU topica è stata dimostrata avere una efficacia simile a NM. BCNU 10 mg in etanolo e poi miscelata con 60 ml di acqua. La soluzione finale è applicata

una volta al giorno su tutta la superficie corporea eccetto aree non coinvolte della faccia, mani, genitali e pieghe cutanee. Studi hanno riportato una risposta superiore al 92% a 3 anni tra 89 pazienti con malattia T1 e oltre 64% a 3 anni tra 83 pazienti con T2. La sopravvivenza a 5 anni in questi 2 gruppi è del 97% e 79%, rispettivamente. Il tempo medio per ottenere una risposta completa è di 9 settimane per pazienti con stadio T1 e 12 settimane per quelli T2. Le reazioni da ipersensibilità a BCNU sono rare. Il più comune effetto collaterale all'uso topico di BCNU è l'eritema, che può essere seguito da teleangectasie. Tumori secondari della cute non sono di solito osservati. La mielosoppressione è rara alla dose standard di 10 mg ed è stata osservata in meno del 10% dei pazienti trattati con una dose doppia rispetto a quella standard.

I linfomi cutanei, come la maggior parte dei linfomi maligni, sono molto radiosensibili. La radioterapia esterna viene utilizzata con successo nei linfomi cutanei in fase iniziale e a puro scopo palliativo nelle forme cutanee più avanzate ed in quelle con localizzazione viscerale. Le lesioni tumorali più infiltrate richiedono di solito un boost radioterapico, ciò evita il danno a carico di strutture più profonde, compreso il tessuto emopoietico. E' segnalata una remissione completa in circa il 65% dei casi. Le complicanze acute includono eritema cutaneo e alopecia temporanea. Le complicanze croniche sono rappresentate da xerosi della cute e sviluppo di teleangectasie.

La chemioterapia sistemica è usata di solito per terapie palliative in pazienti con malattia refrattaria dopo terapia topica cutanea o in pazienti con malattia avanzata alla presentazione. La chemioterapia sistemica è stata utilizzata nel trattamento della Micosi Fungoide sia come monochemioterapia che come polichemioterapia. La monochemioterapia con alcuni agenti è stata usata includendo metotrexate, glucocorticoidi, NM, ciclofosfamide, cisplatino, etoposide, bleomicina, doxorubicina, vincristina e vinblastina.¹²⁰ La monochemioterapia può ottenere una risposta completa in oltre il 30%, ma le remissioni sono di breve durata. Il prednisone induce una remissione parziale in approssimativamente il 50% dei pazienti e il desametasone è efficace nell'ottenere il miglioramento dei sintomi in pazienti con grave SS.

Uno studio ha riportato una risposta in oltre il 76% e una sopravvivenza a 5 anni del 71% in un gruppo di 17 pazienti trattati settimanalmente con una bassa dose di metotrexate.

La polichemioterapia è stata usata in pazienti con malattia avanzata. Vari regimi sono stati utilizzati, tra cui: CVP, CHOP, MOPP. Sebbene sia stata dimostrata una risposta che varia dall'80 al 100%, non ci sono significativi benefici per la sopravvivenza.

Così come per i linfomi cutanei a cellule B, anche nel campo dei linfomi cutanei a cellule T negli ultimi anni è utilizzata l'immunoterapia.

Alemtuzumab, un anticorpo monoclonale IgG2b di ratto, CAMPATH-1G, è in grado di rimuovere i linfociti da sangue periferico, midollo osseo e milza di pazienti con tumori linfoidei, grazie alla sua capacità di indurre citotossicità cellulo-mediata anticorpo-dipendente (ADCC). In vitro Alemtuzumab agisce attivando la citolisi mediata dal complemento e ADCC (citotossicità cellulo mediata anticorpo dipendente) e inducendo l'apoptosi anticorpo-mediata. Non è chiaro quale di questi meccanismi sia più importante per l'attività terapeutica di questo anticorpo in vivo.

Una trattazione a parte spetta alla terapia con bexarotene. Gli acidi retinoici endogeni, l'acido all-trans retinoico e il 9-cis acido retinoico (ossia composti derivanti da vitamina A) regolano una serie diversificata di processi biologici, che vanno dallo sviluppo embrionale alla crescita cellulare, alla differenziazione e alla sopravvivenza, legandosi a due famiglie di recettori ormonali steroidei ovvero i recettori dell'acido retinoico (RAR) e i recettori X dei retinoidi (RXR). Vari retinoidi RAR sono stati utilizzati in MF / SS, sia topici sia sistemici, con tassi di risposta superiore al 50%. Tuttavia, nel 1999 il bexarotene "rexinoid" RXR selettivo è stato approvato dalla FDA per i CTCL ed è stato successivamente approvato come una formulazione topica in gel. Gli studi di laboratorio dimostrano che il bexarotene favorisce l'arresto del ciclo cellulare e l'apoptosi nelle linee cellulari CTCL.¹²¹⁻¹²² In uno studio

multicentrico di fase II-III, 94 pazienti con CTCL a livello avanzato precedentemente trattati con una mediana di cinque terapie precedenti, la maggioranza dei quali avevano una malattia refrattaria ad almeno una terapia sistemica precedente, hanno ricevuto almeno 300 mg / m² di bexarotene orale giornaliero.¹²³ Tra i pazienti trattati con la dose di 300 mg / m², è stato osservato un tasso di risposta globale del 45%, di cui solo il 2% era completo. Mentre è stata osservata una migliore percentuale di risposta globale con l'impiego di dosi più elevate, questa differenza non era statisticamente significativa, e la tossicità limitante della dose era molto più comune (50% contro 89%) in questi pazienti. Mentre è probabile una relazione dose-risposta, la dose di 300 mg / m² sembra fornire il rapporto ottimale di rischio / beneficio. Le tossicità più comuni associate alla terapia erano l'ipertrigliceridemia (nell'82%) e l'ipotiroidismo centrale (29%). La mielosoppressione è rara e di solito non complicata. La pancreatite secondaria all'ipertrigliceridemia può essere raramente osservata, ma è reversibile al momento della sospensione del trattamento. Pertanto, prima di iniziare la terapia deve essere ottenuto un pannello lipidico di base e un TSH. In uno studio retrospettivo, tutti i pazienti trattati con bexarotene hanno sviluppato iperlipidemia e ipotiroidismo, spesso entro alcune settimane dall'inizio del trattamento.¹²⁴

Di conseguenza, si raccomanda generalmente l'uso di agenti che abbassano i lipidi (ad esempio fenofibrato) e levotiroxina a basso dosaggio (ad esempio 50 microgrammi) prima dell'inizio del bexarotene.¹²⁵⁻¹²⁷ Nella pratica clinica, il bexarotene viene spesso avviato ad una dose inferiore di 150 mg / m² e successivamente titolato a dosi piene dopo 4 settimane di terapia, a seconda della tollerabilità del paziente. La maggior parte delle risposte si verifica entro 2-3 mesi dall'inizio della terapia, ma può essere ritardata. Pertanto, in assenza di progressione o tossicità di malattia, il trattamento dovrebbe essere continuato fino a 6 mesi. Per i pazienti responder, il trattamento deve essere continuato fino alla progressione della malattia e, a seconda della qualità della risposta, si dovrebbero considerare terapie aggiuntive per la cute (ad esempio PUVA, interferone).¹²⁸ Sono state recentemente pubblicate linee guida che descrivono un adeguato monitoraggio del laboratorio, una cura di supporto e una prescrizione sicura clinica di bexarotene.¹²⁹ Sono necessari studi futuri che chiariscono l'uso ottimale di bexarotene, in combinazione o in sequenza con altri agenti.

CAPITOLO 2: CELLULE ENDOTELIALI PROGENITRICI

2.1 – INTRODUZIONE

La genesi del sistema ematopoietico nell'organismo in fase di sviluppo è un processo complesso e lo sviluppo del sistema vascolare è uno degli eventi più precoci dell'organogenesi.¹³⁰

Il primo segno visibile di attività ematopoietica nell'embrione di topo si osserva con la formazione, intorno al giorno 6.5-7 di gestazione, delle “isole sanguigne” (BloodIslands), aggregati cellulari che originano dal mesoderma extraembrionale migrato attraverso la stria primitiva nella regione del futuro sacco vitellino.

In questi aggregati è possibile distinguere due tipi cellulari: gli eritroblasti, deputati alla produzione di eritrociti, circondati da uno strato esterno di precursori endoteliali chiamati angioblasti.¹³¹

Questa stretta associazione spaziale e temporale delle filiere ematopoietica ed endoteliale ha portato a formulare l'ipotesi che i due tipi cellulari derivassero da un precursore bipotente comune, l'emangioblasto.¹³²

A questa osservazione si aggiunsero dati forniti dall'analisi molecolare che permisero di evidenziare un pannello di geni coinvolti nella regolazione della

differenziazione cellulare ed espressi da entrambi i tipi di precursori: CD34¹³³, flk-1¹³⁴,flt-1¹³⁵, TIE-2¹³⁶, SCL/Tal-1¹³⁷, GATA-2¹³⁸ e PECAM-1.¹³⁹

I vasi sanguigni dell'embrione nascono, quindi, dall'emangioblasto dopo la formazione di un plesso primario di capillari secondo un processo definito vasculogenesi.¹⁴⁰

Successivamente il plesso primario va incontro ad un complesso processo di rimodellamento durante il quale la crescita e la migrazione di cellule ematopoietiche ed endoteliali porta allo sviluppo di un sistema circolatorio funzionale.

Questo processo definito angiogenesi inizia durante l'embriogenesi e continua nella vita adulta.¹⁴¹

Dopo la nascita, l'angiogenesi contribuisce alla crescita dell'organismo fino alla vita adulta durante la quale la maggior parte dei vasi sanguigni rimane quiescente e l'angiogenesi è limitata al tratto riproduttivo femminile (durante il ciclo ovarico e nella placenta durante la gravidanza), ai siti di cicatrizzazione delle ferite¹⁴², condizioni fisiologiche che richiedono un'attiva proliferazione endoteliale.

L'endotelio non è una semplice barriera passiva tra il sangue ed i tessuti, ma può essere considerato un vero e proprio "organo" diffuso nell'organismo, in grado di produrre, in risposta a molteplici stimoli, numerosi mediatori chimici.

Queste sostanze, agendo in modo autocrino e paracrino, garantiscono l'omeostasi vascolare.

In particolare l'endotelio regola l'aggregazione piastrinica, la coagulazione e la fibrinolisi; regola la permeabilità vascolare, il tono vascolare e la stessa struttura vasale; regola i processi infiammatori. Esposizioni protratte nel tempo ai fattori di rischio cardiovascolare e l'invecchiamento stesso possono alla fine estenuare l'efficacia dei sistemi protettivi endogeni delle cellule endoteliali e come conseguenza l'endotelio diviene disfunzionale.

Data la molteplicità delle sostanze prodotte dall'endotelio, il termine disfunzione endoteliale non configura semplicemente un'alterazione della vasodilatazione endotelio-dipendente mediata dall'ossido nitrico, ma consiste nella compromissione di tutta l'attività endocrino-paracrina dell'endotelio con conseguenze strutturali e/o funzionali su tutto il sistema vascolare.

La disfunzione endoteliale è considerata il primo evento nel processo di aterogenesi e di invecchiamento vascolare, e si manifesta tipicamente con un fenotipo pro-infiammatorio e protrombotico.¹⁴³

L'integrità endoteliale non dipende unicamente dalla gravità e dall'estensione del danno, ma anche dalla capacità endogena di riparazione.

Per molti anni si è ritenuto che nell'organismo adulto la rigenerazione endoteliale fosse possibile unicamente grazie alla migrazione e alla

proliferazione di cellule endoteliali, mature ed integre, adiacenti al sito della lesione.

Questo processo, noto come angiogenesi, si riteneva fosse l'unico meccanismo possibile per la rivascularizzazione dei tessuti ischemici nell'adulto.¹⁴⁴

Nel 1997 Asahara e collaboratori¹⁴⁵ identificarono per la prima volta, nel sangue periferico di soggetti adulti sani, una frazione di cellule mononucleate circolanti con le caratteristiche dei progenitori appartenenti allo stipite endoteliale.

Queste cellule derivanti dal midollo osseo emopoietico dell'adulto e con proprietà del tutto simili a quelle dell'emangioblasto embrionale vennero denominate cellule endoteliali progenitrici o EPCs (Endothelial Progenitor Cells).

Esse erano in grado di differenziarsi e di dare origine, in vitro, a cellule endoteliali mature ed, in vivo, di partecipare alla formazione di nuovi vasi.

La scoperta di Asahara fu di importanza fondamentale, perché per la prima volta si affermava l'esistenza di un processo di vasculogenesi, vale a dire la formazione di vasi ematici a partire da progenitori circolanti, non soltanto nella vita embrionale e fetale, ma anche nella vita adulta e in risposta a specifiche esigenze dell'organismo. Più propriamente questo processo biologico venne definito come vasculogenesi postnatale.

Secondo il modello biologico attualmente accettato, i progenitori endoteliali vengono mobilizzati nel sangue periferico in risposta a diversi stimoli, quali ad esempio l'ischemia tissutale, citochine, fattori di crescita, ma anche l'esercizio fisico ed i farmaci.

Una volta nel circolo sanguigno le EPCs, oltre a partecipare alla genesi di nuovi vasi sanguigni, avrebbero il ruolo di contribuire ai meccanismi di riparazione dell'endotelio danneggiato, interagendo con le cellule endoteliali residenti.

Il rilascio delle EPCs rappresenta un meccanismo fisiologico omeostatico dell'integrità vascolare e di regolazione della vascolarizzazione dei tessuti.

A partire dall'articolo di Asahara comparso su Science nel 1997, l'interesse della ricerca scientifica nei riguardi delle cellule endoteliali progenitrici è sempre aumentato nel corso degli anni, focalizzandosi soprattutto sul ruolo biologico dei progenitori endoteliali circolanti in due settori ben specifici della medicina clinica: le malattie neoplastiche e le malattie cardiovascolari.

2.2 – IDENTIFICAZIONE E CARATTERIZZAZIONE DELLE CELLULE ENDOTELIALI PROGENITRICI

Dal momento della loro scoperta è stato pubblicato un numero crescente di lavori scientifici riguardanti l'identificazione, la quantificazione ed il ruolo

funzionale dei progenitori endoteliali circolanti nel mantenimento dell'omeostasi vascolare in differenti situazioni patologiche.

Tuttavia in molti casi questi lavori hanno riportato risultati contraddittori.

Paradossalmente, rispetto alla mole della letteratura scientifica disponibile sull'argomento, il dibattito sulla caratterizzazione, in vitro ed in vivo, delle cellule endoteliali progenitrici è tuttora aperto, senza che sia stato raggiunto un accordo definitivo.

Attualmente per la caratterizzazione si utilizzano due approcci metodologici, non mutualmente esclusivi: la coltura cellulare e la caratterizzazione immunofenotipica in citofluorimetria.¹⁴⁶ Quest'ultima rappresenta in via teorica il metodo migliore per l'identificazione e la valutazione numerica delle EPCs, soprattutto nell'ambito della diagnostica di laboratorio, infatti l'esecuzione è relativamente semplice, richiede piccole quantità di sangue periferico, e non dipende dalle proprietà biologiche di queste cellule. Inoltre, una volta standardizzata, la metodica dovrebbe risultare facilmente riproducibile nei differenti laboratori. Sfortunatamente, allo stato attuale, l'analisi dell'espressione delle proteine di superficie non è sufficiente ad identificare con certezza, in maniera specifica ed univoca, i progenitori endoteliali circolanti, poiché gli antigeni di superficie più comunemente utilizzati per il riconoscimento di queste cellule, vale a dire il CD34, il CD133

ed il VEGFR-2 o KDR, sono espressi anche da altre popolazioni cellulari di derivazione emopoietica.¹⁴⁷

L'immunofenotipizzazione citofluorimetrica, inoltre, non consente di ottenere dati qualitativi relativi alle proprietà biologiche dei progenitori endoteliali, come la capacità clonogenica, l'attività migratoria e la produzione di fattori angiogenetici. Se si vogliono ottenere dati funzionali è necessario utilizzare un saggio colturale in vitro, che solitamente consiste in una fase iniziale di adesione e in una fase successiva di selezione. Purtroppo la varietà dei protocolli di coltura utilizzati per isolare le EPCs rende questo metodo ancora più intricato della citofluorimetria. Ad oggi sono stati descritti tre principali metodi di coltura cellulare per l'isolamento e la caratterizzazione delle EPCs (Figura1).

