

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**  
**FACULTAD DE MEDICINA**  
**DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN**

**SECRETARÍA DE SALUD DEL DISTRITO FEDERAL**  
**DIRECCIÓN DE EDUCACIÓN E INVESTIGACIÓN**  
**SUBDIRECCIÓN DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN**  
**CENTRO DERMATOLÓGICO "DR. LADISLAO DE LA PASCUA"**

**CURSO UNIVERSITARIO DE ESPECIALIZACIÓN EN**  
**DERMATOLOGÍA**

**Estudio descriptivo de la expresión de HIF1 $\alpha$  y FOXP3 en biopsias de pacientes con Micosis Fungoide en estadios tempranos y su Implicación clínica en el centro dermatológico "Dr. Ladislao de la Pascua"**

**TRABAJO DE INVESTIGACIÓN**  
**DESCRIPTIVO**



**PRESENTADO POR: DRA. SUSANA SIL ZAVALITA**  
**PARA OBTENER EL DIPLOMA DE ESPECIALISTA EN DERMATOLOGÍA**

**DIRECTOR: DR. FERMÍN JURADO SANTA CRUZ**  
**ASESORES DE TESIS: DR. FERMÍN JURADO SANTA CRUZ**  
**DRA. MA. ANTONIETA DOMINGUEZ GOMEZ**  
**DRA. LAURA BONIFAZ ALFONZO**  
**DRA. MARIA LUISA PERALTA PEDRERO**

**2013**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

**Estudio descriptivo de la Expresión de HIF 1 $\alpha$  y FOXP3 en  
biopsias de pacientes con Micosis Fungoide en estadios  
tempranos y su implicación clínica en el centro dermatológico  
"Dr. Ladislao de la Pascua"**

**Dra. Susana Sil Zavaleta**

**Vo. Bo.**

**Dr. Fermín Jurado Santa Cruz  
Profesor Titular del Curso de Especialización  
en Dermatología**

<b>DIRECTOR:</b>	<b>DR. FERMÍN JURADO SANTA CRUZ</b>
<b>Asesor clínico:</b>	<b>DR. FERMÍN JURADO SANTA CRUZ</b>
	<b>DRA. MARÍA ANTONIETA DOMÍNGUEZ</b>
<b>Asesor asociado:</b>	<b>DRA. LAURA BONIFAZ ALFONZO</b>
<b>Asesor metodológico:</b>	<b>DRA. MARÍA LUISA PERALTA PEDRERO</b>

**MÉXICO D.F.**

**2013**

**Estudio descriptivo de la Expresión de HIF 1 $\alpha$  y FOXP3 en  
biopsias de pacientes con Micosis Fungoide en estadios  
tempranos y su implicación clínica en el centro dermatológico  
"Dr. Ladislao de la Pascua"**

**Dra. Susana Sil Zavaleta**

**Vo.Bo.**

**Dra. Ma. Antonieta Domínguez Gómez  
Jefa de la clínica de Fototerapia**

**Vo.Bo.**

**Dr. Daniel Alcalá Pérez  
Jefe de Enseñanza e Investigación**

## 1. INDICE

1.RESUMEN	6
2. MARCO TEÓRICO	
2.1 Antecedentes	7-30
2.2 Planteamiento del problema	31
2.3 Pregunta de investigación	32
2.5 Hipótesis	32
2.6 Justificación	32
2.7 Objetivo general	32
2.8 Objetivos específicos	32
3.MATERIAL Y MÉTODOS	33
3.1 Tipo de estudio	34
3.2 Diseño del universo	34
3.2.1 Criterios de inclusión	34
3.2.2 Criterios de exclusión	34
3.2.3 Diseño de la muestra	35
3.3 Determinación de las variables	35-36
3.4 Recolección de datos	36
3.5 Procesamiento estadístico	37
4. ASPECTO ÉTICOS Y DE BIOSEGURIDAD	37
5. ASPECTOS LOGÍSTICOS	38
5.1 Etapas del estudio	39
5.2 Recursos humanos	39

5.3 Recursos materiales	39
5.4 Recursos físicos	39
6. RESULTADOS	40
6.1 Análisis de datos	40-47
7. DISCUSIÓN	48-50
8. CONCLUSIONES	50
9. REFERENCIAS BIBIOGRÁFICAS	52-55
10. ANEXOS	

## 1. RESUMEN

2. **Introducción:** Los linfomas cutáneos son un grupo heterogéneo de neoplasias derivadas de células T siendo las formas más comunes la micosis fungoide (MF) y el síndrome de Sézary (SS). La frecuencia de casos nuevos de linfoma cutáneo de células T por año en Estados Unidos es de 6 a 7 casos por un millón de personas. La célula origen de la MF son los linfocitos T maduros de memoria CD4<sup>+</sup> CD45RO<sup>+</sup>. La génesis del proceso linfoproliferativo es multifactorial. Se ha postulado que la transformación maligna de linfocitos T se da a partir de un estímulo antigénico persistente o de inflamación crónica. Se ha demostrado la importancia del patrón inmunológico de la MF en el pronóstico y sobrevida de los pacientes. La característica típica de los LTReg naturales es la expresión de FOXP3, CD4<sup>+</sup> y CD25<sup>+</sup>; el FOXP3 es el “principal modulador” de los linfocitos T reguladores, por lo que un aumento en la expresión de este se traduce en mayor sobrevida de los pacientes con linfoma. Se ha demostrado que la subunidad 1 $\alpha$  del factor de transcripción heterodimérico esta íntimamente ligado a la respuesta proinflamatoria TH17 y a la represión de LTReg, dando como resultado inestabilidad genética favorecedora de cáncer.
3. **Objetivo:** Determinar la expresión de HIF1 $\alpha$  y FOXP3 en biopsias de piel de pacientes del Centro Dermatológico “Dr. Ladislao de la Pascua” con estadios Ia y Ib de Micosis Fungoide y su relación con la extensión de la enfermedad
4. **Hipótesis:** HIF1 $\alpha$  estará en niveles elevados, mientras que Foxp3 se encontrará en niveles disminuidos en las biopsias de piel de pacientes con Micosis Fungoide en estadios Ia y Ib.
5. **Material y Metodos:** Pacientes reclutados de la consulta dermatológica general del Centro Dermatológico Dr. Ladislao de la Pascua entre el 1 de septiembre del 2010 hasta el 01 de marzo del 2012, los cuales cumplieron con las criterios de inclusión, se realizaron biopsias en los sitios indicados por un dermatopatologo. Las muestras se estudiaron para determinar el diagnóstico histopatológico y también se realizó caracterización de la expresión de los factores de transcripción FOXP3 y HIF1 $\alpha$ . Estudio observacional, transversal descriptivo. Para el análisis las diferencias entre Fox3 y HIF1 $\alpha$ , entre los porcentajes de superficie corporal afectado se utilizó ANOVA.
6. **Resultados:** Se estudiaron 20 muestras de las que 16 son positivas para HIF 1 $\alpha$ . Se observó una relación inversamente proporcional entre HIF y FOX. Existen diferencias de la expresión de ambos factores en dermis y epidermis.