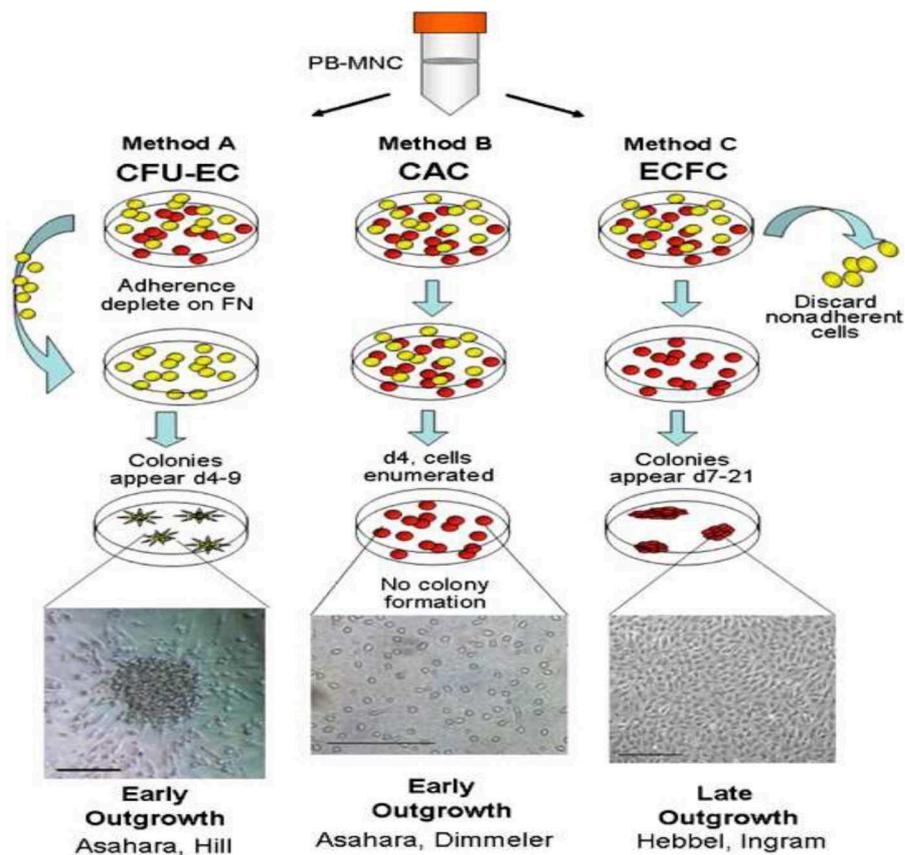


Figura 1: Procolli di coltura delle EPC

Il primo metodo corrisponde al metodo originale proposto da Asahara, poi successivamente modificato da Hill¹⁴⁸ e consente di ottenere abbastanza facilmente le cosiddette CFU-EC o CFU-Hill (Colony Forming Units-Endothelial Cells) utilizzando un mezzo di coltura disponibile in commercio (EndoCult, StemCell Technologies, Vancouver, British Columbia, Canada).

In questo metodo le cellule mononucleate di sangue periferico vengono seminate su una piastra ricoperta di fibronettina. Dopo una prima fase di cosiddetto “pre-plating” di circa 48h, necessaria per eliminare gli eventuali

macrofagi aderenti e le cellule endoteliali mature, le cellule non aderenti vengono rimosse e nuovamente piastrate, sempre su piastre coperte di fibronettina.

In un periodo variabile tra il 5° ed il 9° giorno compaiono delle colonie ben definite, costituite da un nucleo centrale di piccole cellule rotondeggianti, dal quale si irradiano verso la periferia cellule allungate, dall'aspetto fusiforme.

Il secondo metodo consente di ottenere le Cellule Angiogeniche Circolanti o CAC (Circulating Angiogenic Cells) definite anche "early EPCs"¹⁴⁹ e consiste innanzi tutto nel risospendere le cellule mononucleate del sangue periferico in un mezzo specifico per la crescita delle cellule endoteliali, supplementato con opportuni fattori di crescita.

Le cellule vengono quindi seminate su una piastra ricoperta da fibronettina e lasciate in adesione per un tempo variabile dai 4 ai 7 giorni.

Al termine di questo periodo di incubazione, le cellule non aderenti vengono eliminate, mentre si recuperano le cellule adese che costituiscono la popolazione cellulare selezionata.

Queste cellule hanno un fenotipo endoteliale, come dimostrato dal legame con una lectina ad attività agglutinante (UEA-1 Ulex Europaeus Agglutinin-1), dall'incorporazione di lipoproteine a bassa densità acetilate (acLDL) e da specifici markers di superficie: il fattore di von Willebrand (vWF), il CD31 o

PECAM-1 (Platelet-Endothelial Cell Adhesion Molecule), il VEGFR-2 o KDR (Vascular Endothelial Growth Factor Receptor –2), il CD144 o VE-caderina.

Le CAC, come le CFU-EC, derivano dalla frazione mononucleata delle cellule circolanti del sangue periferico, ma a differenza di esse si sviluppano a partire dalla frazione cellulare aderente e non formano colonie in coltura.

La successiva caratterizzazione di entrambi i tipi cellulari ha dimostrato che esse non possiedono capacità di “self-renewal”, hanno una modesta attività proliferativa, ma soprattutto hanno un fenotipo misto endoteliale ed emopoietico, più precisamente appartengono alla linea monocito-macrofagica.¹⁵⁰

Tuttavia le CAC sebbene non partecipino direttamente al processo di neovascologenesi, agiscono in maniera indiretta attraverso una funzione di tipo paracrino, contribuendo all'omeostasi vascolare attraverso la produzione di citochine pro-angiogeniche.¹⁵¹

Il terzo metodo consente di ottenere le cosiddette ECFC (Endothelial Colony Forming Cells) definite anche “late EPCs”, perchè pur derivando dalla frazione aderente delle cellule mononucleate del sangue periferico, appaiono in coltura non prima di 10-12 giorni.

Le ECFC possiedono capacità di “self-renewal”, hanno un elevato potenziale proliferativo e sono organizzate gerarchicamente, in maniera del tutto simile ai progenitori emopoietici.

Queste cellule sono considerate di derivazione endoteliale perchè esprimono esclusivamente marcatori di superficie di tale stipe cellulare e non del sistema emopoietico.¹⁵²

La loro frequenza nel sangue periferico di un organismo adulto in condizioni basali è molto bassa, variando tra lo 0,05 e 0,2 cellule per ml di sangue intero¹⁵³.

Le ECFC rappresentano, ad oggi, l'unico reale progenitore endoteliale circolante identificato, capace di partecipare direttamente al processo di angiogenesi e di neovasculogenesi e di incorporarsi nella parete delle strutture vascolari in formazione.¹⁵⁴

In questo contesto un ruolo chiave è svolto indirettamente anche dalle CAC, ma con

tutta probabilità anche dalle CFU-EC e da altre cellule di origine midollare, che attraverso la secrezione di fattori paracrini promuovono la neovascolarizzazione attraverso il reclutamento delle late EPCs ed il coordinamento delle loro attività.¹⁵⁵

2.3 – ALTERAZIONI ANGIOGENETICHE NEI LINFOMI CUTANEI A CELLULE T

L'angiogenesi è un processo cruciale nella crescita e progressione del cancro, correlando con il potenziale metastatico delle cellule tumorali. Alcune osservazioni cliniche hanno mostrato come la densità dei microvasi tumorali, misurata attraverso l'espressione del CD34, del CD31 o del fattore di von Willebrand, è aumentata in alcuni disordini linfoproliferativi. Nelle leucemia linfatica cronica, nel mieloma multiplo, nei linfomi non-Hodgkin a cellule B e nei linfomi cutanei a cellule T, sono stati riscontrati un'alta densità di microvasi tumorali e un incrementato livello sierico di fattori proangiogenetici come il vascular endothelial growth factor (VEGF) e il basic fibroblasts growth factor (bFGF).^{156,157}

A conferma di ciò, Kawaguchi et al, hanno valutato in un lavoro del 2014, i livelli sierici di angiopoietina 1 e 2 in pazienti affetti da linfoma cutaneo T.¹⁵⁸ Le angiopoietine sono ligandi endotelio-specifici del recettore tirosin-chinasico Tie-2: comprendono 4 proteine diverse strutturalmente chiamate Angiopoietina (Ang)-1, Ang-2, Ang-3 e Ang-4. Sia l'Ang-1 sia l'Ang-2 sono state identificate come ligandi a funzione opposta al recettore della tirosin chinasi.^{159,160} L'ang-1 è espresso nei periciti e nelle cellule muscolari lisce e agisce come agonista paracrino incrementando la fosforilazione della tirosina a

livello del recettore Tie2, mentre l'Ang-2 agisce primariamente con una funzione autocrina antagonista dell'Ang-1/Tie-2. Sotto il profilo fisiologico, l'Ang-1 ha un'azione vasoprotettiva e anti-infiammatoria, media la maturazione vasale, e mantiene l'integrità dei vasi attraverso il reclutamento delle cellule peri-endoteliali.¹⁶¹⁻¹⁶⁶

Al contrario, l'Ang-2 agisce come destabilizzante vasale giocando un ruolo cruciale nel rimodellamento vascolare. In realtà la funzione dell'Ang-2 è contestuale poiché facilita l'angiogenesi in presenza di VEGF ma induce regressione vascolare in assenza di attività pro-angiogenetica. I risultati dello studio hanno evidenziato un significativo aumento dei livelli sierici di Ang-2 ma non di Ang-1 in pazienti con sindrome di Sézary rispetto ai pazienti con micosi fungoide a chiazze o a placche o a lesioni tumorali e rispetto ai controlli sani. Inoltre nei pazienti con CTCL, l'Ang-2 sierica correla con l'attività di malattia, suggerendo un suo possibile ruolo nello sviluppo del CTCL.¹⁶²⁻¹⁶⁶

Un altro lavoro che suggerisce l'interazione tra le cellule tumorali dei CTCL e il microambiente vascolare, è quello di Miyagaki e collaboratori che hanno valutato i livelli sierici e cutanei dell'angiogenina in pazienti affetti da linfoma cutaneo T.¹⁶⁷ L'angiogenina è un membro della superfamiglia delle ribonucleasi capace di legare l'actina e portare alla attivazione dell'attivatore tissutale del plasminogeno. Questo genera plasmina che va a degradare la

laminina e la fibronectina della membrana basale. La distruzione della membrana basale è considerato un pre-requisito per la migrazione delle cellule endoteliali durante la neovascolarizzazione. Quindi l'angiogenina è correlata con i processi angiogenetici. Per esempio, in vari tipi di tumore, l'angiogenina è maggiormente espressa durante la crescita tumorale. Inoltre i pazienti con neoplasie ematologiche che mostrano alti livelli di angiogenina hanno generalmente una ridotta sopravvivenza. In questo studio hanno dimostrato che i livelli sierici di angiogenina e i livelli di mRNA dell'angiogenina a livello delle lesioni cutanee, erano significativamente più alti nei pazienti con CTCL eritrodermici piuttosto che nei controlli sani.¹⁶⁸⁻¹⁷¹ Quindi un'aumentata espressione dell'angiogenina può essere correlata con lo sviluppo dei CTCL in forma eritrodermica.

CAPITOLO 3: MICRO RNA

3.1 – INTRODUZIONE

I micro RNA (miRNA) sono brevi sequenze di RNA non codificante costituite da 22 nucleotidi, coinvolti nella inibizione post- trascrizionale di molecole di mRNA bersaglio.¹⁷² Nel genoma umano, i miRNA comprendono l'1-5% di tutti i geni rappresentando la classe più abbondante dei regolatori. . I miRNA sono trascritti dal DNA ma non sono tradotti in proteine e per questo fanno parte della famiglia degli RNA non codificanti. Ogni trascritto primario, chiamato pri-miRNA, è processato in una corta struttura a forcina che prende il nome di pre-miRNA, il quale, dopo ulteriori processi da origine ad un filamento funzionale e maturo che si attacca al suo RNA messaggero (mRNA) bersaglio. I miRNA hanno un ruolo nella regolazione dello sviluppo, differenziazione, organogenesi, proliferazione di cellule germinali e staminali, controllano la crescita e l'apoptosi. Inoltre, l'alterata espressione dei miRNA può contribuire allo sviluppo di numerose patologie; in particolare, miRNA sono espressi in maniera aberrante o mutati nel cancro.¹⁷³

3.2 – FORMAZIONE E PROCESSAMENTO DEI MICRO RNA

I microRNA possono essere codificati da geni indipendenti, ma possono anche essere processati (dall'enzima Dicer) da una varietà di differenti specie di RNA, comprese le regioni introniche e le regioni 3'UTR dei mRNA, RNA *long noncoding*, snoRNA e transposoni.¹⁷⁴⁻¹⁷⁶

Sia i filamenti senso che quelli antisenso del DNA possono funzionare come stampo per i miRNA. I miRNA sono inizialmente trascritti dalla polimerasi II in molecole di RNA più lunghe, detti miRNA primari (pri-miRna), che si ripiegano in forcine, formando un loop. Così come gli altri trascritti della pol II, questi RNA sono capped, poliadenilati, e hanno solitamente una lunghezza di diverse kilobasi (Figura 2).¹⁷⁷

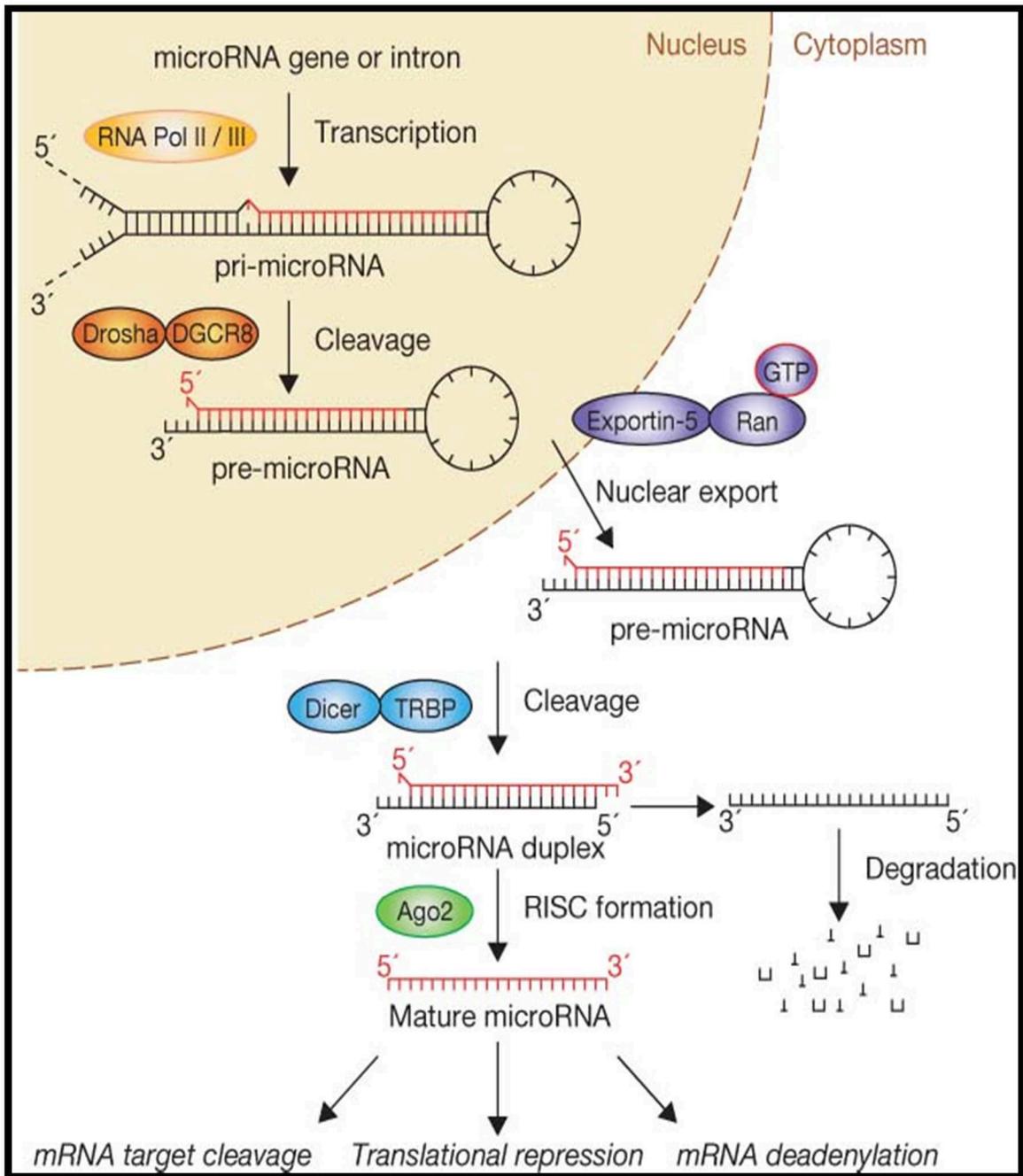


Figura 2: Formazione e Processamento dei miRNA

I pri-miRNA ripiegati sono convertiti nei miRNA maturi mediante un processo di maturazione sequenziale. Un'enzima nucleare detto Drosha taglia i pri-

miRNA in RNA a forcina più piccoli, detti precursori dei miRNA (pre-miRNA), lunghi circa 70 nucleotidi (Figura 3).

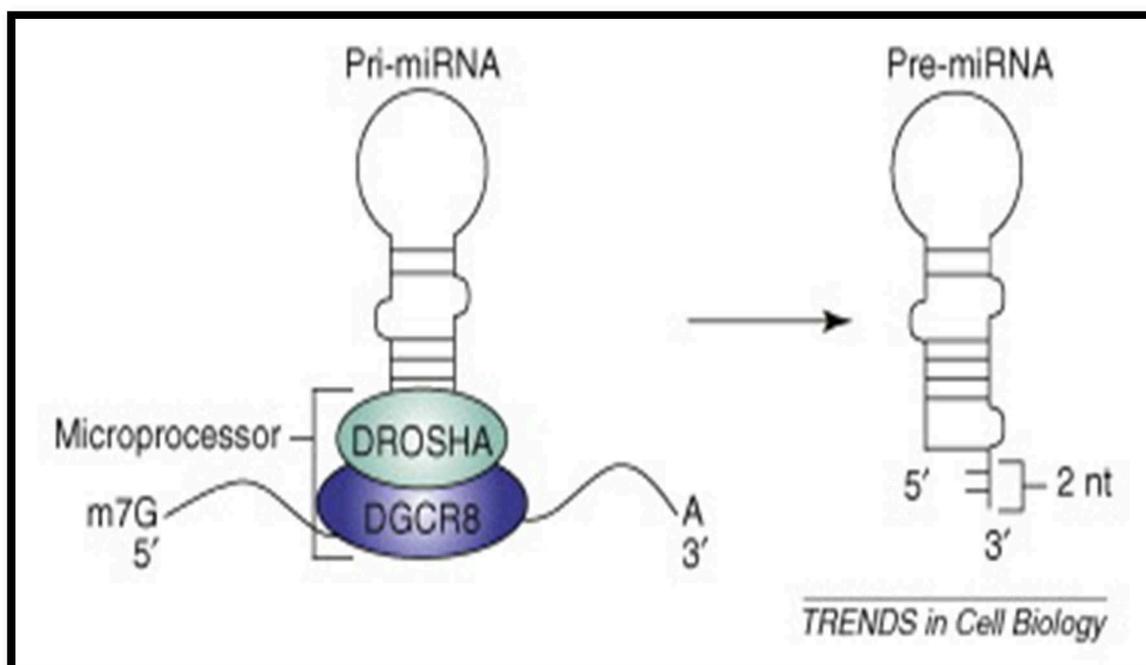


Figura 3

Questo processamento è svolto negli animali da un complesso proteico noto come il Microprocessor complex, che consiste nella nucleasi Drosha (RNAsi III) e nella proteina legante l'RNA a doppia elica chiamata Pasha.¹⁷⁸ Il processamento efficace dei pri-miRNA da Drosha richiede la presenza di esteso RNA a singolo filamento in entrambe le estremità della molecola a forcina.¹⁷⁹ I pre-miRNA vengono poi rapidamente esportati nel citoplasma dal fattore di esporto nucleare 5 il quale usa Ran-GTP come cofattore.

I pre-miRNA (a duplice filamento) sono poi processati in miRNA maturi nel citoplasma da interazioni con l'endonucleasi Dicer (una seconda RNAsi III), la quale, a sua volta, inizia la formazione del complesso di silenziamento dell'RNA (RISC)¹⁸⁰, il quale include come componenti di base le proteine Argonaute (Ago1-4 negli umani) (Figura 4).

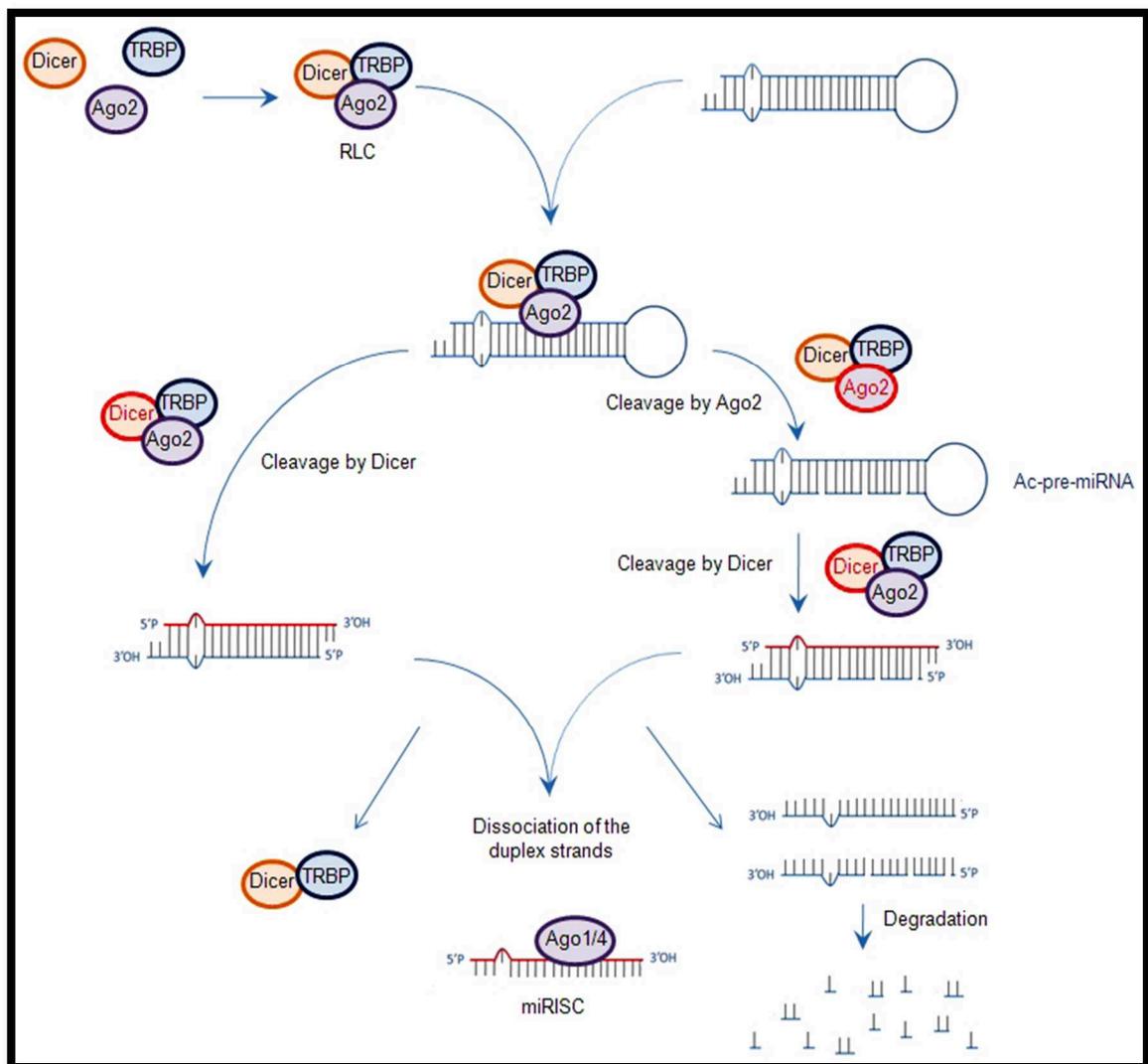


Figura 4

Il complesso RISC è responsabile del blocco della traduzione o della degradazione dell'RNA messaggero target del miRNA. Solo un filamento del miRNA duplex rimane stabilmente associata con il complesso RISC.

Questo filamento che diventa il miRNA maturo è conosciuto come filamento guida ed è selezionato dalle proteine argonaute sulla base della stabilità della sequenza terminale al 5'. Il filamento opposto, conosciuto come miRNA anti-guide o passenger strand, viene eliminato attraverso due meccanismi alternativi.

Quando i miRNA vengono caricati nel complesso RISC contenente Ago-2, l'unico Ago umano capace di tagliare l'mRNA, il passenger strand può essere tagliato. Alternativamente, un complesso RISC contenente qualsiasi proteina Ago può rimuovere il passenger strand attraverso un meccanismo di bypass che non richiede il clivaggio e verosimilmente comporta modificazioni conformazionali del duplex¹⁸¹⁻¹⁸³.

Dopo l'integrazione nel complesso RISC, le basi del miRNA si appaiono con le basi complementari presenti nell'mRNA target e inibiscono la traduzione o in alcuni casi inducono la degradazione dell'mRNA da parte delle proteine argonaute, i membri cataliticamente attivi del complesso RISC.¹⁸⁴

I miRNA agiscono come guide che dirigono RISC ai mRNA target i quali vengono successivamente clivati o silenziati nella traduzione.

L'entità della complementarietà tra un miRNA e il suo target determina il meccanismo della regolazione: la complementarietà completa induce degradazione mentre quella parziale il blocco della traduzione.

Non è ancora stato completamente chiarito come il complesso RISC localizzi i mRNA target nella cellula, benché sia stato dimostrato che questo processo non è accoppiato con la traduzione delle proteine da Mrna.¹⁸⁵

La via di processazione è differente per i miRNA che derivano dalle sequenze introniche; questi sono processati da Dicer ma non da Drosha.¹⁸⁶

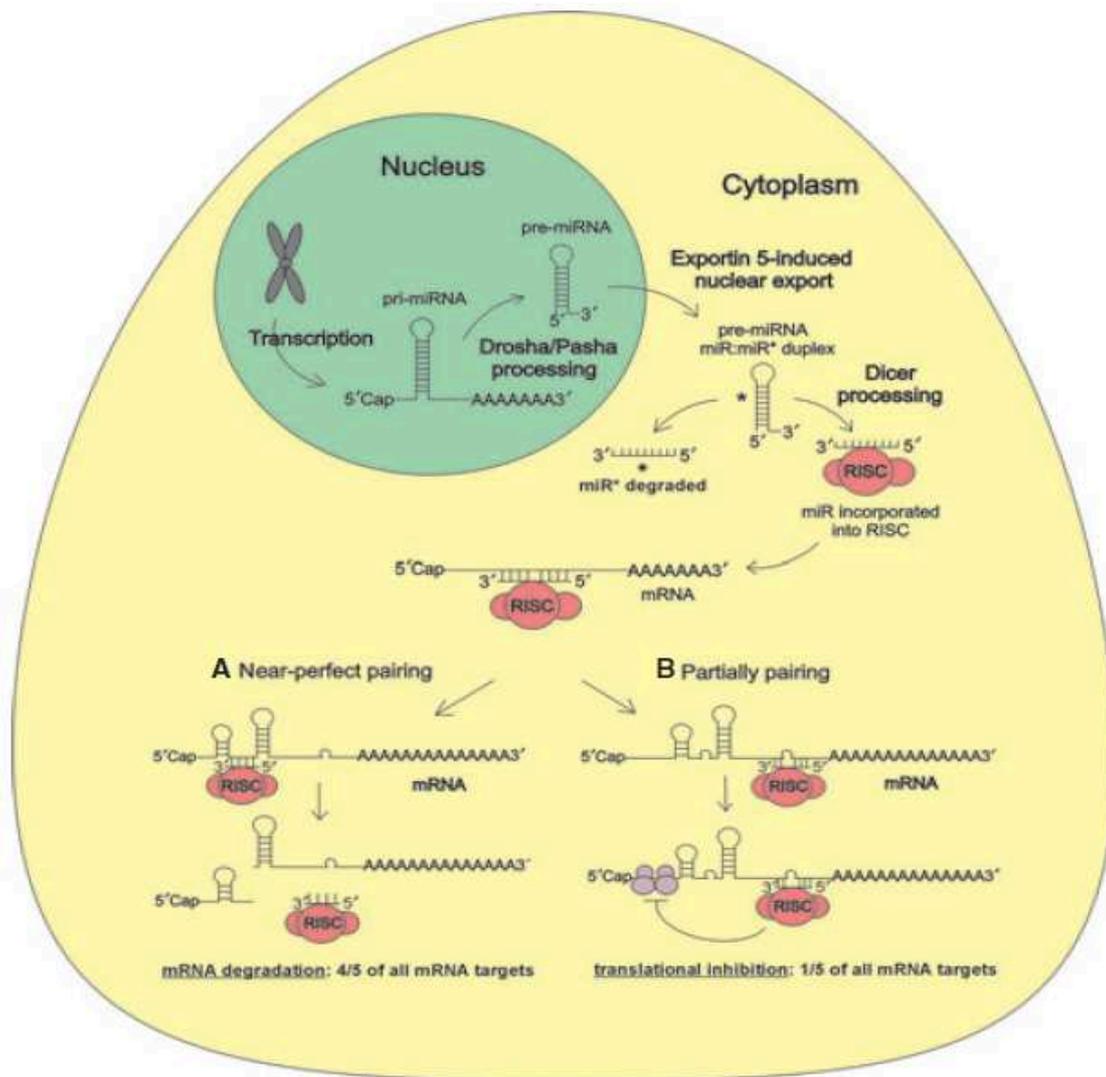


Figura 5: Biogenesi e meccanismo d'azione dei miRNA

3.3 – RELAZIONE TRA MICRO RNA E LINFOMI CUTANEI T

Negli ultimi anni vari lavori scientifici si sono soffermati sulla individuazione del profilo dei miRNA in tumori solidi ma anche in neoplasie ematologiche

rispetto ai controlli sani. Per esempio sono stati identificati i profili miRNA per la leucemia linfatica acuta e cronica, per la leucemia linfoblastica acuta a precursori delle cellule B, linfomi Hodgkin e non-Hodgkin e anche per la micosi fungoide e per i CTCL. Ballabio e collaboratori (2010) hanno riportato un ridotto livello di miR-342 e miR-223 nella sindrome di Sézary. Il miR-223 è un miRNA intergenico che si è dimostrato elevato nelle neoplasie a cellule T immature o blastiche, ma con una ridotta espressione in CTCL che è una neoplasia a cellule T mature. Nello studio di Ballabio e collaboratori si è dimostrata una ridotta espressione di miR-223 sia nel sangue sia nella cute di pazienti affetti da MF rispetto ai controlli sani e si è osservato un trend in diminuzione del miR223 all'avanzare dello stadio clinico.¹⁸⁷

Ralfkiaer et al (2011) hanno identificato specifici miRNA (miR-155,-203 e -205) nei CTCL che aiutano a differenziarli dalle dermatosi benigne.¹⁸⁸

Il miR-155 è uno dei più ben descritti miRNA ed è indispensabile per una funzionale risposta immune. Valori transitoriamente elevati di miR-155 sono stati osservati in differenti cellule immunitarie durante l'infiammazione e anche nei fibroblasti dermici, giocando un importante ruolo nella proliferazione di queste cellule.

L'espressione del miR-155 in CTCL è guidato dalla STAT5 che è espresso in modo aberrante nelle lesioni cutanee della MF. Il miR-155 oltre che venire

sovra espresso sia nelle cellule T maligne sia in quelle non maligne della MF come dimostrato dagli studi Kopp e collaboratori, è aumentato anche nella dermatite atopica, in alcuni pazienti con psoriasi, e nel melanoma, indicando l'importanza del potenziale effetto del miR-155 e delle citochine negli stati di infiammazione cronica cutanea e nella carcinogenesi.

Invece l'espressione del miR-126, che è un miRNA tumor-suppressor, è confinata alle cellule endoteliali e non viene espresso nelle cellule T con morfologia neoplastica.¹⁸⁹

Recentemente, si è osservata una sovra-espressione del miRNA-21 nei linfomi diffusi a grandi cellule e viene considerato come un fattore di rischio indipendente nella prognosi.¹⁹⁰⁻¹⁹² miRNA-21 è anche diagnostico come biomarker nel linfoma primario diffuso di grandi cellule B del sistema nervoso centrale.¹⁹³ In un modelli murini di linfoma a cellule B, la sovraespressione del miRNA-21 nella cellula ematopoetica è stato identificato come un fattore oncogenico.¹⁹⁴

Così, miRNA-21 potrebbe essere considerato come un potenziale biomarker diagnostico e prognostico per le neoplasie delle cellule B.

Quindi è chiaro che i miRNA sono alterati nella micosi fungoide e nei CTCL ma non si sa ancora quale ruolo queste alterazioni hanno nella oncogenesi e progressione della malattia.

Rimane ancora incerto se i miRNA siano degli innocenti bystanders che seguono le mutazioni oncogeniche primarie o se essi agiscano come iniziatori e guida della malattia.

STUDIO SPERIMENTALE

OBIETTIVO DELLO STUDIO

Il presente studio clinico prospettico caso-controllo è volto a valutare la presenza di specifici microRNA nel siero, nelle PBMC (cellule mononucleate periferiche) e nelle CAC in soggetti con linfoma cutaneo T primario vs soggetti sani, individuare e caratterizzare un loro possibile ruolo biologico nella patogenesi e progressione dei linfomi cutanei T e di identificare nuovi biomarker predittivi di progressione della malattia. Lo studio si basa sul seguente razionale scientifico: l'angiogenesi è coinvolta nello sviluppo e progressione di una grande varietà di disordini inclusi la retinopatia diabetica, la psoriasi, l'artrite reumatoide, la patologia cardiovascolare. Essa rappresenta inoltre un processo cruciale nella crescita e progressione dei tumori, correlandosi con il potenziale metastatico delle cellule neoplastiche. Per quanto riguarda l'angiogenesi nei linfomi cutanei T (CTCL) è stato dimostrato che l'aumento dell'angiogenesi e dell'espressione delle metalloproteinasi della matrice 2 e 9 correlano con la progressione della MF. Sebbene gli esatti

meccanismi dell'angiogenesi nei CTCL rimane ancora non chiaro, è appurato che le cellule T, i mastociti e i macrofagi sono capaci di produrre fattori dell'angiogenesi. Quindi l'incrementata formazione di capillari può essere indotta sia dalle cellule stesse del linfoma sia da cellule ospite tumore-associate. La scoperta, che i miRNA possano avere un ruolo centrale nella tumorigenesi umana, risulta di fondamentale importanza per lo sviluppo di nuovi marcatori diagnostici e bersagli terapeutici.

Quindi la valutazione di specifici miRNA e delle CAC nei linfomi cutanei T può essere utile per valutare quali pathway molecolari angiogenetici sono alterati in queste neoplasie e, in futuro, come la terapia possa contribuire al trattamento controllando l'espressione dei fattori angiogenetici.

MATERIALI E METODI

Il presente studio ha coinvolto:

- 10 pazienti con MF stadio IB, oppure stadio IIA con interessamento della superficie cutanea maggiore del 10%.
- 10 pazienti sani comparabili per età e sesso

La popolazione in studio sarà conforme ai criteri di inclusione ed esclusione menzionati sotto.

3.1.1 Criteri di inclusione

- Soggetti con MF (confermata all'esame istopatologico) stadio IB, oppure stadio IIA (secondo il sistema di stadiazione TNM) con interessamento della superficie cutanea maggiore del 10%.
- ECOG Performance Status pari a 0 o 1 al baseline [appendice 1]
- Maschi o femmine di età superiore ai 18 anni [inclusi]
- Consenso informato scritto firmato prima dell'inizio del protocollo di studio.

3.1.2 Criteri di Esclusione

- Pazienti che sono già in trattamento con farmaci per la MF. In particolare:
 - Trattamenti topici per la MF nelle 3 settimane precedenti l'inizio dello studio.
 - PUVA terapia nelle 4 settimane precedenti l'inizio dello studio.
 - Altre terapie sistemiche [es. INF, alitretinoina, fotoferesi extracorporea..] nelle 4 settimane precedenti l'inizio dello studio.
- Gravidanza, allattamento
- Infezioni batteriche, virali o fungine in atto.
- Processi infiammatori, immunomediati, cardiovascolari e cerebrovascolari in atto.

- Altre condizioni mediche clinicamente rilevanti che possono mettere a rischio la partecipazione del paziente allo studio [incapacità di tornare alle visite di controllo, impossibilità di completare lo studio, condizioni psichiche che rendono il paziente incapace di comprendere la natura, lo scopo e le possibili conseguenze dello studio].