7. **Conclusión:** La correlación inversa entre HIF1 $\alpha$  y FOXP3 son factores que se relacionan con la extensión de la enfermedad.

## 2.- MARCO TEÓRICO

### Antecedentes

#### CONCEPTO DE LINFOMAS CUTANEOS

Los linfomas cutáneos son un grupo heterogéneo de neoplasias derivadas de células T que expresan los antígenos CLA y CCR4, lo cual los identifica como linfocitos migrantes a la piel, siendo las formas más comunes la micosis fungoide (MF) y el síndrome de Sézary (SS), hasta un 65% de todos los linfomas. Los cuales están caracterizados por la proliferación de CD4/CD45RO+ y la pérdida de antígenos de maduración T.<sup>1,2</sup>

El consenso entre la Organización mundial de la salud (OMS) y la Organización Europea para la Investigación y Tratamiento del cáncer, establece una clasificación del linfoma cutáneo, en la que la MF forma una entidad específica, de la cual pueden derivarse variantes y subtipos de menor frecuencia, dentro de los cuales están la forma foliculotrópica, la reticulosis pagetoide y la variante granulomatosa de piel redundante.<sup>2</sup>

#### MICOSIS FUNGOIDE

La Micosis Fungoide fue descrita por primera vez en 1806, por Alibert, quien la nombro *pian fungoid*, debido a la similitud morfológica con los hongos.<sup>1,3</sup> En 1870 Bazin describió la evolución desde una dermatosis no específica hasta su desarrollo en placas y finalmente en tumores, siendo la primera definición de un modelo de múltiples pasos, para el desarrollo de una malignidad.<sup>1</sup> En 1890 Darier describió las colecciones de leucocitos como hallazgos histopatológicos



característicos, mismos que posteriormente fueron explicados y promulgados por Pautrier.<sup>1</sup>

## EPIDEMIOLOGÍA

La frecuencia de casos nuevos de linfoma cutáneo de células T por año en Estados Unidos es de 6 a 7 casos por millón de personas.<sup>4</sup> En México aunque los datos son escasos se realizó un estudio epidemiológico en tres centros hospitalarios del D.F en donde se buscó la prevalencia de linfomas tipo Hodgkin y no Hodgkin, en 7 años se encontraron 1,047 neoplasias linfoides, 37 casos con inmunofenotipo T, de los cuales el 0.4% correspondió a micosis fungoide.<sup>5</sup> La MF es la forma más común de linfoma cutáneo, cuya frecuencia es de un 70 a 75%.<sup>6</sup> Aunque es posible que se presente en niños y ancianos, la edad promedio de presentación es de 50 a 70 años,<sup>6,7</sup> con mayor frecuencia en hombres, con una relación hombre a mujer de 1.6-2.0:1.<sup>1</sup>

Aunque la sobrevivencia de los pacientes con MF en estadios tempranos es igual a la de la población general, la sobrevivencia disminuye a 5 años en los estadios tumorales.<sup>7</sup>

## PATOGENIA

La célula origen de la MF son los linfocitos T maduros de memoria CD4+ CD45RO+. La génesis del proceso linfoproliferativo es multifactorial. Se ha propuesto que la estimulación antigénica es el factor iniciador de este proceso, sin embargo no se ha establecido un agente etiológico que provoque la aparición del linfoma.<sup>1,6</sup> Se han descrito brotes familiares de micosis fungoide lo cual se ha relacionado a ciertos antígenos leucocitarios humanos, sin que se describa una predisposición genética específica.<sup>6</sup> Así mismo los eventos de progresión tumoral faltan ser esclarecidos.

Se ha postulado que la transformación maligna de linfocitos T se da a partir de un estímulo antigénico persistente o de inflamación crónica.<sup>1,6</sup> Las células T por si solas carecen de potencial proliferativo, ya que éste se fomenta en respuesta a un

microambiente cutáneo estimulante,<sup>6</sup> que contribuye a la inestabilidad genómica; el número de mutaciones en este microambiente llega a ser de  $4 \times 10^{-8}$  de pares de bases afectadas.<sup>8</sup>

Teóricamente hay dos vías, que relacionan inflamación con neoplasia; la vía intrínseca que se refiere a la expresión de genes (oncogenes) iniciadores de la inflamación y la vía extrínseca que se refiere a condiciones externas que favorecen inflamación crónica, como factores infecciosos.<sup>8</sup> Hay puntos de intersección entre las dos vías, que son los factores de transcripción y las citocinas primariamente proinflamatorias.<sup>8</sup>

Las manifestaciones clínicas de la MF son el resultado de la interacción de las células neoplásicas T con la piel.<sup>6</sup> La serie de eventos que llevan a los linfocitos T a extravasarse de la microcirculación en la piel y migrar hacia la epidermis no han sido descritos por completo sin embargo algunos antígenos que determinan la migración de estas células hacia la piel son el antígeno linfocitario cutáneo (CLA) y el ligando de E selectina (CD26E). Otras moléculas de adhesión y citocinas que provocan la migración son: CCR4, CCR10 y sus ligandos respectivos CCL17/TARC y CCL27/CTACK. Al estudiar el inmunofenotipo de los microabscesos de Pautrier se ha demostrado que los linfocitos T malignos están en comunicación con las células dendríticas, lo cual también provoca la migración de las células T hacia la epidermis.<sup>6</sup>

## FACTORES INMUNOLÓGICOS

Se ha demostrado la importancia del patrón inmunológico de la MF en el pronóstico y supervivencia de los pacientes, ya que además de las células neoplásicas, en piel se presenta un infiltrado de células inflamatorias que contribuyen en la evolución de la enfermedad,<sup>4</sup> por ejemplo al aumentar la actividad antitumoral por medio de la respuesta Th1 que provocan la producción de interferón gamma e interferon alpha y el aumento de las células asesinas naturales (NK por sus siglas en inglés), respuesta cuya función citotóxica se dirige en contra de células que expresen antígenos tumorales, lo cual se ha demostrado

como un factor de buen pronóstico;<sup>1,9</sup> por el contrario, en estadios avanzados el infiltrado de células inmunes disminuye al tiempo que se acumulan las células malignas,<sup>9</sup> se ha observado que en el síndrome Sézary y en la fase tumoral de MF hay linfocitos T CD4+ con perfil de citocinas Th2 (IL4, IL5, IL10).<sup>1</sup> Se ha sugerido que la micosis fungoide durante su evolución, sufre un cambio en la producción de citocinas Th1 al inicio de la enfermedad hacia Th2 en el estadio tumoral del mismo, la cual bloquea la función antitumoral y citotóxica de la primera respuesta, explicando la inmunosupresión vista en los pacientes con MF en estadios avanzados, fenómeno que provoca el mal pronóstico de estos pacientes.<sup>9</sup>