SEPARAZIONE DELLE CELLULE MONONUCLEATE DAL SANGUE PERIFERICO

Le cellule mononucleate del sangue periferico, cioè linfociti e monociti, o PBMC (Peripheral Blood Mononuclear Cells) sono state isolate mediante stratificazione e successiva centrifugazione su gradiente di Ficoll (Ficoll-Paque Plus, $d=1,077$ g/ml, GE Healthcare BioSciences, Uppsala Sweden). L'intera metodica è stata effettuata sterilmente, lavorando sotto una cappa a flusso laminare ed utilizzando materiale e strumentazione sterile. Il metodo sfrutta la diversa densità delle cellule mononucleate rispetto agli altri elementi del sangue. Linfociti, monociti e piastrine, avendo una densità minore si concentrano sopra lo strato di Ficoll, presente sul fondo di una provetta, al contrario i globuli rossi (RBC) ed i granulociti, caratterizzati da una maggiore densità si raccolgono sul fondo, al di sotto del Ficoll. Il sangue intero con

anticoagulante viene dapprima diluito 1:2 con un buffer salino, come il D-PBS, viene quindi lentamente stratificato sul Ficoll, e successivamente centrifugato per 30 min. a 450g, a temperatura ambiente e senza freno. La centrifugazione causa la separazione dei diversi tipi cellulari presenti nel sangue in base alla loro densità.

I linfociti e i monociti si localizzano all'interfaccia tra il plasma ed il Ficoll, formando un anello biancastro opaco che prende il nome di "buffy coat"

L'anello viene prelevato con cura utilizzando una pipetta Pasteur di vetro sterile, avendo l'accortezza di non prelevare nè il plasma contenente le piastrine, che si trova al di sopra dell'anello, nè il Ficoll che si trova al di sotto. I linfomonociti vengono quindi sottoposti a tre lavaggi successivi sempre con D-PBS, precisamente un primo lavaggio di 15 min. e due lavaggi successivi di 10 min. centrifugando sempre a 450g., a temperatura ambiente e con il freno. Questi lavaggi sono necessari per eliminare gli elementi contaminanti, come piastrine e globuli rossi ed eventuali residui di Ficoll.

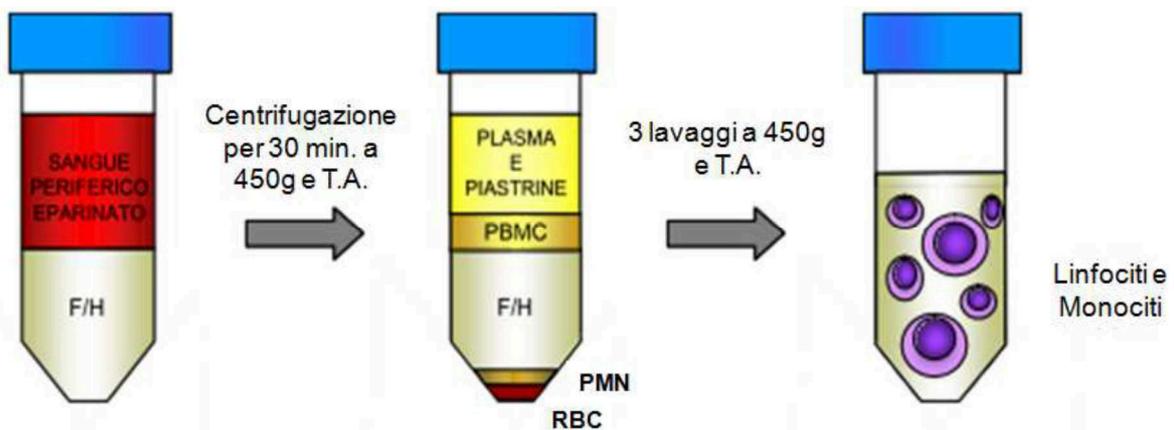


Figura 6: Separazione delle cellule mononucleate dal sangue periferico mediante stratificazione su gradiente di Ficoll.

Le cellule mononucleate così ottenute vengono risospese nel mezzo opportuno e contate nella camera di Burker. Aliquote corrispondenti a 5 milioni vengono utilizzate per la coltura delle cellule angiogeniche circolanti.

ISOLAMENTO DELLE CELLULE ANGIOGENETICHE CIRCOLANTI (CAC)

Per isolare le cellule angiogeniche circolanti, aliquote di cellule mononucleate (5×10^6 cellule) sono state risospese in 1 ml di un medium specifico denominato medium endoteliale basale o EBM (Endothelial Basal Medium), supplementato con opportuni fattori di crescita (EGM-2 SingleQuots) e siero fetale di vitello al 20% (EBM, Clonetics-Lonza, Walkersville, MD USA; FCS Foetal Calf Serum origin Australia, GIBCO InVitrogen, Carlsbad, California). Le cellule

sono state seminate in pozzetti ricoperti da fibronectina di una piastra da 24 (Fibronectin-coated plate 24 wells BD Biosciences, Mountain View, CA) e mantenute in incubatore a 37 °C e al 5% di CO₂ per 4 giorni. Dopo questo periodo in coltura le cellule non aderenti sono state rimosse lavando ciascun pozzetto con il D-PBS, mentre le cellule adese, previa caratterizzazione, sono state utilizzate per l'estrazione del DNA e per ottenere il lisato proteico.

CARATTERIZZAZIONE DELLE CELLULE ANGIOGENETICHE CIRCOLANTI

Per confermare il fenotipo endoteliale delle CAC sono stati utilizzati due marcatori specifici: il DiI-Ac-LDL e il UEA-FITC.

Il DiI-Ac-LDL (1,1'-dioctadecyl-3,3,3',3' tetramethylindocarbocyanine-labeled acetylated LDL -Molecular Probes, Eugene, OR) è un complesso di lipoproteine a bassa densità (LDL) acetilate e marcate con un derivato della carbocianina (1,1'-dioctadecile-3,3,3',3'-tetrametilindocarbocianina). Questo complesso lipoproteico viene usato come marcatore di cellule endoteliali e di tutti i tipi cellulari che esprimono recettori specifici per le LDL modificate, assorbe a 554 nm ed emette a 571 nm, quindi le cellule marcate appaiono rosse.

Il secondo marcatore utilizzato è UEA-FITC (Ulex Europaeus Agglutinin-

Sima, St. Louis, MO), un complesso formato da lectine con attività agglutinante, ricavate dall' *Ulex Europaeus*, coniugate con fluorescina isotiocianato (FITC). La fluorescina assorbe a 490nm ed emette a 520 nm, quindi le cellule marcate da questo complesso appaiono verdi. In breve, per consentire la captazione delle LDL acetilate, le cellule sono state incubate con Dil-Ac-LDL (2.5 µg/ml) per 2 ore a 37 °C e poi fissate con paraformaldeide al 2% per 15 minuti. Dopo due lavaggi successivi, le cellule sono state fatte reagire con UEA-FITC (10µg/ml) per 1 ora. Le cellule sono state quindi osservate al microscopio ottico a fluorescenza. Le cellule positive per entrambi i marcatori, cioè marcate sia in rosso che in verde, sono state identificate come CAC o "early EPC". Più del 90% delle cellule aderenti mostravano queste caratteristiche.

VALUTAZIONE NUMERICA DELLE EPC CIRCOLANTI IN CITOFLUORIMETRIA

La quantificazione delle cellule endoteliali progenitrici circolanti è stata eseguita in citofluorimetria (EPICS XL Coulter, Miami, Florida) utilizzando

anticorpi monoclonali verso il CD34 e verso il recettore-2 del fattore di crescita dell'endotelio vascolare.

1×10^6 cellule mononucleate sono state marcate contemporaneamente con l'anti-CD34 coniugato con isotiocianato di fluorescina (FITC-conjugated anti-human CD34; Becton Dickinson, San Jose, California) e con l'anti-VEGR-2 coniugato con ficoeritrina (PE-conjugated anti-human VEGFR2; R&D System Inc, Minneapolis), incubando per 40 minuti a 4°C ed al buio. Come controlli e per escludere eventuali legami aspecifici, sono stati utilizzate cellule marcate con anticorpi isotipici coniugati con fluorescina e ficoeritrina.

Dopo il periodo d'incubazione le cellule sono state lavate, risopese in D-PBS ed analizzate al citofluorimetro. Per l'acquisizione dei risultati è stato effettuato un gate sui linfomonociti nel citogramma della popolazione, che utilizza il "side scatter" ed il "forward scatter", allo scopo di escludere elementi cellulari contaminanti e i detriti. Inoltre per ciascun campione sono stati misurati 300.000 eventi e ciascuna misura è stata ripetuta consecutivamente per 3 volte. Il numero delle cellule CD34+/VEGFR2+ è stato calcolato come valore medio e quindi rapportato a 1×10^6 PBMC.

ISOLAMENTO RNA DALLE CAC

L'RNA totale dalle CAC è stato isolato usando un kit di purificazione dell'RNA (Norgen Biotek, Thorold, ON, Canada)che permette di isolare sia i miR che una maggiore varietà di RNA. L'RNA è stato conservato a -80° prima dell'uso.

RT-PCR QUANTITATIVA DEI MICRO RNA MATURI

I valori di miR ottenuti con PCR real-time quantitativa sono stati normalizzati usando RNA nucleolare (RNU 6B). L'espressione di miR146a e di RNU6B umani è stata quantificata usando TaqMan MicroRNA assay (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), con alcune modificazioni. Brevemente, l'RNA totale è stato retrotrascritto con il kit di retrotrascrizione TaqMan MicroRNA; 5 µl di RT mix conteneva 1 µl di ogni miR-specifico dei primer ad ansa delle cellule staminali, 1,67 µl di input RNA, 0,4 µl di 10 mM dNTPs, 0,3 µl di trascrittasi inversa, 0,5 µl di 10 x buffer, 0,6 µl di inibitore della RNasi diluito 1:10, e 0.5 µl di acqua. La miscela è stata incubata a 16° per 30 min, a 42° per 30 min, ed a 85° per 5 min. Successivamente RT-qPCR è stata eseguita in 20 µl di miscela di PCR contenente 1 µl di 20 x TaqMan MicroRNA assay -

che a sua volta conteneva primer PCR e sonde (5'-FAM)- 10 microl di 2 x TaqMan Universal PCR Master Mix No AmpErase UNG (Applied Biosystem), e 5 μ l di prodotto di trascrizione inversa. La reazione è stata prima incubata a 95° per 2 min seguita da 40 cicli a 95° per 15 s ed a 60° per 1 min. I dati sono stati analizzati con una macchina Opticon Monitor 2 RT-PCR (MJR, Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA), con l'impostazione di una soglia comparativa automatica (C_t) per l'adattamento ai valori di base. Le soglie di rilevamento sono state fissate a 35 C_t . La quantità relativa di miR-146a è stata calcolata utilizzando il metodo della C_t con $\Delta C_t = C_t (\text{MiR-146a}) - C_t (\text{RNU6B})$.

ESTRAZIONE DELL'RNA DAL PLASMA

L'estrazione dell'RNA è stata eseguita con Total RNA purification kit della Norgen Biotek Corporation. Questo è un metodo rapido per isolare e purificare tutti gli RNA provenienti da culture cellulari, campioni tissutali, sangue, batteri, lieviti, funghi, piante e virus.

Questo tipo di kit permette di isolare tutti i tipi di RNA: dai grandi RNA messaggeri e ribosomiali, fino ai microRNA. I campioni di sangue venoso periferico di tutti i pazienti sono stati raccolti in EDTA (Venoject, Terumo Europe NV). In questo studio è stato estratto l'RNA totale a partire da 100 μ l

di plasma congelato a -80°C . Una volta portato a temperatura ambiente e scongelato viene centrifugato per 10 minuti a 10.000 RPM in centrifuga refrigerata a 4°C . I 100 μl di plasma si trasferiscono in una provetta da 1,5 ml stando attenti a non prelevare vari detriti o filamenti di fibrina che possono trovarsi nel fondo della provetta dopo la centrifugazione. Si procede come di seguito:

- ✓ Ai 100 μl di plasma si aggiungono 350 μl di soluzione di lisi (Lysis Solution) presente nel kit e si procede con la miscelazione tramite vortex per 15 secondi;
- ✓ Si aggiungono 200 μl di etanolo al 95-100% e si miscela ancora per altri 10 secondi;
- ✓ Si assembla ogni colonnina con una “collection tube” presente nel kit;
- ✓ Tutto il materiale (650 μl) viene trasferito nella colonnina e centrifugato per 1 minuto a 13.000 RPM;
- ✓ Il materiale raccolto nella collection tube viene eliminato e riassembleato con la colonnina corrispondente;
- ✓ Si aggiungono 400 μl di soluzione di lavaggio (Wash Solution) e si centrifuga per 1 minuto a 13.000 RPM;
- ✓ Si ripete il lavaggio con la Wash Solution per altre due volte;

- ✓ Centrifugare per altri due minuti a 13.000 RPM con il fine di asciugare bene la resina della colonnina;
 - ✓ Buttare la collection tube e assemblare la colonnina all'elution tube presente nel kit;
 - ✓ Aggiungere alla colonnina 50 μ l di soluzione d'eluizione (Elution Solution);
 - ✓ Centrifugare per 2 minuti alla velocità di 2.000 RPM in modo che la soluzione si adagi bene sulla resina della colonnina;
 - ✓ In fine centrifugare per 1 minuto a 13.000 RPM;
 - ✓ Buttare la colonnina e mettere l'Elution tube nel congelatore a -80°C;
- Con questo procedimento si estrae in modo facile e rapido tutto l'RNA di un campione.

ANALISI STATISTICA

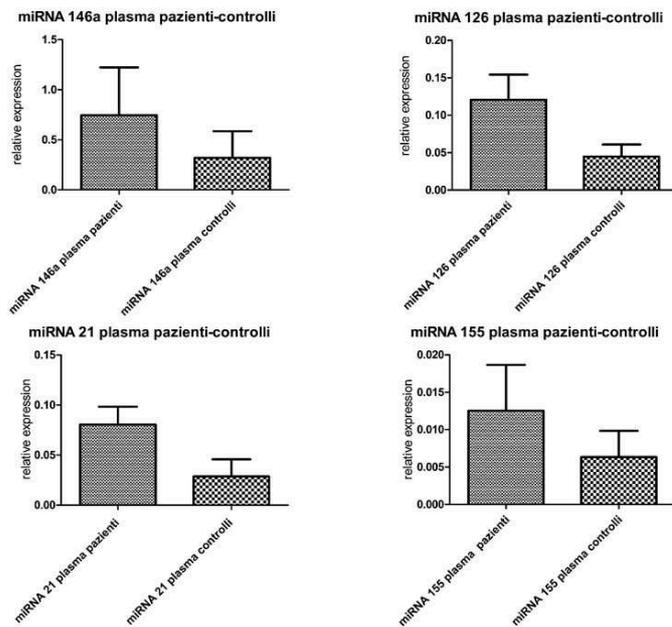
I dati ottenuti sono stati analizzati mediante l'uso del Graph-Pad software (versione 5.0, El Camino Real, San Diego, CA). La media e la deviazione standard (DS) di ciascun parametro considerato sono stati valutati e confrontati mediante test parametrici e non parametrici (Mann-Whitney test).

Un livello di probabilità pari a 0,05 è stato scelto per valutare la significatività statistica

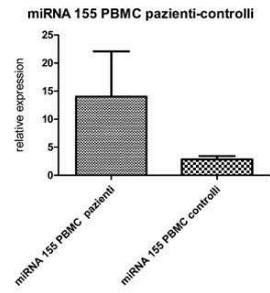
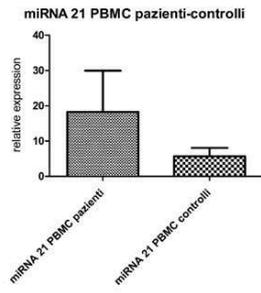
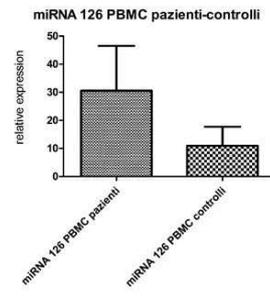
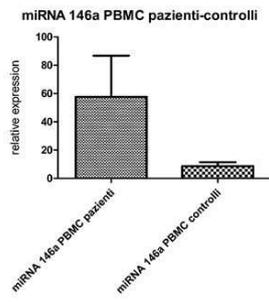
RISULTATI

Il nostro studio è stato effettuato su 10 pazienti di età media pari a $58,1 \pm 14,79$, affetti da MF stadio IB, oppure stadio IIA (secondo il sistema di stadiazione TNM) con interessamento della superficie cutanea maggiore del 10%, non sottoposti a terapia topica, sistemica o a PUVA terapia. Il gruppo di controllo è costituito da 10 soggetti di età media pari a $49,8 \pm 12,8$.

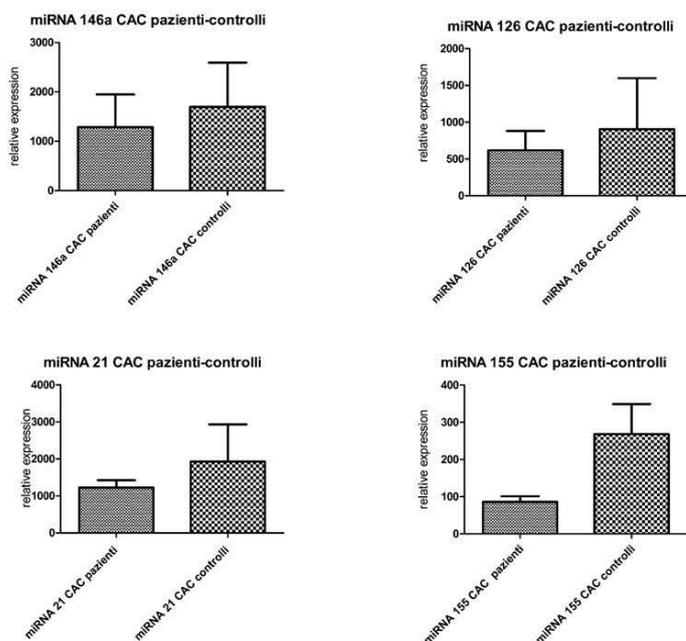
Sia nei pazienti sia nei controlli sono stati valutati nel plasma i miR-146a ($p=0,0192$), miR-21 ($p=0,0098$), miR-126 ($p=0,0185$) e miR-155 ($p=0,0378$) con differenza statisticamente significativa per tutti i miRNA.



Sia nei pazienti sia nei controlli sono stati valutati nelle PBMC i miR-146a ($p=0,0464$), miR-21 ($p=0,4807$), miR-126 ($p=0,2359$) e miR-155 ($p=1$) con differenza statisticamente significativa solo per il miR-146a.



Inoltre, sia nei pazienti che nei controlli, sono stati analizzati nelle CAC i miR-146a ($p=0,4363$), miR-21 ($p=0,6965$), miR-126 ($p= 0,8125$), e il miR-155 ($p=0,0007$) con differenza statisticamente significativa solo per il miR-155.



DISCUSSIONE

La micosi fungoide è la forma più comune di linfoma cutaneo delle cellule T. Le cellule neoplastiche presumibilmente provengono da cellule T mature di memoria, caratterizzate da homing cutaneo, e la malattia è istologicamente caratterizzata dalla presenza di infiltrati epidermici e dermici di cellule T atipiche con nuclei irregolari (cerebriformi). Le prime fasi sono caratterizzate da macchie persistenti o placche, ma la malattia può avanzare a lesioni tumorali

e può trasformarsi in linfomi a cellula T capaci di diffondere nei linfonodi e negli organi interni.¹⁹⁵

La patogenesi di MF è in gran parte sconosciuta, ma sono stati messi in causa la persistente stimolazione dell'antigene, l'espressione aberrante delle chinasi SRC, la regolazione anomala del segnale dei recettori citochinici, la disregolazione delle vie apoptotiche e le alterazioni epigenetiche.¹⁹⁶⁻¹⁹⁸ Più recentemente, è anche stato suggerito un ruolo centrale all'espressione aberrante dei microRNA.

I miRNA sono importanti per il normale sviluppo e manutenzione dell'omeostasi nei tessuti adulti e numerose indagini hanno dimostrato che i profili miRNA modificati sono coinvolti nella patogenesi di entrambi, i linfomi e i tumori solidi.^{199,200}

Vari studi indipendenti hanno dimostrato che alcuni miRNA sono up-regolati (miR-155, miR-21, miR-199/214) o down-regolati (miR-223, miR-150) nei CTCL e agiscono come onco-miRNA o miRNA onco-soppressori capaci di promuovere la proliferazione, ridurre l'apoptosi o aumentare l'invasione.²⁰¹⁻²⁰⁸

Inoltre i miRNA sembrano essere un potenziale strumento diagnostico nei CTCL.^{203,209}

In realtà, gli studi sui miRNA nei CTCL si sono focalizzati, tranne poche eccezioni esclusivamente su forme avanzate di MF o su SS.

Attualmente sono disponibili pochi dati relativi all'espressione dei miRNA nelle fasi precoci della MF.

Nel nostro studio abbiamo preso in esame i miR-155, miR-146a, miR-21, miR-126, i quali, sono stati valutati nel plasma, nei PBMC e nelle CAC in 10 pazienti in stadio precoce (IB e IIA) e in 10 controlli.

Si è osservato che i valori di miRNA nel plasma e nelle PBMC risultavano tutti più alti nei pazienti rispetto ai controlli, in modo statisticamente significativo solo per il plasma e per il miR-146a nelle PBMC. Un andamento opposto si è osservato invece nelle CAC dove abbiamo ottenuto valori più bassi nei pazienti rispetto ai controlli anche se in modo non statisticamente significativo.

Gli opposti valori che si ottengono tra plasma e CAC relativamente ai miRNA studiati può essere il risultato di un meccanismo di feedback che regola la produzione di tali miRNA nelle CAC in relazione ai loro livelli plasmatici.

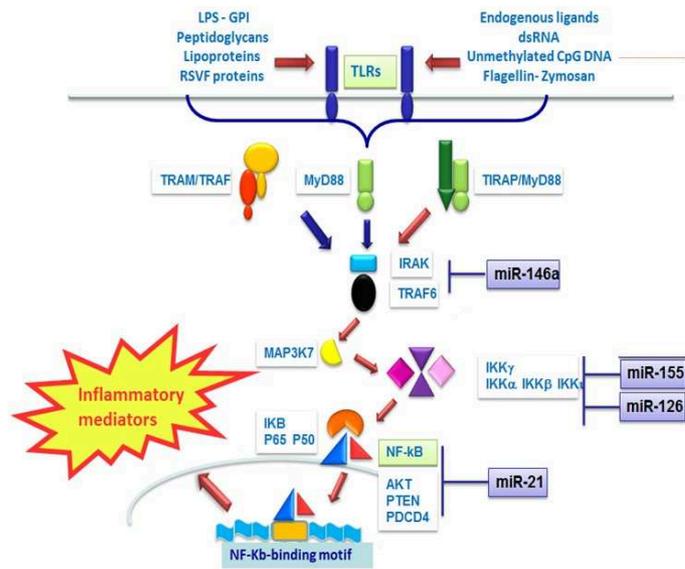


Figura 7: funzione dei miRNA nei linfomi cutanei T

La funzione del miR-155 è stata studiata nei CTCL con considerevole dettaglio. È noto che il miR-155 è centrale per la normale differenziazione delle cellule T e può agire come un onco-miRNA sia nell'induzione del linfoma murino sia del linfoma umano, includendo in aggiunta alla sua funzione nei CTCL, anche quella nei Linfomi di Hodgkin e diversi tipi di linfoma a cellule B.^{203,209} Poiché il miR-155 nei CTCL promuove la proliferazione, viene espresso in situ, ed è guidato da un segnale trasduttore e attivatore della trascrizione 5 (STAT5),^{206,210} è concepibile che il miR-155 sia effettivamente coinvolto nella progressione di tutti gli stadi della malattia.

Il miR-146a ed è noto per la sua attività anti-infiammatoria in quanto alcuni dei target molecolari fanno parte della cascata di attivazione pro-infiammatoria che porta all'attivazione di NF-Kb. Fra i target dimostrati nelle cellule endoteliali e nei monociti ricordiamo TRAF6 e IRAK1. Inoltre, esso e altri miRNA quali il miR-342-3p, miR-342-5p, let-7i, miR-181a, miR-425, miR-23b, let-7b, e miR-221 sono stati identificati come down-regolati nelle forme avanzate di MF e nella SS ^{202,203}, suggerendo un ruolo presunto di questi miRNA sia in fase precoce di trasformazione maligna sia nella progressione della malattia. Altri miRNAs down-regolati sono stati associati a stadi avanzati di MF o SS, quali miR-15b, miR-17, miR-21, miR-25, miR-31, miR-92a-1*, miR-93, miR-106b*, miR-107, miR-191, miR-425, and miR-769-5p. ^{202,203}. A differenza dei dati della letteratura, dove il miR-146a era down-regolato negli stadi avanzati della malattia, nel nostro studio il miR-146a, nel plasma, è stato trovato più alto nei pazienti rispetto ai controlli con una differenza statisticamente significativa. Questo probabilmente perché tutti i pazienti da noi studiati erano tutti in fase precoce di malattia. Inoltre gli aumentati livelli circolanti di miR-146a potrebbero essere indicativi dello stato pro-infiammatorio presente nei pazienti con fase iniziale di MF sostenuto soprattutto dall'aumento dell'attivazione IL-dipendente di Jak3/STAT3.

Per quanto riguarda il miR-21, è stato dimostrato che anche esso è down-regolato negli stadi avanzati sia di MF sia di SS ed è indotto dalla STAT3²¹³, che è attivata costantemente nella MF.²¹⁴ Inoltre, come per il miR-155, i suoi valori sono associati a progressione di malattia e scarsa prognosi per i pazienti. Il miR-21 ha come bersaglio un noto tumor-suppressor (PTEN) che è down-regolato nella SS e in misura minore nella MF in stadio avanzato e agisce al fine di inibire l'apoptosi indotta dalla Fosfatidilinositolo-4,5-bisfosfato 3-chinasi / AKT-chinasi. Nel nostro studio il miR-21 è stato trovato più alto nel plasma dei pazienti rispetto ai controlli, sempre giustificando il risultato con il fatto che i nostri pazienti erano in uno stadio precoce di malattia a differenza degli studi della letteratura che sono stati eseguiti in stadi avanzati.

Il miR-126 è coinvolto nella modulazione dei processi di angiogenesi, rigenerazione endoteliale, emostasi e infiammazione: questi meccanismi di comunicazione intercellulare potrebbero essere importanti per l'omeostasi vascolare dei vari tessuti.

La riduzione dei livelli di miR-126 nelle CAC dei pazienti e la tendenza ad un aumento dei livelli circolanti negli stessi pazienti potrebbe quindi essere associata ad alterazioni dei fenomeni di omeostasi vascolare osservati in questi pazienti.

Mentre è ormai ben consolidata l'espressione del miR-126 nelle cellule endoteliali, il ruolo di tale miRNA nel cancro è meno chiaro. Infatti dalla letteratura si evince che il miR-126 è altamente espresso nelle cellule endoteliali mentre manca nei linfociti atipici, in linea con i recenti risultati che vedono il miR-126 come soppressore tumorale nei tumori ematologici.

miRNA	Funzione	Target	Up/Down Regulated in letteratura	Voce bibliografica	Nel nostro studio
miRNA-155	Promuove la proliferazione Associato a progressione e scarsa prognosi	SHIP1 PIP3 AKT IKK	Up regulated	Tagawa H (2013) Narducci MG (2011)	Up regulated nel plasma e nelle PBMC Down regulated nelle CAC
miRNA-146a	Effettore specifico dei Th-1 Regolatore della risposta infiammatoria (IL-8 e CCL5/RANTES)	IRAK1 TRAF6	Down regulated nelle forme avanzate	Narducci MG (2011) Van Kester MS (2011)	Up regulated nel plasma e nelle PBMC Down regulated nelle CAC
miRNA-21	Riduce l'apoptosi Soppressore dell'attivazione della via infiammatoria nelle cellule mieloidi Associato a progressione e scarsa prognosi	PTEN AKT NF-KB PDCD4	Down regulated nelle forme avanzate	Tagawa H (2013) Narducci MG (2011) Van der Fits L (2011)	Up regulated nel plasma e nelle PBMC Down regulated nelle CAC
miRNA-126	Promuove la produzione di progenitori a partire dalle cellule staminali ematopoietiche Coinvolto nell'angiogenesi e rigenerazione endoteliale	HOXA9 PLK2 IKK	Up regulated	Kopp KL (2013)	Up regulated nel plasma e nelle PBMC Down regulated nelle CAC

Figura 8: miRNA alterati nei linfomi cutanei T

CONCLUSIONI

I miRNA presi in esame nel nostro studio sono probabilmente implicati nel meccanismo patogenetico e nelle alterazioni infiammatorie e vascolari della

MF testimoniato dal comune trend di modificazione di tali miRNA nel plasma, nei PBMC e nelle CAC tra malato e controllo.

In realtà sono pochissimi gli studi che hanno affrontato il potenziale valore di profiling dei miRNA per la previsione del rischio nei CTCL. Sarebbe utile indagare i miRNA in relazione allo stadio di progressione della malattia per identificare degli elementi predittivi di progressione o meno della MF, suggerendo un ruolo per miRNA disregolati sia nella trasformazione precoce maligna sia nella progressione della malattia.

Sarebbe anche interessante valutare come i trattamenti sistemici possano modificare i livelli dei miRNA sia circolanti sia intracellulari e se questi fenomeni siano specifici per i vari tipi cellulari.

La mancanza di significatività statistica per molti dei dati ottenuti nello studio è probabilmente da attribuire alla ridotta numerosità campionaria.

Saranno quindi necessari ulteriori e più ampi studi per confermare i nostri risultati e per poter considerare i miRNA come potenziali markers o validi bersagli molecolari di risposta alla terapia antitumorale.

BIBLIOGRAFIA

1. Willemze R, Jaffe ES, Burg G, Cerroni L, Berti E, Swerdlow SH, Ralfkiaer E, Chimenti S, Diaz-Perez JL, Duncan LM, Grange F, Harris NL, Kempf W, Kerl H, Kurrer M, Knobler R, Pimpinelli N, Sander C, Santucci M, Sterry W, Vermeer MH, Wechsler J, Whittaker S, Meijer CJ. WHO-EORTC classification for cutaneous lymphomas. *Blood*. 2005; 105:3768–3785.
2. Willemze R, Kerl H, Sterry W et al. EORTC classification for primary cutaneous lymphomas: a proposal from the Cutaneous Lymphoma Study Group of the European Organization for Research and Treatment of Cancer (EORTC). *Blood* 1997;90:354-371.
3. Aster J, Kumar V. Malattie dei globuli bianchi, linfonodi, milza e timo, in *Le basi patologiche delle malattie di Robbins*, 6° ed., Cotran SR, Kumar V, Collins T (eds), Piccin, 2000.
4. Criscione VD, Weinstock MA. Incidence of cutaneous T-cell lymphoma in the United States, 1973–2002. *Arch Dermatol*. 2007; 143:854–859.
5. Bradford PT, Devesa SS, Anderson WF, Toro JR. Cutaneous lymphoma incidence patterns in the United States: a population-based study of 3884 cases. *Blood*. 2009; 113:5064–5073.
6. Agar NS, Wedgeworth E, Crichton S, Mitchell TJ, Cox M, Ferreira S, Robson A, Calonje E, Stefanato CM, Wain EM, Wilkins B, Fields PA, Dean A, Webb K, Scarisbrick J, Morris S, Whittaker SJ. Survival outcomes and prognostic factors in mycosis fungoides/Sezary syndrome: validation of the revised International Society for Cutaneous Lymphomas/European Organisation for Research and Treatment of Cancer staging proposal. *Journal of Clinical Oncology*. 28:4730–4739.
7. Whittemore AS, Holly EA, Lee IM, Abel EA, Adams RM, Nickoloff BJ, Bley L, Peters JM, Gibney C. Mycosis fungoides in relation to environmental exposures and immune response: a case-control study. *J Natl Cancer Inst*. 1989; 81:1560–1567.
8. Magro CM, Crowson AN, Kovatich AJ, Burns F. Drug-induced reversible lymphoid dyscrasia: a clonal lymphomatoid dermatitis of memory and activated T cells. *Hum Pathol*. 2003; 34:119–129. [PubMed: 12612879]

9. Jahan-Tigh RR, Huen AO, Lee GL, Pozadzides JV, Liu P, Duvic M. Hydrochlorothiazide and cutaneous T cell lymphoma: prospective analysis and case series. *Cancer*. 2013; 119:825–831.
10. Hodak E, Klein T, Gabay B, Ben-Amitai D, Bergman R, Gdalevich M, Feinmesser M, Maron L, David M. Familial mycosis fungoides: report of 6 kindreds and a study of the HLA system. *J Am Acad Dermatol*. 2005; 52:393–402.
11. Hodak E, Lapidot M, Kohn K, David D, Brautbar B, Kfir K, Narinski N, Safirman S, Maron M, Klein K. Mycosis fungoides: HLA class II associations among Ashkenazi and non-Ashkenazi Jewish patients. *Br J Dermatol*. 2001; 145:974–980. [PubMed: 11899152]
12. Jackow CM, McHam JB, Friss A, Alvear J, Reveille JR, Duvic M. HLA-DR5 and DQB1*03 class II alleles are associated with cutaneous T-cell lymphoma. *J Invest Dermatol*. 1996; 107:373–376.
13. Tuyp E, Burgoyne A, Aitchison T, MacKie R. A case-control study of possible causative factors in mycosis fungoides. *Arch Dermatol*. 1987; 123:196–200.
14. Wohl Y, Tur E. Environmental risk factors for mycosis fungoides. *Curr Probl Dermatol*. 2007; 35:52–64.
15. Morales Suarez-Varela MM, Olsen J, Kaerlev L, Guenel P, Arveux P, Wingren G, Hardell L, Ahrens W, Stang A, Llopis-Gonzalez A, Merletti F, Guillen-Grima F, Johansen P. Are alcohol intake and smoking associated with mycosis fungoides? A European multicentre case-control study *Eur J Cancer*. 2001; 37:392–397.
16. Morales-Suarez-Varela MM, Olsen J, Johansen P, Kaerlev L, Guenel P, Arveux P, Wingren G, Hardell L, Ahrens W, Stang A, Llopis A, Merletti F, Guillen-Grima F, Masala G. Occupational sun exposure and mycosis fungoides: a European multicenter case-control study. *J Occup Environ Med*. 2006; 48:390–393.
17. Clark RA, Chong B, Mirchandani N, Brinster NK, Yamanaka K, Dowgiert RK, Kupper TS. The vast majority of CLA+ T cells are resident in normal skin. *J Immunol*. 2006; 176:4431–4439.
18. Reiss Y, Proudfoot AE, Power CA, Campbell JJ, Butcher EC. CC chemokine receptor (CCR)4 and the CCR10 ligand cutaneous T cell-attracting chemokine (CTACK) in lymphocyte trafficking to inflamed skin. *J Exp Med*. 2001; 194:1541–1547.
19. Homey B, Alenius H, Muller A, Soto H, Bowman EP, Yuan W, McEvoy L, Lauerma AI, Assmann T, Bunemann E, Lehto M, Wolff H, Yen D, Marxhausen H, To W, Sedgwick J, Ruzicka T, Lehmann P, Zlotnik A.