## LINFOCITOS T REGULADORES

En 1970 se estipuló que los linfocitos T además de tener una función cooperadora, podían disminuir la respuesta inmune, por lo que inicialmente estas células fueron nombradas “*supresoras*”.<sup>10</sup> Otra forma de demostrar la existencia de estos linfocitos que disminuyen la respuesta inmune generada por otras células, fue al estudiar que la timectomía postnatal en ratones provocaba enfermedades autoinmunes, las cuales eran prevenidas al transferir células T inmaduras o timocitos, que inducían células T CD4, que suprimían la respuesta inmune.<sup>9,11,12</sup> Por lo tanto estas células reguladoras tienen un papel fundamental en inducir y mantener la tolerancia inmunológica, la deficiencia de las mismas provoca enfermedades autoinmunes o a una potente inflamación producida por patógenos. La función de estas células es suprimir otros linfocitos T, por medio del contacto célula con célula por medio de citocinas.<sup>12,13</sup>

Los linfocitos T reguladores, representan un conjunto de células que forman parte de los linfocitos CD4+, equivalen del 5 al 10% de éstos, los cuales son capaces de inhibir respuestas en contra de numerosos antígenos: propios, infecciosos, post-transplante.<sup>14,15</sup> Los LTReg pueden ser directamente producidos por el timo: LTReg “naturales” o profesionales, los cuales tienen larga vida y están especializados en la prevención de reacciones autoinmunes, ya que constan de TCRs sin afinidad al reconocimiento de péptidos propios, mientras que coexisten

otros linfocitos que adquieren el fenotipo regulador por estímulo antigénico, los cuales se desarrollan a partir de linfocitos CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> en presencia de TGF- $\beta$ , estos son llamados LTReg “inducidos” o adaptativos (Tr1 y Th3).<sup>9,14,16</sup>

La producción de LTReg está relacionada con la respuesta TH17, debido a que la diferenciación de ambas es dependiente de TGF- $\beta$ ; como también lo son los respectivos factores de transcripción, ROR- $\gamma$ T y FOXP3, que se expresan en linfocitos T CD4 expuestos a TGF- $\beta$ .<sup>17</sup> FOXP3 antagoniza la función de ROR- $\gamma$ T, en ausencia de IL6, así un microambiente inflamatorio provoca la diferenciación a cualquiera de los dos linajes para controlar la homeostasis entre LTReg y TH17; el principal regulador de estas respuestas es mTOR, que constituye señales intra y extracelulares para promover diferenciación efectora, más no reguladora, sin embargo lo anterior no se ha demostrado que contribuya a la diferenciación de células T.<sup>17</sup>

La característica típica de los LTReg naturales es la expresión de FOXP3, CD4<sup>+</sup> y CD25<sup>+</sup>; estos sufren una expansión clonal tras la exposición antigénica, manteniendo su capacidad supresora.<sup>9,14,16</sup> En modelos animales la anulación funcional de estas células provoca autoinmunidad, además de provocar una efectiva inmunidad tumoral e infecciosa.<sup>16</sup> Los LTReg inducidos son generados por estimulación antigénica, los hay de dos tipos, las células Tr1 y las Th3, las primeras tienen una baja capacidad proliferativa, producen altos niveles de IL-10, su función supresora se activa a través del TCR y suprimen la proliferación de las células T CD4 en respuesta a antígenos, además disminuyen la coestimulación y la producción de citocinas proinflamatorias por células presentadoras de antígeno (CPA). Las células Th3, son inducidas por antígenos orales en los ganglios mesentéricos y producen TGF- $\beta$  y cantidades variables de IL4 e IL10, actúan sobre las células T efectoras, inhibiendo células T autorreactivas.<sup>9,14,16</sup>

También los LTReg son el resultado de la activación de vías de señalización  $\gamma$ c, ya que las interleucinas capaces de estimularlos tienen en común esta cadena ( $\gamma$ c); otra forma de estimular este tipo de células se da por parte de las células dendríticas al expresar Galectina-1, proteína que se une a cadenas de azúcares.

Esta proteína es excretada por células neoplásicas para neutralizar a los linfocitos T antitumorales, así las CD secretan IL-27 que convierte a los linfocitos T en LTReg.<sup>16</sup> La producción de citocinas por parte de los LTReg tiene una relación directa con el estímulo microambiental que desencadenó el fenotipo FOXP3.<sup>9,14,16</sup>

Además de la expresión de FOXP3+, los LTReg presentan otros marcadores como el TNF $\alpha$  inducido por glucocorticoides así como CD11 $\alpha$ , CD44, CD54 (ICAM-1) y CD103 en ausencia de estimulación antigénica. También expresan niveles elevados de receptores de quimiocinas: CCR4 y CCR8.<sup>16</sup>

Los LTReg expresan constitutivamente CD25+ hasta en un 5 a 10%, lo cual refleja la dependencia de IL-2 para su función. Otros marcadores específicos de los LTReg son la galectina-1, TNF-R2, TGF- $\beta$ R1, PD1 (muerte celular programada) y neuropilina-1, sin embargo estos no son mediadores de su función. Los LTReg CD4+ CD25+, están caracterizados por la presencia del factor de transcripción en cabeza de tenedor (transcription factor forkhead box P3 – FOXP3) aunque los linfocitos efectores expresan FOXP3, este estímulo es solo transitorio y menor que la expresión por linfocitos CD4+ CD25+.<sup>9,16</sup>

FOXP3 está ubicado en el cromosoma X, codifica la proteína escurfina y consta de una porción N-terminal que es la porción mediadora de la transcripción y una porción carboxiterminal que media su anclaje a elementos del ADN.<sup>16</sup> La expresión de este gen no es solo un marcador de LTReg, ya que la baja o nula expresión del mismo provoca la pérdida de la función supresora y aumento en la tasa de apoptosis de LTReg, así desencadena autoinmunidad en ratones, por lo tanto el FOXP3 es el “principal modulador” de los linfocitos T reguladores.<sup>9,16</sup>

Los LTReg cumplen su función por el contacto célula – célula, en un proceso que depende de la señalización de CTLA-4 (antígeno 4 asociado al linfocito T citotóxico) que antagoniza la coestimulación CD28/B7. Además los LTReg actúan por medio de distintas células como CD4+, CD8+, asesinas naturales y células presentadoras de antígeno; realizan además diversos mecanismos como citólisis, interrupción de células presentadoras de antígeno y la deprivación de IL-2 lo cual

suprime la proliferación de células T CD4 y de CD8, por medio de la producción de citocinas antiinflamatorias como TGF- $\beta$  e IL-10, conocida también como factor de inhibición de la síntesis de citocinas (CSIF), hay quienes clasifican a los LTReg de acuerdo a las citocinas producidas.<sup>9,16</sup>

La función final de estas células en el organismo es mantener la tolerancia periférica y prevenir reacciones inmunes excesivas; sin embargo esta función puede ser aprovechada por las células tumorales para suprimir la función anti-tumoral, por lo que en algunas neoplasias sólidas la presencia de los LTReg se ha relacionado con un mal pronóstico. En los linfomas cutáneos esta función es más complicada ya que la neoplasia al ser de linfocitos, pueden ser suprimidos por los mismos LTReg.<sup>9</sup>

Los linfocitos T reguladores han sido identificados en pacientes con neoplasias, en donde su función inmunosupresora es una forma de evasión inmune para la persistencia de los tumores, cuya interrupción sería un tratamiento prometedor;<sup>15</sup> estas células han sido también detectadas en linfoma cutáneo, lo cual ha dado pauta a que algunos investigadores propongan a la micosis fungoide como una neoplasia de linfocitos T reguladores.<sup>9</sup>

Generalmente los linfocitos T de memoria, expresan ávidamente citocinas, sin embargo se ha estudiado que en el síndrome de Sézary la producción de IL2 esta disminuida, con un aumento en la producción de IL 10, lo cual aunado a la expresión de Foxp3 en monocitos de sangre periférica, sugieren que en el linfoma cutáneo existe la expresión de linfocitos T reguladores, cuya función es mantener la tolerancia periférica a antígenos tumorales.<sup>6,18</sup>

Los defectos en las células T reguladoras se han encontrado en esclerosis múltiple, síndrome poliglandular tipo II, diabetes tipo 1, miastenia gravis y psoriasis.<sup>18</sup> En la mayoría de las neoplasias las células T reguladoras que infiltran el tumor inhiben la función de los linfocitos efectores que eliminan las células neoplásicas, por lo tanto favorecen el crecimiento del tumor, así la presencia de los LTReg se ha asociado con un pobre pronóstico y disminución de la sobrevida

en diferentes carcinomas,<sup>15,18</sup> sin embargo en neoplasias de estirpe hematológica la función de los LTReg es controversial, ya que así como suprimen el infiltrado inmune en contra del tumor, también pueden suprimir a la propia neoplasia.<sup>15</sup>

Estudios han demostrado la presencia de linfocitos T reguladores o sus precursores en piel sana, en dónde se propone que tienen un papel en la homeostasis del tejido;<sup>18</sup> estos linfocitos se han encontrado infiltrando la piel en procesos inflamatorios, como dermatitis aguda y psoriasis.<sup>18,19</sup>

De acuerdo al proceso de inmunoección en cáncer, un microambiente inflamatorio puede ser el favorecedor del infiltrado de linfocitos T reguladores,<sup>18</sup> Gjerdrum y cols, demostraron una mayor frecuencia de LTReg FOXP3+ en el infiltrado de pacientes con MF en estadios tempranos, que en estadios tumorales y relacionaron la mayor frecuencia de FOXP3+ con un aumento en la sobrevida de los pacientes.<sup>15</sup>

Al igual que en el linfoma-leucemia, que muestra inmunodepresión asociada, por la presencia de células neoplásicas que expresan FOXP3,<sup>15</sup> los linfomas cutáneos en estadios avanzados muestran datos de inmunodepresión con una evolución severa por la alta frecuencia de infecciones oportunistas que presentan,<sup>20</sup> de acuerdo a lo anterior Berger propuso que la causa de esta inmunodepresión en estadios avanzados de linfomas cutáneos se debe a que estos son una proliferación de LTReg, ya que al cultivar células de pacientes con linfoma con células dendríticas vírgenes, estas desarrollaron un fenotipo T regulador, lo que demuestra que bajo ciertas circunstancias las células neoplásicas pueden expresar FOXP3,<sup>13</sup> sin embargo en estudios posteriores se encontró que las células reguladoras formaban parte del infiltrado inflamatorio de la neoplasia más no de las células malignas.<sup>9,15</sup>

El porcentaje de linfocitos reguladores en el infiltrado inflamatorio se equipara al porcentaje de estas células en dermatosis inflamatorias, sin embargo este infiltrado disminuye considerablemente en estadios avanzados, un alto porcentaje de FOXP3 se ha asociado a una mayor sobrevida; lo anterior sugiere que los

linfocitos reguladores suprimen la neoplasia de linfocitos T, por lo que es probable que en esta patología, en los estadios avanzados se desarrollen mecanismos que hagan a los linfocitos malignos resistentes a esta supresión; esto debe de tomarse en cuenta al considerar el tratamiento por el efecto que tienen en las células T reguladoras, como es el caso de la fotoquimioterapia la cual disminuye el porcentaje de linfocitos T reguladores a nivel periférico y un aumento en los niveles de TGF- $\beta$ .<sup>9,15</sup>

En estudios previos se ha detectado que la frecuencia de FOXP3 tiene una relación inversa con la evolución de la enfermedad, como lo demostró Kasprzycka, quien en biopsias de lesiones en estadios tempranos, FOXP3 era estimulado en presencia de IL-2, mientras que aun en presencia de esta interleucina no había proliferación de otras celular, con lo que se propone que la presencia del fenotipo FOXP3, es benéfica para las células del linfoma cutáneo, ya que provocan la inhibición de otras células de la respuesta inmune principalmente en estadios tempranos, ya que también se ha demostrado la ausencia de FOXP3 en estadios tumorales.<sup>14</sup>

Otros estudios como el de Klemke y cols, hallaron en 16 pacientes con MF expresión de un 43% FOXP3 en el infiltrado linfocitario CD4, coincidiendo con los hallazgos en pacientes con dermatitis crónica y dermatitis atópica, mientras que en la muestra de pacientes con síndrome de Sézary la positividad para FOXP3+ disminuyo a un 16% en los infiltrado dérmicos y en sangre periférica, con lo que ellos proponen también que la presencia de LTReg contribuye a inmunodepresión en pacientes con linfoma, mientras que la depleción de los mismos se debe a una sustitución de LTReg or LT CD4+ en la variante leucémica de MF, lo cual facilitaría el rechazo del tumor en etapas tardías y ha sido propuesta que la depleción de LTReg puede ser un marcador pronóstico en la evolución de la enfermedad.<sup>20</sup>

Aun no es clara la forma en la que los LTReg son reclutados en la piel, en neoplasias sólidas, se ha descrito que estos LTReg llegan al infiltrado tumoral por medio de migración y proliferación, ya que se ha relacionado el nivel de LTReg en sangre periférica con la presencia de los mismos en los tumores, además se ha



demostrado que los macrófagos y las células neoplásicas atraen LTReg en presencia de CCL22, ligando de CCR4, expresado por LTReg, lo anterior no ha sido demostrado en neoplasias cutáneas, lo que si se ha demostrado es que los LTreg expresan receptores dirigidos a la piel: CLA y CCR4, que interactúan con su contraparte en la microvasculatura dérmica (CD62E y CCL17).<sup>15</sup>

La forma en la que los LTReg suprimen la actividad de CD4+ y CD8+, ha sido estudiada, aunque aún faltan estudios que demuestren la función; la supervivencia del tumor y la proliferación de los linfocitos T malignos, es mediada por el factor nuclear kappa beta (NF-  $\kappa\beta$ ) el cual induce la expresión de citocinas proinflamatorias, moléculas de adhesión, inductores de prostaglandinas, óxido nítrico y factores angiogénicos.<sup>8</sup> La expresión completa de FOXP3, tiene un efecto inhibitorio en NF-  $\kappa\beta$ ; controversialmente en estudios en el síndrome de Sézary se ha demostrado que la expresión parcial de la molécula FOXP3 tiene un efecto mínimo en la supresión de NF-  $\kappa\beta$ ,<sup>9</sup> por otra parte los LTreg inhiben la producción de IL2, así induciendo la detención del ciclo celular, lo cual requiere contacto célula-célula, otros autores han demostrado que los mismos LTreg pueden inhibir directamente a las células neoplásicas in vitro.<sup>15</sup>