- CCL27-CCR10 interactions regulate T cell-mediated skin inflammation. *Nat Med.* 2002; 8:157–165.
20. Watanabe R, Gehad A, Yang C, Scott LL, Teague JE, Schlapbach C, Elco CP, Huang V, Matos TR, Kupper TS, Clark RA. Human skin is protected by four functionally and phenotypically discrete populations of resident and recirculating memory T cells. *Science translational medicine.* 2015; 7:279ra239.
 21. Frost EL, Kersh AE, Evavold BD, Lukacher AE. Cutting Edge: Resident Memory CD8 T Cells Express High-Affinity TCRs. *J Immunol.* 2015; 195:3520–3524.
 22. Mackay LK, Rahimpour A, Ma JZ, Collins N, Stock AT, Hafon ML, Vega-Ramos J, Lauzurica P, Mueller SN, Stefanovic T, Tschärke DC, Heath WR, Inouye M, Carbone FR, Gebhardt T. The developmental pathway for CD103(+)CD8+ tissue-resident memory T cells of skin. *Nat Immunol.* 2013; 14:1294–1301.
 23. Clark RA, Watanabe R, Teague JE, Schlapbach C, Tawa MC, Adams N, Dorosario AA, Chaney KS, Cutler CS, Leboeuf NR, Carter JB, Fisher DC, Kupper TS. Skin effector memory T cells do not recirculate and provide immune protection in alemtuzumab-treated CTCL patients. *Science translational medicine.* 2012; 4:117ra117.
 24. Campbell JJ, Clark RA, Watanabe R, Kupper TS. Sezary syndrome and mycosis fungoides arise from distinct T-cell subsets: a biologic rationale for their distinct clinical behaviors. *Blood.* 2010; 116:767–771.
 25. Laharanne E, Oumouhou N, Bonnet F, Carlotti M, Gentil C, Chevret E, Jouary T, Longy M, Vergier B, Beylot-Barry M, Merlio JP. Genome-wide analysis of cutaneous T-cell lymphomas identifies three clinically relevant classes. *J Invest Dermatol.* 2010; 130:1707–1718.
 26. van Doorn R, van Kester MS, Dijkman R, Vermeer MH, Mulder AA, Szuhai K, Knijnenburg J, Boer JM, Willemze R, Tensen CP. Oncogenomic analysis of mycosis fungoides reveals major differences with Sezary syndrome. *Blood.* 2009; 113:127–136.
 27. Heid JB, Schmidt A, Oberle N, Goerdts S, Krammer PH, Suri-Payer E, Klemke CD. FOXP3+CD25– tumor cells with regulatory function in Sezary syndrome. *J Invest Dermatol.* 2009; 129:2875–2885.
 28. Krejsgaard T, Odum N, Geisler C, Wasik MA, Woetmann A. Regulatory T cells and immunodeficiency in mycosis fungoides and Sezary syndrome. *Leukemia.* 2012; 26:424–432.
 29. Wilcox RA, Wada DA, Ziesmer SC, ElSawa SF, Comfere NI, Dietz AB, Novak AJ, Witzig TE, Feldman AL, Pittelkow MR, Ansell SM.

- Monocytes promote tumor cell survival in T-cell lymphoproliferative disorders and are impaired in their ability to differentiate into mature dendritic cells. *Blood*. 2009; 114:2936–2944.
30. Berger CL, Tigelaar R, Cohen J, Mariwalla K, Trinh J, Wang N, Edelson RL. Cutaneous T-cell lymphoma: malignant proliferation of T-regulatory cells. *Blood*. 2005; 105:1640–1647.
 31. Clark RA. Skin-resident T cells: the ups and downs of on site immunity. *J Invest Dermatol*. 2010; 130:362–370.
 32. Wang T, Feldman AL, Wada DA, Lu Y, Polk A, Briski R, Ristow K, Habermann TM, Thomas D, Ziesmer SC, Wellik LE, Lanigan TM, Witzig TE, Pittelkow MR, Bailey NG, Hristov AC, Lim MS, Ansell SM, Wilcox RA. GATA-3 expression identifies a high-risk subset of PTCL, NOS with distinct molecular and clinical features. *Blood*. 2014; 123:3007–3015.
 33. Vowels BR, Lessin SR, Cassin M, Jaworsky C, Benoit B, Wolfe JT, Rook AH. Th2 cytokine mRNA expression in skin in cutaneous T-cell lymphoma. *J Invest Dermatol*. 1994; 103:669–673.
 34. Vowels BR, Cassin M, Vonderheid EC, Rook AH. Aberrant cytokine production by Sezary syndrome patients: cytokine secretion pattern resembles murine Th2 cells. *J Invest Dermatol*. 1992; 99:90–94.
 35. Suchin KR, Cassin M, Gottlieb SL, Sood S, Cucchiara AJ, Vonderheid EC, Rook AH. Increased interleukin 5 production in eosinophilic Sezary syndrome: regulation by interferon alfa and interleukin 12. *J Am Acad Dermatol*. 2001; 44:28–32.
 36. Kari L, Loboda A, Nebozhyn M, Rook AH, Vonderheid EC, Nichols C, Virok D, Chang C, Horng WH, Johnston J, Wysocka M, Showe MK, Showe LC. Classification and prediction of survival in patients with the leukemic phase of cutaneous T cell lymphoma. *J Exp Med*. 2003; 197:1477–1488.
 37. Nebozhyn M, Loboda A, Kari L, Rook AH, Vonderheid EC, Lessin S, Berger C, Edelson R, Nichols C, Yousef M, Gudipati L, Shang M, Showe MK, Showe LC. Quantitative PCR on 5 genes reliably identifies CTCL patients with 5% to 99% circulating tumor cells with 90% accuracy. *Blood*. 2006; 107:3189–3196.
 38. Vaque JP, Gomez-Lopez G, Monsalvez V, Varela I, Martinez N, Perez C, Dominguez O, Grana O, Rodriguez-Peralto JL, Rodriguez-Pinilla SM, Gonzalez-Vela C, Rubio-Camarillo M, Martin-Sanchez E, Pisano DG, Papadavid E, Papadaki T, Requena L, Garcia-Marco JA, Mendez M, Provencio M, Hospital M, Suarez-Massa D, Postigo C, San Segundo

- D, Lopez-Hoyos M, Ortiz-Romero PL, Piris MA, Sanchez-Beato M. PLCG1 mutations in cutaneous T-cell lymphomas. *Blood*. 2014; 123:2034–2043.
39. Kasprzycka M, Zhang Q, Witkiewicz A, Marzec M, Potoczek M, Liu X, Wang HY, Milone M, Basu S, Mauger J, Choi JK, Abrams JT, Hou JS, Rook AH, Vonderheid E, Woetmann A, Odum N, Wasik MA. Gamma c-signaling cytokines induce a regulatory T cell phenotype in malignant CD4+ T lymphocytes. *J Immunol*. 2008; 181:2506–2512.
40. Adachi T, Kobayashi T, Sugihara E, Yamada T, Ikuta K, Pittaluga S, Saya H, Amagai M, Nagao K. Hair follicle-derived IL-7 and IL-15 mediate skin-resident memory T cell homeostasis and lymphoma. *Nat Med*. 2015
41. Dalloul A, Laroche L, Bagot M, Mossalayi MD, Fourcade C, Thacker DJ, Hogge DE, Merle-Beral H, Debre P, Schmitt C. Interleukin-7 is a growth factor for Sezary lymphoma cells. *J Clin Invest*. 1992; 90:1054–1060. [PubMed: 1381718]
42. Berger CL, Hanlon D, Kanada D, Dhodapkar M, Lombillo V, Wang N, Christensen I, Howe G, Crouch J, El-Fishawy P, Edelson R. The growth of cutaneous T-cell lymphoma is stimulated by immature dendritic cells. *Blood*. 2002; 99:2929–2939.
43. Yamanaka K, Clark R, Rich B, Dowgiert R, Hirahara K, Hurwitz D, Shibata M, Mirchandani N, Jones DA, Goddard DS, Eapen S, Mizutani H, Kupper TS. Skin-derived interleukin-7 contributes to the proliferation of lymphocytes in cutaneous T-cell lymphoma. *Blood*. 2006; 107:2440–2445.
44. McCusker ME, Garifallou M, Bogen SA. Sezary lineage cells can be induced to proliferate via CD28-mediated costimulation. *J Immunol*. 1997; 158:4984–4991.
45. Dave SS, Wright G, Tan B, Rosenwald A, Gascoyne RD, Chan WC, Fisher RI, Braziel RM, Rimsza LM, Grogan TM, Miller TP, LeBlanc M, Greiner TC, Weisenburger DD, Lynch JC, Vose J, Armitage JO, Smeland EB, Kvaloy S, Holte H, Delabie J, Connors JM, Lansdorp PM, Ouyang Q, Lister TA, Davies AJ, Norton AJ, Muller-Hermelink HK, Ott G, Campo E, Montserrat E, Wilson WH, Jaffe ES, Simon R, Yang L, Powell J, Zhao H, Goldschmidt N, Chiorazzi M, Staudt LM. Prediction of survival in follicular lymphoma based on molecular features of tumor-infiltrating immune cells. *N Engl J Med*. 2004; 351:2159–2169.
46. Rosenwald A, Wright G, Chan WC, Connors JM, Campo E, Fisher RI, Gascoyne RD, Muller-Hermelink HK, Smeland EB, Giltane JM, Hurt

- EM, Zhao H, Averett L, Yang L, Wilson WH, Jaffe ES, Simon R, Klausner RD, Powell J, Duffey PL, Longo DL, Greiner TC, Weisenburger DD, Sanger WG, Dave BJ, Lynch JC, Vose J, Armitage JO, Montserrat E, Lopez-Guillermo A, Grogan TM, Miller TP, LeBlanc M, Ott G, Kvaloy S, Delabie J, Holte H, Krajci P, Stokke T, Staudt LM. The use of molecular profiling to predict survival after chemotherapy for diffuse large-B-cell lymphoma. *N Engl J Med*. 2002; 346:1937–1947.
47. Steidl C, Lee T, Shah SP, Farinha P, Han G, Nayar T, Delaney A, Jones SJ, Iqbal J, Weisenburger DD, Bast MA, Rosenwald A, Muller-Hermelink HK, Rimsza LM, Campo E, Delabie J, Braziel RM, Cook JR, Tubbs RR, Jaffe ES, Lenz G, Connors JM, Staudt LM, Chan WC, Gascoyne RD. Tumor-associated macrophages and survival in classic Hodgkin's lymphoma. *N Engl J Med*. 2010; 362:875–885.
48. Schlapbach C, Ochsenbein A, Kaelin U, Hassan AS, Hunger RE, Yawalkar N. High numbers of DC-SIGN+ dendritic cells in lesional skin of cutaneous T-cell lymphoma. *J Am Acad Dermatol*. 2010; 62:995–1004.
49. Wilcox RA. Cancer-associated myeloproliferation: old association, new therapeutic target. *Mayo Clin Proc*. 2010; 85:656–663.
50. Shin J, Monti S, Aires DJ, Duvic M, Golub T, Jones DA, Kupper TS. Lesional gene expression profiling in cutaneous T-cell lymphoma reveals natural clusters associated with disease outcome. *Blood*. 2007; 110:3015–3027.
51. Wilcox RA, Feldman AL, Wada DA, Yang ZZ, Comfere NI, Dong H, Kwon ED, Novak AJ, Markovic SN, Pittelkow MR, Witzig TE, Ansell SM. B7-H1 (PD-L1, CD274) suppresses host immunity in T-cell lymphoproliferative disorders. *Blood*. 2009; 114:2149–2158.
52. Epstein EH Jr, Levin DL, Croft JD Jr, Lutzner MA. Mycosis fungoides. Survival, prognostic features, response to therapy, and autopsy findings. *Medicine (Baltimore)*. 1972; 51:61–72.
53. Posner LE, Fossieck BE Jr, Eddy JL, Bunn PA Jr. Septicemic complications of the cutaneous T-cell lymphomas. *Am J Med*. 1981; 71:210–216.
54. Axelrod PI, Lorber B, Vonderheid EC. Infections complicating mycosis fungoides and Sezary syndrome. *JAMA*. 1992; 267:1354–1358.
55. Wysocka M, Benoit BM, Newton S, Azzoni L, Montaner LJ, Rook AH. Enhancement of the host immune responses in cutaneous T-cell lymphoma by CpG oligodeoxynucleotides and IL-15. *Blood*. 2004; 104:4142–4149.

56. Bouaziz JD, Ortonne N, Giustiniani J, Schiavon V, Huet D, Bagot M, Bensussan A. Circulating natural killer lymphocytes are potential cytotoxic effectors against autologous malignant cells in Sezary syndrome patients. *J Invest Dermatol.* 2005; 125:1273–1278.
57. Wysocka M, Zaki MH, French LE, Chehimi J, Shapiro M, Everetts SE, McGinnis KS, Montaner L, Rook AH. Sezary syndrome patients demonstrate a defect in dendritic cell populations: effects of CD40 ligand and treatment with GM-CSF on dendritic cell numbers and the production of cytokines. *Blood.* 2002; 100:3287–3294.
58. French LE, Huard B, Wysocka M, Shane R, Contassot E, Arrighi JF, Piguet V, Calderara S, Rook AH. Impaired CD40L signaling is a cause of defective IL-12 and TNF-alpha production in Sezary syndrome: circumvention by hexameric soluble CD40L. *Blood.* 2005; 105:219–225.
59. Samimi S, Benoit B, Evans K, Wherry EJ, Showe L, Wysocka M, Rook AH. Increased programmed death-1 expression on CD4+ T cells in cutaneous T-cell lymphoma: implications for immune suppression. *Arch Dermatol.* 2010; 146:1382–1388.
60. Lee BN, Duvic M, Tang CK, Bueso-Ramos C, Estrov Z, Reuben JM. Dysregulated synthesis of intracellular type 1 and type 2 cytokines by T cells of patients with cutaneous T-cell lymphoma. *Clin Diagn Lab Immunol.* 1999; 6:79–84.
61. Yawalkar N, Ferenczi K, Jones DA, Yamanaka K, Suh KY, Sadat S, Kupper TS. Profound loss of T-cell receptor repertoire complexity in cutaneous T-cell lymphoma. *Blood.* 2003; 102:4059–4066.
62. Behl D, Ristow K, Markovic SN, Witzig TE, Habermann TM, Colgan JP, Inwards DJ, White WL, Ansell SM, Micallef IN, Johnston PB, Porrata LF. Absolute lymphocyte count predicts therapeutic efficacy of rituximab therapy in follicular lymphomas. *Br J Haematol.* 2007; 137:409–415.
63. Porrata LF, Gertz MA, Inwards DJ, Litzow MR, Lacy MQ, Tefferi A, Gastineau DA, Dispenzieri A, Ansell SM, Micallef IN, Geyer SM, Markovic SN. Early lymphocyte recovery predicts superior survival after autologous hematopoietic stem cell transplantation in multiple myeloma or non-Hodgkin lymphoma. *Blood.* 2001; 98:579–585.
64. Porrata LF, Inwards DJ, Ansell SM, Micallef IN, Johnston PB, Gastineau DA, Litzow MR, Winters JL, Markovic SN. Early lymphocyte recovery predicts superior survival after autologous stem cell transplantation in

- non-Hodgkin lymphoma: a prospective study. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2008; 14:807–816.
65. Porrata LF, Ristow K, Habermann TM, Witzig TE, Inwards DJ, Markovic SN. Absolute lymphocyte count at the time of first relapse predicts survival in patients with diffuse large B-cell lymphoma. *Am J Hematol.* 2009; 84:93–97.
66. Porrata LF, Ristow K, Inwards DJ, Ansell SM, Micallef IN, Johnston PB, Habermann TM, Witzig TE, Colgan JP, Nowakowski GS, Thompson CA, Markovic SN. Lymphopenia assessed during routine follow-up after immunochemotherapy (R-CHOP) is a risk factor for predicting relapse in patients with diffuse large B-cell lymphoma. *Leukemia.* 2010; 24:1343–1349.
67. Siddiqui M, Ristow K, Markovic SN, Witzig TE, Habermann TM, Colgan JP, Inwards DJ, White WL, Ansell SM, Micallef IN, Johnston PB, Call TG, Porrata LF. Absolute lymphocyte count predicts overall survival in follicular lymphomas. *Br J Haematol.* 2006; 134:596–601.
68. Leich E, Haralambieva E, Zettl A, Chott A, Rudiger T, Holler S, Muller-Hermelink HK, Ott G, Rosenwald A. Tissue microarray-based screening for chromosomal breakpoints affecting the T-cell receptor gene loci in mature T-cell lymphomas. *J Pathol.* 2007; 213:99–105.
69. Feldman AL, Law M, Grogg KL, Thorland EC, Fink S, Kurtin PJ, Macon WR, Remstein ED, Dogan A. Incidence of TCR and TCL1 gene translocations and isochromosome 7q in peripheral T-cell lymphomas using fluorescence in situ hybridization. *Am J Clin Pathol.* 2008; 130:178–185.
70. Pham-Ledard A, Prochazkova-Carlotti M, Laharanne E, Vergier B, Jouary T, Beylot-Barry M, Merlio JP. IRF4 gene rearrangements define a subgroup of CD30-positive cutaneous T-cell lymphoma: a study of 54 cases. *J Invest Dermatol.* 2010; 130:816–825.
71. Feldman AL, Law M, Remstein ED, Macon WR, Erickson LA, Grogg KL, Kurtin PJ, Dogan A. Recurrent translocations involving the IRF4 oncogene locus in peripheral T-cell lymphomas. *Leukemia.* 2009; 23:574–580.
72. Wada DA, Law ME, Hsi ED, Dicaudo DJ, Ma L, Lim MS, Souza AD, Comfere NI, Weenig RH, Macon WR, Erickson LA, Ozsan N, Ansell SM, Dogan A, Feldman AL. Specificity of IRF4 translocations for primary cutaneous anaplastic large cell lymphoma: a multicenter study of 204 skin biopsies. *Mod Pathol.* 2010

73. Batista DA, Vonderheid EC, Hawkins A, Morsberger L, Long P, Murphy KM, Griffin CA. Multicolor fluorescence in situ hybridization (SKY) in mycosis fungoides and Sezary syndrome: search for recurrent chromosome abnormalities. *Genes Chromosomes Cancer*. 2006; 45:383–391.
74. Thangavelu M, Finn WG, Yelavarthi KK, Roenigk HH Jr, Samuelson E, Peterson L, Kuzel TM, Rosen ST. Recurring structural chromosome abnormalities in peripheral blood lymphocytes of patients with mycosis fungoides/Sezary syndrome. *Blood*. 1997; 89:3371–3377.
75. Staudt LM. Oncogenic activation of NF-kappaB. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2010; 2:a000109.
76. Izban KF, Ergin M, Qin JZ, Martinez RL, Pooley RJ, Saeed S, Alkan S. Constitutive expression of NF-kappa B is a characteristic feature of mycosis fungoides: implications for apoptosis resistance and pathogenesis. *Hum Pathol*. 2000; 31:1482–1490.
77. Sors A, Jean-Louis F, Pellet C, Laroche L, Dubertret L, Courtois G, Bachelez H, Michel L. Down-regulating constitutive activation of the NF-kappaB canonical pathway overcomes the resistance of cutaneous T-cell lymphoma to apoptosis. *Blood*. 2006; 107:2354–2363.
78. Sors A, Jean-Louis F, Begue E, Parmentier L, Dubertret L, Dreano M, Courtois G, Bachelez H, Michel L. Inhibition of IkappaB kinase subunit 2 in cutaneous T-cell lymphoma down-regulates nuclear factor-kappaB constitutive activation, induces cell death, and potentiates the apoptotic response to antineoplastic chemotherapeutic agents. *Clin Cancer Res*. 2008; 14:901–911.
79. Juvekar A, Manna S, Ramaswami S, Chang TP, Vu HY, Ghosh CC, Celiker MY, Vancurova I. Bortezomib induces nuclear translocation of IkappaBalpha resulting in gene-specific suppression of NF-kappaB-dependent transcription and induction of apoptosis in CTCL. *Mol Cancer Res*. 2011; 9:183–194.
80. Nielsen M, Kaltoft K, Nordahl M, Ropke C, Geisler C, Mustelin T, Dobson P, Svejgaard A, Odum N. Constitutive activation of a slowly migrating isoform of Stat3 in mycosis fungoides: tyrphostin AG490 inhibits Stat3 activation and growth of mycosis fungoides tumor cell lines. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997; 94:6764–6769.
81. Sommer VH, Clemmensen OJ, Nielsen O, Wasik M, Lovato P, Brender C, Eriksen KW, Woetmann A, Kaestel CG, Nissen MH, Ropke C, Skov S, Odum N. In vivo activation of STAT3 in cutaneous T-cell lymphoma.