El punto en el que convergen numerosas vías oncogénicas en la MF es el factor de transcripción STAT3, el cual se ha descrito como característica particular de los linfomas cutáneos, ya que provoca proliferación, diferenciación y supervivencia celular por lo que se ha relacionado con la fase de evasión tumoral al sostener la inflamación crónica e inhibir la inmunidad antitumoral, lo que se logra al impedir la maduración de células dendríticas,<sup>8,9</sup> así también la activación del fenotipo de células reguladoras y su actividad supresora es dado por las alteraciones epigenéticas que en conjunto con la activación JAK/STAT provocan un estado inmunosupresor, el cual además es bien sabido es resultado de la activación de IL-10 y TGF- $\beta$ .<sup>9</sup>

Aun no ha sido demostrado si las células malignas provienen de las células reguladoras de la piel o si es un fenotipo adquirido, los autores que proponen este fenotipo como adquirido, asocian la presencia de numerosas células inmaduras

presentadoras de antígeno a la probable posterior adquisición del fenotipo regulador; las células T reguladoras humanas pueden modular su fenotipo y función en ambientes inflamatorios, por lo que los cambios (falta de expresión de CD25 en la superficie celular, expresión de CD127 y niveles intermedios de mRNA de FOXP3) que se han demostrado en las células reguladoras del síndrome de Sézary serían esperados ya que están expuestas a un ambiente inflamatorio crónico. Es así como finalmente el fenotipo regulador es una de las diferentes formas que pudieran ser respuesta del microambiente tumoral en el linfoma cutáneo.<sup>9</sup>

La acción inmunosupresora podría especularse inhibiría también a las células tumorales, sin embargo estas pueden desarrollar mecanismos de resistencia, por ejemplo la transcripción de STAT3 que además de provocar inmunosupresión por las células tumorales, provoca la secreción de citocinas que protegen a las células malignas de las citocinas supresoras como el interferón.<sup>9</sup>

Sin embargo aun no queda claro si FOXP3+ funciona como un marcador de CTCL.<sup>20</sup>

#### HIF-1 $\alpha$

La diferenciación de las células T, es iniciada por un estímulo antigénico y es regulada por la presencia de señales de citocinas presentes en el microambiente cutáneo. Un entorno favorecedor de tolerancia inmune permitirá la oncogénesis, recientemente Dang y cols, describieron el papel de la hipoxia como promotora del desarrollo de factores de transcripción que regulan la tolerancia inmune. Los linfocitos T bajo estímulo antigénico, sufren una expansión clonal y diferenciación, durante este proceso las demandas bioenergéticas aumentan, demostrando un aumento en la glicolisis, en la captación de glucosa y de aminoácidos, que además de caracterizar a las células T en proliferación, es un mecanismo usado por las células neoplásicas para producir energía, llamado efecto Warburg.<sup>17,21</sup> Una forma de estimular la glicolisis es en respuesta a hipoxia al producir un factor

de transcripción heterodimérico (HIF) que estimula el metabolismo anaeróbico en vez de fosforilación oxidativa para la producción de energía.<sup>22</sup>

Este factor es inducido en respuesta a hipoxia y a otros estímulos no hipóxicos, es un importante sensor del metabolismo, este factor se encuentra unido a la porción cis del elemento en respuesta a hipoxia (HRE por las siglas Hypoxia Response Element), localizado en el gen que codifica la eritropoyetina.<sup>23</sup> HIF1 $\alpha$  consiste en una subunidad oxígeno-sensible (HIF-1 $\alpha$ ) y una subunidad constitutiva (HIF1- $\beta$ ), la existencia de este factor demuestra que las vías metabólicas o el microambiente celular modulan el destino final de las células T, al regular el balance entre la respuesta TH17 y los linfocitos T reguladores de la respuesta inmune.<sup>22,24</sup>

La expresión de HIF-1 $\alpha$  depende del factor de transcripción Stat3; HIF actúa directamente facilitando la diferenciación hacia TH17 a través de la activación genética de ROR $\gamma$ t, de este modo HIF-1 $\alpha$  forma un complejo con ROR $\gamma$ t, el cual recluta a la proteína p300, que por medio de histonas abre la cromatina para facilitar la activación de genes de las interleucinas asociadas a la respuesta TH17.<sup>25</sup>

Característicamente en el intestino delgado hay hipoxia fisiológica y se han encontrado células T con respuesta TH17 promovida por HIF1- $\alpha$ ,<sup>25</sup> así también la piel se distingue por la ausencia de vasculatura a nivel epidérmico, lo cual da como resultado una presión parcial de oxígeno que va desde la hipoxia moderada hasta la severa. Lo anterior se asocia a la presencia de HIF en piel, mientras que en células con una adecuada presión parcial de oxígeno, la vida media de HIF-1 $\alpha$ , es menor de 5 minutos.<sup>26</sup>

HIF-1 $\alpha$  no es directamente un sensor de los cambios en la tensión de oxígeno, esta función es realizada por dos hidroxilasas: prolihidroxilasa y asparaginilhidroxilasa, que provocan la degradación de HIF a nivel de los aminoácidos 402 y 564,<sup>25</sup> estas enzimas en condiciones de hipoxia están limitadas por lo que se acumula HIF-1 $\alpha$ .<sup>26</sup> Por este mismo mecanismo de degradación proteosómica y ubiquitinización se induce la destrucción de Foxp3, factor clave en

la diferenciación de linfocitos T reguladores, se ha demostrado que con el HIF no hidroxidable, no es posible la degeneración de Foxp3.<sup>25,26</sup> Así por estas vías, ha sido posible demostrar in vitro que la presencia de inhibidores de proteasomas (MG132) inhiben la destrucción de Foxp3.<sup>25,27,28</sup> En conjunto lo anterior sugiere un modelo en el que HIF-1 $\alpha$  es transcrito por medio de la vía de señalización Stat3 en linfocitos T, dando como resultado la expresión de la respuesta proinflamatoria TH17 y la represión de linfocitos T reguladores.<sup>25</sup>

Además HIF-1 $\alpha$  promueve la expresión de genes que tienen lugar en la adaptación al estrés y la apoptosis, al intervenir en la degradación y remodelación de la matriz extracelular, reclutamiento de derivados de la médula ósea y angiogénesis ; la mayoría de los tumores presentan hipoxia, consecuentemente se ha demostrado la presencia de HIF1 $\alpha$  en varias neoplasias y se ha postulado que contribuye en el crecimiento y la invasión tumoral, al facilitar la adaptación de las células malignas.<sup>26</sup> Así se ha relacionado la presencia de HIF1 $\alpha$  con un aumento en la mortalidad y una pobre respuesta a tratamiento antineoplásico.<sup>23,26,29</sup>

HIF-1 $\alpha$  es un claro ejemplo de la relación entre un microambiente proinflamatorio, con el destino de las células T;<sup>25</sup> un alto nivel de inflamación por medio de TNF, IL-1 $\beta$ , prostaglandina E2, reactantes de oxígeno y especies de nitrógeno, inducen HIF-1 $\alpha$  que provoca una disminución de las enzimas reparadoras de bases y de la enzima reparadora de la escisión de nucleótidos, lo que tiene por resultado una inestabilidad genética favorecedora de cáncer;<sup>8</sup> conviene mencionar que los agentes patógenos pueden ser promotores de cambios en el organismo que promuevan neoplasia, , tal es el caso de varios oncogenes virales que aumentan la expresión de HIF-1 $\alpha$ , como Epstein-Barr, virus de la hepatitis B y herpes, así como el virus HTLV-1 que se ha relacionado con el desarrollo de leucemia de células T, por ejemplo en este caso la expresión de HIF-1 $\alpha$  se ha demostrado tiene un papel en el crecimiento de las célula sinfectadas por este virus.<sup>23</sup> NF- $\kappa$  $\beta$ , inductor clave de la inmunidad innata e inflamación en cáncer, puede activarse en respuesta a HIF-1 $\alpha$ .<sup>8</sup>

PROGRESIÓN E INMUNOEDICIÓN DE CÁNCER: MICOSIS FUNGOIDE

El papel de la vigilancia inmunológica en contra del cáncer fue hipotetizada hace más de 50 años, demostrada por medio de ratones transgénicos con defectos inmunes específicos y recientemente llamada “hipótesis de la inmunoedición del cáncer”; cuyos pasos consisten en: eliminación, equilibrio y escape.<sup>6,30</sup>

En la fase de eliminación, la inmunovigilancia se encuentra intacta, hay proliferación incógnita de linfocitos T, hasta la disrupción del estroma, activando la expresión de INF por parte de los monocitos, lo cual activa CD8, induciendo así una respuesta TH1, por lo que la pérdida de INF gamma se asocia a la progresión del tumor.<sup>6</sup>

En la siguiente fase existe un equilibrio entre la inestabilidad genética y la selección inmune que permite un estado de detención entre la proliferación neoplásica y la inmunovigilancia, lo cual corresponde clínicamente a los estadios I y II del linfoma cutáneo.

Finalmente en la fase de escape las células tumorales expresan moléculas inmunosupresoras como IL10 y CTLA4 que permiten evadir la respuesta inmune y la proliferación neoplásica más allá de la piel.<sup>6</sup>. De acuerdo con nuestra teoría en MF el escape correspondería a la fase tumoral.

## CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS

La micosis fungoide es una neoplasia inicialmente de curso indolente, que se manifiesta con una fase premicótica desde la aparición de manchas y placas hasta el desarrollo de tumores, es prolongada siendo desde años hasta décadas.<sup>1</sup> En algunos casos puede ser secundaria a una patología denominada Parapsoriasis, debido a que la célula origen de la micosis fungoide corresponde a linfocitos T. Las dermatosis mediadas por linfocitos T, representan un reto en el diagnóstico diferencial.<sup>6</sup>

Los estadios tempranos se caracterizan por la presencia de placas eritematosas con escama fina, ligeramente pruriginosas, las cuales se limitan y recaen de forma variable,<sup>7</sup> en ocasiones es posible encontrar grados variables de atrofia y

poikilodermia (atrofia, hipo o hiperpigmentación moteada y telangiectasias) antes mencionada como *poikiloderma vasculare atrophicans*.

Las manifestaciones clínicas tienen variantes morfológicas de acuerdo al predominio de las lesiones, la variante hipopigmentada predomina en niños y adolescentes, en nuestra población se presenta con mayor frecuencia debido a predomina en personas de piel oscura y predomina en mujeres; este tipo de lesiones pueden presentarse asociadas a las típicas placas eritematosas y a lesiones tumorales. La hipopigmentación se postula es el resultado del daño a los melanocitos por los linfocitos T CD8, por lo que el inmunofenotipo más frecuente en estos pacientes es el "citotóxico". Las dermatosis que pueden ser consideradas como diagnóstico diferencial de esta variedad son dermatitis atópica, vitiligo, pitiriasis versicolor y liquen escleroso y atrófico.<sup>4,19</sup>

Al progresar estas lesiones se aprecian infiltradas, con mayor intensidad del eritema, hiperpigmentadas, escamosas las cuales confluyen en placas anulares, policíclicas o en forma de herradura. Estas lesiones predominan en regiones no foto expuestas como tórax, glúteos y extremidades.<sup>1</sup>

El estadio tumoral resulta del crecimiento neoplásico vertical hacia el tejido celular subcutáneo, aunque no todos avanzan a este estadio, estas neoformaciones se desarrollan principalmente en la cara, los dedos y el periné, en ocasiones se desarrollan úlceras e infección.<sup>1,7</sup>

El desarrollo de eritrodermias se caracteriza por la generalización de la dermatosis, presentando placas infiltradas pruriginosas, asociadas a liquenificación, fascies leonina e hiperqueratosis palmo-plantar.<sup>7</sup>

El pronóstico de la enfermedad se relaciona con el estadio inicial. Los pacientes que se presentan con placas que ocupan < del 10% de la superficie corporal, tienen un pronóstico excelente.<sup>6</sup> El riesgo de desarrollar enfermedad sistémica correlaciona con la morfología y la extensión de la dermatosis, siendo más común en los casos tumorales, con eritrodermia o con infiltrado en sangre periférica.<sup>1,7</sup> La

afección extracutánea primero afecta a los ganglios regionales de las áreas de piel afectadas, para posteriormente afectar cualquier órgano o víscera.<sup>1</sup>

La fase leucémica de esta patología es conocida como el síndrome de Sézary, el cual se presenta asociado estadios tumorales caracterizado por eritrodermia e infiltrado neoplásico de sangre periférica por células mononucleares de núcleo irregular.<sup>7</sup>

Las variedades clínicas de la MF incluyen la mucinosis folicular, que es una forma agresiva, con poca respuesta a tratamiento tópico. Se caracteriza por pápulas foliculares, la clínica puede manifestarse además como lesiones acneiformes, comedones, quistes, alopecia cicatrizal o no y lesiones con aspecto de prurigo nodular, que con frecuencia afectan el cuello y la cabeza, histológicamente caracterizada por linfocitos atípicos en el epitelio del pelo.<sup>4,7</sup>

La variante reticulosis pagetoide o enfermedad de Woringer-Kolopp, es poco frecuente, se manifiesta como una placa solitaria psoriasiforme en pie o mano, más común en mujeres durante la infancia, es de curso indolente, de comportamiento maligno, con una buena respuesta a radioterapia.<sup>4,7</sup>

Otros tipos de MF menos frecuentes son la forma palmar y plantar, que se presenta en el 0.6% de los casos, caracterizada por placas delgadas; la variante unilesional se refiere a la que afecta < del 5% de superficie corporal.<sup>4</sup>