- Evidence for an antiapoptotic function of STAT3 *Leukemia*. 2004; 18:1288–1295.
82. Zhang Q, Wang HY, Woetmann A, Raghunath PN, Odum N, Wasik MA. STAT3 induces transcription of the DNA methyltransferase 1 gene (DNMT1) in malignant T lymphocytes. *Blood*. 2006; 108:1058–1064. [PubMed: 16861352]
 83. Verma NK, Davies AM, Long A, Kelleher D, Volkov Y. STAT3 knockdown by siRNA induces apoptosis in human cutaneous T-cell lymphoma line Hut78 via downregulation of Bcl-xL. *Cell Mol Biol Lett*. 2010; 15:342–355.
 84. Zhang C, Li B, Zhang X, Hazarika P, Aggarwal BB, Duvic M. Curcumin selectively induces apoptosis in cutaneous T-cell lymphoma cell lines and patients' PBMCs: potential role for STAT-3 and NF-kappaB signaling. *J Invest Dermatol*. 2010; 130:2110–2119.
 85. Nielsen M, Kaestel CG, Eriksen KW, Woetmann A, Stokkedal T, Kaltoft K, Geisler C, Ropke C, Odum N. Inhibition of constitutively activated Stat3 correlates with altered Bcl-2/Bax expression and induction of apoptosis in mycosis fungoides tumor cells. *Leukemia*. 1999; 13:735–738.
 86. Marzec M, Halasa K, Kasprzycka M, Wysocka M, Liu X, Tobias JW, Baldwin D, Zhang Q, Odum N, Rook AH, Wasik MA. Differential effects of interleukin-2 and interleukin-15 versus interleukin-21 on CD4+ cutaneous T-cell lymphoma cells. *Cancer Res*. 2008; 68:1083–1091.
 87. Mao X, Lillington DM, Czepulkowski B, Russell-Jones R, Young BD, Whittaker S. Molecular cytogenetic characterization of Sezary syndrome. *Genes Chromosomes Cancer*. 2003; 36:250–260.
 88. Barba G, Matteucci C, Girolomoni G, Brandimarte L, Varasano E, Martelli MF, Mecucci C. Comparative genomic hybridization identifies 17q11.2 approximately q12 duplication as an early event in cutaneous T-cell lymphomas. *Cancer Genet Cytogenet*. 2008; 184:48–51.
 89. Wu J, Nihal M, Siddiqui J, Vonderheid EC, Wood GS. Low FAS/CD95 expression by CTCL correlates with reduced sensitivity to apoptosis that can be restored by FAS upregulation. *J Invest Dermatol*. 2009; 129:1165–1173.
 90. Wu J, Wood GS. Reduction of Fas/CD95 Promoter Methylation, Upregulation of Fas Protein, and Enhancement of Sensitivity to Apoptosis in Cutaneous T-Cell Lymphoma. *Arch Dermatol*. 2011

91. Jones CL, Wain EM, Chu CC, Tosi I, Foster R, McKenzie RC, Whittaker SJ, Mitchell TJ. Downregulation of Fas gene expression in Sezary syndrome is associated with promoter hypermethylation. *J Invest Dermatol.* 2010; 130:1116–1125.
92. Dereure O, Levi E, Vonderheid EC, Kadin ME. Infrequent Fas mutations but no Bax or p53 mutations in early mycosis fungoides: a possible mechanism for the accumulation of malignant T lymphocytes in the skin. *J Invest Dermatol.* 2002; 118:949–956.
93. Scarisbrick JJ, Woolford AJ, Russell-Jones R, Whittaker SJ. Loss of heterozygosity on 10q and microsatellite instability in advanced stages of primary cutaneous T-cell lymphoma and possible association with homozygous deletion of PTEN. *Blood.* 2000; 95:2937–2942.
94. van Doorn R, Zoutman WH, Dijkman R, de Menezes RX, Commandeur S, Mulder AA, van der Velden PA, Vermeer MH, Willemze R, Yan PS, Huang TH, Tensen CP. Epigenetic profiling of cutaneous T-cell lymphoma: promoter hypermethylation of multiple tumor suppressor genes including BCL7a, PTPRG, and p73. *J Clin Oncol.* 2005; 23:3886–3896.
95. Scarisbrick JJ, Woolford AJ, Calonje E, Photiou A, Ferreira S, Orchard G, Russell-Jones R, Whittaker SJ. Frequent abnormalities of the p15 and p16 genes in mycosis fungoides and sezary syndrome. *J Invest Dermatol.* 2002; 118:493–499.
96. Laharanne E, Chevret E, Idrissi Y, Gentil C, Longy M, Ferrer J, Dubus P, Jouary T, Vergier B, Beylot-Barry M, Merlio JP. CDKN2A-CDKN2B deletion defines an aggressive subset of cutaneous T-cell lymphoma. *Mod Pathol.* 2010; 23:547–558.
97. Mao X, Orchard G, Vonderheid EC, Nowell PC, Bagot M, Bensussan A, Russell-Jones R, Young BD, Whittaker SJ. Heterogeneous abnormalities of CCND1 and RB1 in primary cutaneous T-Cell lymphomas suggesting impaired cell cycle control in disease pathogenesis. *J Invest Dermatol.* 2006; 126:1388–1395.
98. Kennah E, Ringrose A, Zhou LL, Esmailzadeh S, Qian H, Su MW, Zhou Y, Jiang X. Identification of tyrosine kinase, HCK, and tumor suppressor, BIN1, as potential mediators of AHI-1 oncogene in primary and transformed CTCL cells. *Blood.* 2009; 113:4646–4655.
99. Qin JZ, Dummer R, Burg G, Dobbeling U. Constitutive and interleukin-7/interleukin-15 stimulated DNA binding of Myc, Jun, and novel Myc-like proteins in cutaneous T-cell lymphoma cells. *Blood.* 1999; 93:260–267.

100. Kiessling MK, Oberholzer PA, Mondal C, Karpova MB, Zipser MC, Lin WM, Girardi M, Macconail LE, Kehoe SM, Hatton C, French LE, Garraway LA, Polier G, Suss D, Klemke CD, Krammer PH, Gulow K, Dummer R. High-throughput mutation profiling of CTCL samples reveals KRAS and NRAS mutations sensitizing tumors toward inhibition of the RAS/RAF/MEK signaling cascade. *Blood*. 2011; 117:2433–2440.
101. Krejsgaard T, Vetter-Kauczok CS, Woetmann A, Kneitz H, Eriksen KW, Lovato P, Zhang Q, Wasik MA, Geisler C, Ralfkiaer E, Becker JC, Odum N. Ectopic expression of B-lymphoid kinase in cutaneous T-cell lymphoma. *Blood*. 2009; 113:5896–5904.
102. Fink-Puches R, Zenahlik P, Bäck B. Primary cutaneous lymphomas: applicability of current classification schemes (European Organization for Research and Treatment of Cancer, World Health Organization) based on clinicopathologic features observed in a large group of patients. *Blood* 2002;99:800-805.
103. Kempf W, Sander CA. Classification of cutaneous lymphomas – an update. *Histopathology* 2010;56:57-70.
104. Dearden CE, Johnson R, Pettengell R, Devereux S, Cwynarski K, Whittaker S, McMillan A. Guidelines for the management of mature T-cell and Nk-cell neoplasms (excluding cutaneous T-cell lymphoma). *Br J Hematol* 2011;153:451-485.
105. Diamandidou E, Cohen P .R., and Kurzrock R. Mycosis Fungoides and Sezary Syndrome. Review Article *Blood*, VoI 88: 2385-2409, 1996.
106. Weinberg JM, Rook A.H., Lessin S.R.. Molecular diagnosis of lymphocytic infiltrates of the skin. *Arch Dermatol*, 129: 1491-1500. 1993.
107. Wieselthier, J.S. and H.K. Koh, Sezary syndrome: diagnosis, prognosis, and critical review of treatment options. *J Am Acad Dermatol*, 1990. 22(3): p. 381-401.
108. Criscione, V.D. and M.A. Weinstock, Incidence of cutaneous T-cell lymphoma in the United States, 1973-2002. *Arch Dermatol*, 2007. 143(7): 854-9.
109. Hwang, S.T., et al., Mycosis fungoides and Sezary syndrome. *Lancet*, 2008. 371(9616): 945-57.
110. Shapiro, P.E. and F.J. Pinto, The histologic spectrum of mycosis fungoides/Sezary syndrome (cutaneous T-cell lymphoma). A review of 222 biopsies, including newly described patterns and the earliest pathologic changes. *Am J Surg Pathol*, 1994. 18(7): p. 645-67.

111. Vonderheid, E.C., On the diagnosis of erythrodermic cutaneous T-cell lymphoma. *J Cutan Pathol*, 2006. 33 Suppl 1: p. 27-42.
112. Vidulich, K.A., et al., Overall survival in erythrodermic cutaneous T-cell lymphoma: an analysis of prognostic factors in a cohort of patients with erythrodermic cutaneous T-cell lymphoma. *Int J Dermatol*, 2009. 48(3): p. 243-52.
113. Fierro MT, Quaglino P, Savoia P, Verrone A, Bernengo MG. Systemic polychemotherapy in the treatment of primary cutaneous lymphomas: a clinical follow-up study of 81 patients treated with COP or CHOP. *Leuk lymphoma*. 1998 Nov;31(5-6):583-8.
114. Fierro MT, Doveil GC, Quaglino P, Savoia P, Verrone A, Bernengo MG. Combination of etoposide, idarubicin, cyclophosphamide, vincristine, prednisone and bleomycin (VICOP-B) in the treatment of advanced cutaneous T-cell lymphoma. *Dermatology*. 1997;194(3):268-72.
115. Akpek G, Koh HK, Bogen S, O'Hara C, Foss FM. Chemotherapy with etoposide, vincristine, doxorubicin, bolus cyclophosphamide, and oral prednisone in patients with refractory cutaneous T-cell lymphoma. *Cancer*. 1999 Oct 1;86(7):1368-76
116. Ramsay DL, Lish KM, Yalowitz CB, et al: Ultraviolet-B phototherapy for early- stage cutaneous T-cell lymphoma. *Arch Dermatol* 128: 931-933,1992.
117. Molin L., Thomsen K, Volden, et al: Photochemotherapy (PUVA) in the pretumor stage of Mycosis fungoides: A report from the Scandinavian Mycosis Fungoides Study Group. *Acta Derm Venereol* 61: 47-51, 1980.
118. Edelson R., Berger C, Gasparro F, et al: Treatment of cutaneous T-cell lymphoma by extracorporeal photochemotherapy. *N Engl J Med* 316: 297-303, 1987.
119. Ramsay DL, Ed M, Halperin PS, et al: Topical Mechlorethamine therapy for early stage mycosis fungoides. *J Am Acad Dermatol* 19:684-691, 1988.
120. Rosen ST, Foss FM: Chemotherapy for Mycosis Fungoides and the Sezary syndrome. *Hematol Oncol Clin North Am* 9:1109-1116, 1995.
121. Nieto-Rementeria N, Perez-Yarza G, Boyano MD, Apraiz A, Izu R, Diaz-Perez JL, Asumendi A. Bexarotene activates the p53/p73 pathway in human cutaneous T-cell lymphoma. *Br J Dermatol*. 2009; 160:519–526. [PubMed: 19067706]

122. Zhang C, Hazarika P, Ni X, Weidner DA, Duvic M. Induction of apoptosis by bexarotene in cutaneous T-cell lymphoma cells: relevance to mechanism of therapeutic action. *Clin Cancer Res.* 2002; 8:1234–1240. [PubMed: 12006543]
123. Duvic M, Hymes K, Heald P, Breneman D, Martin AG, Myskowski P, Crowley C, Yocum RC. Bexarotene is effective and safe for treatment of refractory advanced-stage cutaneous T-cell lymphoma: multinational phase II–III trial results. *J Clin Oncol.* 2001; 19:2456–2471. [PubMed: 11331325]
124. Abbott RA, Whittaker SJ, Morris SL, Russell-Jones R, Hung T, Bashir SJ, Scarisbrick JJ. Bexarotene therapy for mycosis fungoides and Sezary syndrome. *Br J Dermatol.* 2009; 160:1299–1307. [PubMed: 19222457]
125. Assaf C, Bagot M, Dummer R, Duvic M, Gniadecki R, Knobler R, Ranki A, Schwandt P, Whittaker S. Minimizing adverse side-effects of oral bexarotene in cutaneous T-cell lymphoma: an expert opinion. *Br J Dermatol.* 2006; 155:261–266. [PubMed: 16882161]
126. Gniadecki R, Assaf C, Bagot M, Dummer R, Duvic M, Knobler R, Ranki A, Schwandt P, Whittaker S. The optimal use of bexarotene in cutaneous T-cell lymphoma. *Br J Dermatol.* 2007; 157:433–440. [PubMed: 17553039]
127. Scarisbrick JJ, Morris S, Azurdia R, Illidge T, Parry E, Graham-Brown R, Cowan R, Gallop-Evans E, Wachsmuth R, Eagle M, Wierzbicki AS, Soran H, Whittaker S, Wain EM. U.K. consensus statement on safe clinical prescribing of bexarotene for patients with cutaneous T-cell lymphoma. *Br J Dermatol.* 2013; 168:192–200. [PubMed: 22963233]
128. Huber MA, Kunzi-Rapp K, Staib G, Scharffetter-Kochanek K. Management of refractory early-stage cutaneous T-cell lymphoma (mycosis fungoides) with a combination of oral bexarotene and psoralen plus ultraviolet bath therapy. *J Am Acad Dermatol.* 2004; 50:475–476. [PubMed: 14988696]
129. Schrupp DS. Cytotoxicity mediated by histone deacetylase inhibitors in cancer cells: mechanisms and potential clinical implications. *Clin Cancer Res.* 2009; 15:3947–3957. [PubMed: 19509170]
130. Coultas L, Chawengsaksophak K, Rossant J. “Endothelial cells and VEGF in vascular development”, *Nature*, Vol. 438, no. 7070, 2005, pp. 937-45.
131. Dzierzak E, Medvinsky A, de Bruijn M. “Qualitative and quantitative aspects of haematopoietic cell development in the mammalian embryo”, *Immunol Today*, Vol. 19, no. 5, 1998, pp. 228-36.