A las formas granulomatosas corresponden dos variedades una con hallazgos histológicos típicos de MF en los que predomina un infiltrado granulomatoso, que se presenta en adultos entre la quinta y sexta década de la vida, cuyas lesiones salen de la topografía en pliegues.<sup>4</sup> La otra variante es la que corresponde a la piel redundante en cuello, axilas, mamas e ingles, la cual es poco frecuente. Estas formas han sido relacionadas con un aumento en el riesgo de desarrollar una segunda neoplasia linfoide.<sup>4,7</sup>

Recientemente se ha publicado la asociación de ictiosis adquirida con MF, sin embargo son pocos los casos para establecer esta asociación.<sup>4</sup>

Las manifestaciones histológicas son poco específicas, por lo que para documentar un diagnóstico correcto debe combinarse la clínica, la histología y preferentemente agregar criterios inmunofenotípicos que pueden ser apoyados en el análisis de rearrreglos genéticos.<sup>1</sup>

La utilidad de los rearrreglos genéticos de los receptores de células T (TCR) se basa en la demostración de poblaciones clonales de linfocitos T por medio de reacción en cadena de polimerasa (PCR) en el locus TCR y debido a la alta sensibilidad y aplicabilidad para las biopsias de piel ya que puede detectar hasta un 90% de neoplasias de células T,<sup>4</sup> sin embargo si bien apoyan el diagnóstico de linfoma cutáneo T, no son patognomónicos ya que la clonalidad T puede presentarse en dermatosis no neoplásicas (pseudoclonalidad), como reacciones a fármacos, dermatitis atópica, dermatitis por contacto alérgica y psoriasis. Aunque estos hallazgos de clonalidad no definen a la MF, pueden ayudar a predecir al pronóstico de la neoplasia.<sup>4,6</sup> El no encontrar datos de clonalidad no descarta en diagnóstico de MF, ya que hay que recordar que es un diagnóstico que conlleva correlación clínico patológica. Los hallazgos asociados a MF se manifiestan con la pérdida de uno o más antígenos de superficie como CD2, CD3, CD4, CD5 y CD26 (BC) aunque la pérdida de CD5, CD7 y CD26 puede también ocurrir en procesos inflamatorios.<sup>6</sup>

El diagnóstico en estadios tempranos es un reto mayor debido a que los cambios clínicos e histológicos pueden ser mínimos, un aumento en el ratio CD4+ CD8+, epidermotropismo, exocitosis y el hallazgo de microabscesos de Pautrier apoyan el diagnóstico. Los hallazgos como la pérdida de CD7 y la demostración de clonalidad, han probado ser de gran utilidad, sin embargo estos hallazgos son inconstantes en los estadios tempranos.<sup>6</sup>

El inmunofenotipo de las células maduras en micosis fungoide expresan CD3+ CD4+ CD45RO+, con menor frecuencia se presenta el siguiente fenotipo CD3+ CD4- y CD8+. El inmunofenotipo es de utilidad en estadios avanzados, sin embargo en estados tempranos es de poca ayuda diagnóstica.<sup>1</sup>



## DIAGNÓSTICO Y ESTADIAJE

### DERMATOPATOLOGÍA

Dentro de las características típicas de esta entidad se encuentra el epidermotropismo, los linfocitos atípicos con núcleo cerebriforme que se encuentran en cúmulos a lo largo de la membrana basal, los abscesos de Pautrier, cúmulos de linfocitos atípicos alrededor de células de Langerhans,<sup>4</sup> patognomónicos de MF. En estadios avanzados el infiltrado linfocitario invade la dermis reticular, en el estadio tumoral los linfocitos alcanzan el tejido celular subcutáneo.<sup>7</sup> Otros hallazgos no característicos son: espongiosis marcada, necrosis de queratinocitos, numerosos eosinófilos y/o neutrófilos.<sup>7</sup>

Las variantes de MF pueden presentar los mismos cambios histológicos, aunque también presentan datos característicos. La variante folicular mucinosa muestra linfocitos atípicos alrededor y en el epitelio perifolicular (foliculotropismo), sin evidencia de epidermotropismo y presentando mucinosis folicular y dérmica hasta en el 50% de los casos; distintos patrones pueden presentarse como el similar a foliculitis eosinofílica, patrón quísitco, hiperplasia basaloide foliculolinfoide, granulomatoso y el patrón mixto foliculotrópico y siringotrópico. Se han publicado escasos casos de la variante puramente siringotrópica que se caracteriza por infiltrados en las glándulas ecrinas, que clínicamente se expresan como pápulas de 1 a 3 mm de diámetro.<sup>2,4</sup>

La reticulosis pagetoide se presenta con hiperqueratosis paraqueratósica, con un infiltrado epidérmico prominente de linfocitos atípicos en la membrana basal, microabscesos de Pautrier, generalmente tienen un inmunofenotipo CD8. La variante palmo plantar tiene un infiltrado linfocítico dermo-epidérmico y puede contener eosinófilos.<sup>4</sup>

Un infiltrado de granulomas no necrotizantes tipo granuloma anular y pérdida de fibras elásticas en presencia de hallazgos típicos de MF se presenta en la variante granulomatosa de MF; en la variante de piel redundante también encontramos un

infiltrado linfocítico con granulomas, característicamente con mínimo epidermotroismo, hay fagocitosis de linfocitos y de fibras elásticas.<sup>2,4</sup>

Un dato de mal pronóstico es la transformación a células grandes, por definición siendo el aumento en el tamaño de los linfocitos, más de 4 veces su tamaño normal en más del 25% del infiltrado inflamatorio, siendo más común este cambio en la variedad tumoral o eritrodérmica. Molecularmente este cambio corresponde a la expansión clonal de la neoplasia. Estos linfocitos pueden corresponder a linfocitos CD30+, lo cual pudiera corresponder a la coexistencia entre MF y un linfoma cutáneo de células T anaplasicas CD30+.<sup>2</sup>

#### DEFINICIÓN DEL ESTADIO CLÍNICO

En 1979 el Grupo Cooperativo para la Micosis Fungoide desarrollo un sistema de estadificación para los linfomas cutáneos basado en el sistema TNM (Tumor Nódulos Metastasis) (TABLA1), el cual se aplica únicamente para MF y síndrome de Sézary.<sup>1</sup>

La ruta diagnóstica primariamente se basa en las características clínicas y en determinar la extensión de la enfermedad, al determinar el porcentaje de superficie corporal afectado y la afección ganglionar.