132. Sabin FR. "Preliminary note on the differentiation of angioblasts and the method by which they produce blood-vessels, blood-plasma and red blood-cells as seen in the living chick", *J Hematother Stem Cell Res*, Vol. 11, no. 1, 2002, pp. 5-7.
133. Fina L, Molgaard HV, Robertson D, Bradley NJ, Monaghan P, Delia D, Sutherland DR, Baker MA, Greaves MF. "Expression of the CD34 gene in vascular endothelial cells", *Blood*, Vol. 75, no. 12, 1990, pp. 2417-26.
134. Plate KH, Breier G, Millauer B, Ullrich A, Risau W. "Up-regulation of vascular endothelial growth factor and its cognate receptors in a rat glioma model of tumor angiogenesis", *Cancer Res*, Vol. 53, no. 23, 1993, pp. 5822-7.
135. Fong GH, Klingensmith J, Wood CR, Rossant J, Breitman ML. "Regulation of flt-1 expression during mouse embryogenesis suggests a role in the establishment of vascular endothelium", *Dev Dyn*, Vol. 207, no. 1, 1996, pp. 1-10.
136. Takakura N, Huang XL, Naruse T, Hamaguchi I, Dumont DJ, Yancopoulos GD, Suda T. "Critical role of the TIE2 endothelial cell receptor in the development of definitive hematopoiesis", *Immunity*, Vol. 9, no. 5, 1998, pp. 677-86.
137. Kallianpur AR, Jordan JE, Brandt SJ. "The SCL/TAL-1 gene is expressed in progenitors of both the hematopoietic and vascular systems during embryogenesis", *Blood*, Vol. 83, no. 5, 1994, pp. 1200-8.
138. Dorfman DM, Wilson DB, Bruns GA, Orkin SH. "Human transcription factor GATA-2. Evidence for regulation of preproendothelin-1 gene expression in endothelial cells", *J Biol Chem*. Vol. 267, no. 2, 1992, pp. 1279-85.
139. Watt SM, Gschmeissner SE, Bates PA. "PECAM-1: its expression and function as a cell adhesion molecule on hemopoietic and endothelial cells", *Leuk Lymphoma*, Vol. 17, no. 3-4, 1995, pp. 229-44.
140. Bagley RG, Walter-Yohrling J, Cao X, Weber W, Simons B, Cook BP, Chartrand SD, Wang C, Madden SL, Teicher BA. "Endothelial precursor cells as a model of tumor endothelium: characterization and comparison with mature endothelial cells", *Cancer Res*, Vol. 63, no. 18, 2003, pp. 5866-73.
141. Jung YD, Ahmad SA, Liu W, Reinmuth N, Parikh A, Stoeltzing O, Fan F, Ellis LM. "The role of the microenvironment and intercellular cross-talk in tumor angiogenesis", *Semin Cancer Biol*, Vol. 12, no. 2, 2002, pp. 105-12.

142. Carmeliet P. "Angiogenesis in life, disease and medicine", *Nature*, Vol. 438, no. 7070, 2005, pp. 932-6.
143. Verma S et al. *Circulation* 2002; Deanfield JE et al. *Circulation* 2007.
144. Folkman J *Nat Med* 1995.
145. Asahara T et al. *Science* 1997.
146. Fadini GP et al. *Atherosclerosis* 2008; Hirshi KK et al. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2008; Yoder MC *J Thromb Haemost* 2009.
147. Liew A et al. *BioEssay* 2006; Case J et al. *Exp Hematol* 2007.
148. Hill JM et al. *N Engl J Med* 2003.
149. Vasa M et al. *Circ Res* 2001; Dimmeler S et al. *J Clin Invest* 2001.
150. Urbich C et al. *Circulation* 2003; Rohde E et al. *Stem Cell* 2007; Yoder MC et al. *Blood* 2007.
151. Rehman J et al. *Circulation* 2003.
152. Ingram Da et al *Blood* 2004.
153. Ingram DA et al. *Blood* 2004; Reinisch A et al. *Blood* 2009.
154. Sieveking DP et al. *J Am Coll Cardiol* 2008.
155. Grunewald M et al. *ell* 2006.
156. Folkman J, Klagsburn M. Angiogenetic factors. *Science* 1987;235:442-447.
157. Folkman J. Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease. *Nat Med* 1995;1:27-31.
158. Kawaguchi M, Sugaya M, Suga H, Miyagaki T, Ohmatsu H, Fujita H, Asano Y, Tada Y, Kadono T, Sato S. Serum levels of angiopoietin-2, but not angiopoietin-1, are elevated in patients with erythrodermic cutaneous T-cell lymphoma. *Acta Derm Venereol.* 2014 Jan;94(1):9-13.
159. Asahara T, Chen D, Takahashi T, Fujikawa K, Kearney M, Magner M, et al. Tie2 receptor ligands, angiopoietin-1 and angiopoietin-2, modulate VEGF-induced postnatal neovascularization. *Circ Res* 1998; 83: 233–240.
160. Yancopoulos GD, Davis S, Gale NW, Rudge JS, Wiegand SJ, Holash J. Vascular-specific growth factors and blood vessel formation. *Nature* 2000; 407: 242–248.
161. Thurston G. Complementary actions of VEGF and angiopoietin-1 on blood vessel growth and leakage. *J Anat* 2002; 200: 575–580.
162. Loughna S, Sato TN. Angiopoietin and Tie signaling pathways in vascular development. *Matrix Biol* 2001; 20:319–325.
163. Thurston G. Role of angiopoietins and Tie receptor tyrosine kinases in angiogenesis and lymphangiogenesis. *Cell Tissue Res* 2003; 314: 61–68.

164. Maisonpierre PC, Suri C, Jones PF, Bartunkova S, Wiegand SJ, Radziejewski C, et al. Angiopoietin-2, a natural antagonist for Tie2 that disrupts in vivo angiogenesis. *Science* 1997; 277: 55–60.
165. Gamble JR, Drew J, Trezise L, Underwood A, Parsons M, Kasminkas L, et al. Angiopoietin-1 is an antipermeability and anti-inflammatory agent in vitro and targets cell junctions. *Circ Res* 2000; 87: 603–607.
166. Papapetropoulos A, Garcia-Cardena G, Dengler TJ, Maisonpierre PC, Yancopoulos GD, Sessa WC. Direct actions of angiopoietin-1 on human endothelium: evidence for network stabilization, cell survival, and interaction with other angiogenic growth factors. *Lab Invest* 1999; 79: 213–223.
167. Miyagaki T, Sugaya M, Suga H, Akamata K, Ohmatsu H, Fujita H, Asano Y, Tada Y, Kadono T, Sato S. Angiogenin levels are increased in lesional skin and sera in patients with erythrodermic cutaneous T cell lymphoma. *Arch Dermatol Res.* 2012 Jul;304(5):401-6.
168. Folkman J, Klagsbrun M (1987) Angiogenic factors. *Science* 235:442–447
169. Hartmann A, Kunz M, Köstlin S, Gillitzer R, Toksoy A, Bröcker EB, Klein CE (1999) Hypoxia-induced up-regulation of angiogenin in human malignant melanoma. *Cancer Res* 59:1578–1583
170. Houge G, Døskeland SO (1996) Divergence towards a dead end? Cleavage of the divergent domains of ribosomal RNA in apoptosis. *Experientia* 52:963–967
171. Hu G, Riordan JF, Vallee BL (1994) Angiogenin promotes invasiveness of cultured endothelial cells by stimulation of cell associated proteolytic activities. *Proc Natl Acad Sci USA* 91:12096–12100
172. Dennis C. The brave new world of RNA. *Nature* 2002;418:122–4.
173. Croce CM, Calin GA (2005) miRNAs, cancer, and stem cell division. *Cell* 122:6–7.
174. Saraiya AA, Wang CC. «snoRNA, a novel precursor of microRNA in *Giardia lamblia*.» *PLoS Pathogens*, 2008.
175. He S, Su H, Liu C, et al. «MicroRNA-encoding long non-coding RNAs.» *BMC Genomics* 9 (2008): 236.
176. Kandhavelu M, Lammi C, Buccioni M, et al. «Existence of snoRNA, microRNA, piRNA characteristics in a novel non-coding RNA: xncRNA and its biological implication in *Homo sapiens*.» *Journal of Bioinformatics and Sequence Analysis* 1 (2) (2009): 31-40.

177. Kim, VN. «MicroRNA biogenesis: coordinated cropping and dicing.» *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 6 (5) (2005): 376-385.
178. Denli AM, Tops BB, et al. «Processing of primary microRNAs by the Microprocessor complex.» *Nature* 432 (2004): 231-235.
179. Zeng Y, Cullen BR. «Efficient processing of primary microRNA hairpins by Drosha requires flanking nonstructured RNA sequences.» *The Journal of Biological Chemistry* 280 (30) (2005): 27595-27603.
180. Bernstein E, Caudy AA, et al. «Role for a bidentate in the initiation step of RNA interference.» *Nature* 409 (2001): 363-366.
181. Gregory RI, Chendrimada TP, et al. «Human RISC couples microRNA biogenesis and posttranscriptional gene silencing.» *Cell* 123 (2005): 631-640.
182. Matranga C, Tomari Y, Shin C, et al. «Passenger strand cleavage facilitates assembly of siRNA into Ago2-containing RNAi enzyme complex.» *Cell* 123 (2005): 607-620.
183. Rand TA, Petersen S, Du F, Wang X. «Argonaute2 cleaves the anti-guide strand of siRNA during RISC activation.» *Cell* 123 (2005): 621-629.
184. Liu J, Carmell M.A, Rivas F.V, et al. «Argonaute2 in the catalytic engine of mammalian RNAi.» *Science* 305 (2004): 1437-1441.
185. Sen GL, Wehrma TS, Blau HM. «mRNA translation is not a prerequisite for small interfering RNA-mediated mRNA cleavage.» *Differentiation* 73 (2005): 287-293.
186. Gao, FB. «Posttranscriptional control of neuronal development by microRNA networks.» *Trends in Neurosciences* 31 (2008): 20-26.
187. Ballabio E1, Mitchell T, van Kester MS, Taylor S, Dunlop HM, Chi J, Tosi I, Vermeer MH, Tramonti D, Saunders NJ, Boulton J, Wainscoat JS, Pezzella F, Whittaker SJ, Tensen CP, Hatton CS, Lawrie CH. MicroRNA expression in Sezary syndrome: identification, function, and diagnostic potential. *Blood*. 2010 Aug 19;116(7):1105-13.
188. Ralfkiaer U, Hagedorn PH, Bangsgaard N, Løvendorf MB, Ahler CB, Svensson L, Kopp KL, Vennegaard MT, Lauenborg B, Zibert JR, Krejsgaard T, Bonefeld CM, Søkilde R, Gjerdrum LM, Labuda T, Mathiesen AM, Grønbæk K, Wasik MA, Sokolowska-Wojdylo M, Queille-Roussel C, Gniadecki R, Ralfkiaer E, Geisler C, Litman T, Woetmann A, Glue C, Røpke MA, Skov L, Odum N. Diagnostic microRNA profiling in cutaneous T-cell lymphoma (CTCL). *Blood*. 2011 Nov 24;118(22):5891-900.

189. Persson JL. miRNA in mycosis fungoides and skin inflammation. *APMIS*. 2013 Nov;121(11):1017-9
190. Lawrie AS, Cardigan RA, Williamson LM et al: The dynamics of clot formation in fresh-frozen plasma. *Vox Sang*, 2008; 94: 306–14
191. Lawrie CH, Soneji S, Marafioti T et al: MicroRNA expression distinguishes between germinal center B cell-like and activated B cell-like subtypes of diffuse large B cell lymphoma. *Int J Cancer*, 2007; 121: 1156–61
192. Lawrie CH, Gal S, Dunlop HM et al: Detection of elevated levels of tumour-associated microRNAs in serum of patients with diffuse large B-cell lymphoma. *Br J Haematol*, 2008; 141: 672–75
193. Baraniskin A, Kuhnhen J, Schlegel U et al: Identification of microRNAs in the cerebrospinal fluid as marker for primary diffuse large B-cell lymphoma of the central nervous system. *Blood*, 2011; 117: 3140–46
194. Medina PP, Nolde M, Slack FJ: OncomiR addiction in an in vivo model of microRNA-21-induced pre-B-cell lymphoma. *Nature*, 2010; 467: 86–90
195. Girardi M, Heald PW and Wilson LD: The pathogenesis of mycosis fungoides. *N Engl J Med* 350: 1978-1988, 2004.
196. Van Doorn R, Zoutman WH, Dijkman R, de Menezes RX, Commandeur S, Mulder A, van der Velden P, Vermeer MH, Willemze R, Yan PS, Huang TH and Tensen CP: Epigenetic profiling of cutaneous T-cell lymphoma: promoter hypermethylation of multiple tumor suppressor genes including BCL7A, PTPRG, and p73. *J Clin Oncol* 23: 3886-3896, 2005.
197. Marzec M, Halasa K, Kasprzycka M, Wysocka M, Liu X, Tobias JW, Baldwin D, Zhang Q, Odum N, Rook AH and Wasik M: Differential effects of interleukin-2 and interleukin-15 versus interleukin-21 on CD4+ cutaneous T-cell lymphoma cells. *Cancer Res* 68: 1083-1091, 2008.
198. Krejsgaard T, Gjerdrum LM, Ralfkiaer E, Lauenborg B, Eriksen KW, Mathiesen A-M, Bovin LF, Gniadecki R, Geisler C, Ryder LP, Zhang Q, Wasik MA, Odum N and Woetmann A: Malignant Tregs express low molecular splice forms of FOXP3 in Sézary syndrome. *Leukemia* 22: 2230-2239, 2008.
199. Tagawa H, Ikeda S and Sawada K: Role of microRNA in the pathogenesis of malignant lymphoma. *Cancer Sci* 104: 801-809, 2013.

200. Mogilyansky E and Rigoutsos I: The miR-17/92 cluster: a comprehensive update on its genomics, genetics, functions and increasingly important and numerous roles in health and disease. *Cell Death Differ* 20: 1603-1614, 2013.
201. Valencak J, Schmid K, Trautinger F, Wallnöfer W, Muellauer L, Soleiman A, Knobler R, Haitel A, Pehamberger H and Raderer M: High expression of DICER reveals a negative prognostic influence in certain subtypes of primary cutaneous T-cell lymphomas. *J Dermatol Sci* 64: 185-190, 2011.
202. Narducci MG, Arcelli D, Picchio MC, Lazzeri C, Pagani E, Sampogna F, Scala E, Fadda P, Cristofolletti C, Facchiano a, Frontani M, Monopoli a, Ferracin M, Negrini M, Lombardo GA, Caprini E and Russo G: MicroRNA profiling reveals that miR-21, miR486 and miR-214 are up-regulated and involved in cell survival in Sézary syndrome. *Cell Death Dis* 2: e151, 2011.
203. Van Kester MS, Ballabio E, Benner MF, Chen XH, Saunders NJ, van der Fits L, van Doorn R, Vermeer MH, Willemze R, Tensen CP and Lawrie CH: miRNA expression profiling of mycosis fungoides. *Mol Oncol* 5: 273-280, 2011.
204. McGirt LY, Adams CM, Baerenwald DA, Zwerner JP, Zic JA and Eischen CM: miR-223 Regulates cell growth and targets proto-oncogenes in mycosis fungoides/cutaneous T-cell lymphoma. *J Invest Dermatol* 134: 1101-1107, 2014.
205. Ballabio E, Mitchell T, van Kester MS, Taylor S, Dunlop HM, Chi J, Tosi I, Vermeer MH, Tramonti D, Saunders NJ, Boulwood J, Wainscoat JS, Pezzella F, Whittaker SJ, Tensen CP, Hatton CSR and Lawrie CH: MicroRNA expression in Sezary syndrome: identification, function, and diagnostic potential. *Blood* 116: 1105-1113, 2010.
206. Kopp KL, Ralfkiaer U, Gjerdrum LMR, Helvad R, Pedersen IH, Litman T, Jønson L, Hagedorn PH, Krejsgaard T, Gniadecki R, Bonefeld CM, Skov L, Geisler C, Wasik M, Ralfkiaer E, Odum N and Woetmann A: STAT5-mediated expression of oncogenic miR-155 in cutaneous T-cell lymphoma. *Cell Cycle* 12: 1939-1947, 2013.
207. Qin Y, Buermans HPJ, van Kester MS, van der Fits L, Out-Luiting JJ, Osanto S, Willemze R, Vermeer MH and Tensen CP: Deep-sequencing analysis reveals that the miR-199a2/214 cluster within DNMT3os represents the vast majority of aberrantly expressed microRNAs in Sézary syndrome. *J Invest Dermatol* 132: 1520-1522, 2012.

208. Ito M, Teshima K, Ikeda S, Kitadate A, Watanabe A, Nara M, Yamashita J, Ohshima K, Sawada K and Tagawa H: MicroRNA-150 inhibits tumor invasion and metastasis by targeting the chemokine receptor CCR6 in advanced cutaneous T-cell lymphoma. *Blood* 123: 1499-1511, 2014.
209. Ralfkiaer U, Hagedorn PH, Bangsgaard N, Løvendorf MB, Ahler CB, Svensson L, Kopp KL, Vennegaard MT, Lauenborg B, Zibert JR, Krejsgaard T, Bonefeld CM, Søkilde R, Gjerdrum LM, Labuda T, Mathiesen A-M, Grønbæk K, Wasik M a, Sokolowska-Wojdylo M, Queille-Roussel C, Gniadecki R, Ralfkiaer E, Geisler C, Litman T, Woetmann A, Glue C, Røpke M a, Skov L and Odum N: Diagnostic microRNA profiling in cutaneous T-cell lymphoma (CTCL). *Blood* 118: 5891-5900, 2011.
210. Kopp KL, Ralfkiaer U, Nielsen BS, Gniadecki R, Woetmann A, Odum N and Ralfkiaer E: Expression of miR-155 and miR-126 in situ in cutaneous T-cell lymphoma. *APMIS*, 2013.
211. Persson JL: miR-155 meets the JAK/STAT pathway. *Cell Cycle* 12: 2170, 2013.
212. Litvinov I V, Pehr K, and Sasseville D: Connecting the dots in cutaneous T-cell lymphoma (CTCL): STAT5 regulates malignant T-cell proliferation via miR-155. *Cell Cycle* 12: 2172-2173, 2013.
213. Van der Fits L, van Kester MS, Qin Y, Out-Luiting JJ, Smit F, Zoutman WH, Willemze R, Tensen CP and Vermeer MH: MicroRNA-21 expression in CD4+ T-cells is regulated by STAT3 and is pathologically involved in Sézary syndrome. *J Invest Dermatol* 131: 762-768, 2011.
214. Sommer VH, Clemmensen OJ, Nielsen O, Wasik M, Lovato P, Brender C, Eriksen KW, Woetmann A, Kaestel CG, Nissen MH, Ropke C, Skov S and Ødum N: In vivo activation of STAT3 in cutaneous T-cell lymphoma. Evidence for an antiapoptotic function of STAT3. *Leukemia* 18: 1288-1295, 2004.