Es de importancia diferenciar entre manchas, placas y tumores, debido a la diferente evolución y tratamiento de los pacientes con estas características.<sup>2</sup>

El rubro T de tumor, toma en cuenta la lesión dermatológica que el paciente presenta, para la literatura anglosajona se debe diferenciar entre parche, placa y tumor, sin que exista una definición que determine claramente la diferencia entre estas. Se toman cuenta para estadio T1 y T2 las lesiones que no correspondan a tumores, siendo la diferencia el porcentaje de superficie corporal afectada. El estadio T3 corresponde a la presencia de uno o más tumores de más de 1.5 cm de diámetro, mientras que T4 se usa para las formas eritrodérmicas; en caso de que las lesiones correspondan a dos números como placas y tumores, se deben escribir ambos números en la clasificación.<sup>2</sup>

Para la estadificación del porcentaje de superficie corporal total, anteriormente se tomaba la palma con un valor de 1%, sin embargo en estudios recientes se ha valorado que matemáticamente la palma junto con los dedos equivale a menos del 1%, correspondiendo a 0.8%, mientras que la palma equivale al 0.5%, siendo la forma más sencilla de evaluar el porcentaje de SCT afectado, un método para evaluar la extensión es dividir este porcentaje en 12 regiones del cuerpo, cada una con un valor predeterminado, sumando los porcentajes de las regiones ocupadas por la dermatosis. El número de lesiones, volumen o tamaño de las mismas así como la topografía afectada no se ha demostrado tengan lugar en el pronóstico.<sup>2</sup>

Ciertos cambios histológicos han demostrado empeorar el pronóstico, sin embargo no son parte de la clasificación, tal es el caso de la forma foliculotrópica que se clasifica como T1 ó T2, siendo la sobrevida a 10 años menor que en pacientes con tumores; otro cambio histológico que requiere seguimiento estrecho por el riesgo de obre evolución, es la transformación hacia células grandes.<sup>2</sup>

El rubro N, representa la presencia de ganglio linfáticos afectados, siendo positivos cuando se encuentran clínicamente mayores de 1.5 cm en su diámetro mayor o habiendo ganglios palpables de cualquier tamaño que estén firmes, irregulares, agrupados o fijos, los cuales deben ser corroborados por tomografía computada con o sin fluorodeoxy-glucosa para emisión de positrones, o or medio de resonancia magnética o ultrasonido previo a la toma de biopsia.<sup>2</sup>

Histopatológicamente la afección ganglionar puede ser clasificada por métodos el primero el del Instituto Nacional Para el Cancer (NCI/VA) que define a los linfocitos anormales como células neoplásicas pequeñas (6-10 micrometros) o grandes (>11.5 micrometros) con un núcleo cerebriforme, irregular, hiperconvolucionado, tomando en cuenta la cantidad de esas células en la paracorteza ganglionar. El otro sistema es el Dutch el cual toma como positivas a los linfocitos mayores de 7.5 micrometros de diámetro.<sup>2</sup>

De acuerdo al estadio sospechado es conveniente la búsqueda de células de Sézary or medio de una biometría hemática, la biopsia de ganglios afectados y si

es prudente la realización de estudios de imagen.<sup>7</sup> Se debe buscar la presencia de linfocitos atípicos en sangre periférica, siendo que si el porcentaje de los mismos es mayor de 5%, aumentando el estadio en caso de que el porcentaje encontrado sea mayor de 20%, lo cual se ha demostrado como un factor pronóstico independiente del estadio T o N. Recientemente se han agregado criterios para definir los estadios de infiltrado sanguíneo, en el caso de B2 se toma en cuenta el aumento de CD4 o CD3, o un radio CD4/CD8 mayor a 10 o un aumento en CD4 con un fenotipo anormal (>40% CD4+/CD7- o >30% CD4+/CD26-).<sup>2</sup>

Es también necesario dentro de la clasificación descartar afección visceral la cual debe ser evaluada aún sin adenopatía o sin infiltrado en sangre periférica; por lo tanto debe documentarse clínicamente y por medio de estudios de gabinete esplenomegalia y enfermedad hepática. La toma de una muestra de médula ósea no es necesaria en pacientes con MF, a menos de que se haya demostrado afección ganglionar o sanguínea. La demostración de enfermedad en otros órganos, no debe asociarse a un infiltrado linfomatoso visceral, sino a una malignidad secundaria o a un proceso infeccioso.<sup>2</sup>

Los criterios para determinar el estadio de un paciente, se basan en los criterios del Comité Americano para el Cáncer (American Joint Committee on Cancer AJCC),

## PRONÓSTICO

El riesgo de progresión depende de la extensión de la enfermedad, lo cual expresa el avance de una enfermedad indolente hacia una patología agresiva.<sup>4</sup>

## EVALUACIÓN DE LA SUPERFICIE CORPORAL AFECTADA

La primera comunicación para la evaluación de superficie corporal, se utilizó para el cálculo de quemaduras en 1924, (W) la forma más utilizada para el cálculo de la superficie afectada es la de Lund-Browder, la cual se basa en estudios anatómicos que relacionan la proporción de un área corporal, tomando al cuerpo como un todo, método en el cual si las lesiones no abarcan la totalidad del segmento

corporal, se utiliza la palma de la mano como guía, representando clásicamente el 1% de la SCT, sin embargo recientemente se ha calculado que la palma equivale al 0.5% de una superficie corporal de una persona, una forma de hacer más objetiva esta evaluación es usar un software que ayude en el cálculo de la superficie y que se ha estimado que el uso de estos programas disminuye los errores de cálculo hasta en un 10%, tal es el caso de programa SAGE® (Surface Area Graphic Evaluation) .<sup>2,20</sup>

## TRATAMIENTO

El tratamiento depende del estadio de la enfermedad, siendo inicialmente dirigido a piel, el tratamiento tópico en pacientes con menos del 10% de SCT afectada puede otorgar tiempo libre de enfermedad de 30 a 50%, a mayor extensión de la enfermedad es necesario el tratamiento tópico intensivo para lograr la remisión y un tratamiento tópico persistente para mantener la remisión.<sup>7</sup>

**Cuadro 1.** Clasificación TNM para Micosis Fungoide y Síndrome de Sézary ISCL/EORTC.

ESTADIO	DEFINICIÓN
T (piel)	
T1	Placas limitadas: afectan < del 10% de la superficie total de la piel
T2	Placas generalizadas: afectan > del 10% de la superficie total de la piel
T3	Tumores
T4	Placas
N (ganglio linfático)	
N0	Ganglios linfáticos no afectados
N1	Aumento de tamaño de ganglios linfáticos, sin involucro histológico
N2	Aumento de tamaño de ganglios linfáticos, involucro histológico (arquitectura ganglionar no afectada)
N3	Aumento de tamaño de ganglios linfáticos, involucro histológico (arquitectura ganglionar parcialmente afectada)
M (órganos)	
M0	Sin afección a órganos internos

M1	Con afección a órganos internos
B (sangre)	
B0	No células atípicas (células de Sézary) circulantes (o <5% de linfocitos)
B1	Baja carga tumoral en sangre (5% de linfocitos circulantes son células de Sézary, pero no B2)
B2	Alta carga tumoral en sangre (1000/mL de células de Sézary + una clona positiva)

**Cuadro 2.** Sistema de estadiaje clínico para Micosis Fungoide y Síndrome de Sézary

Estadio Clínico	T	N	M	B
IA	T1	N0	M0	B0-1
IB	T2	N0	M0	B0-1
IIA	T1-2	N1-2	M0	B0-1
IIB	T3	N0-2	M0	B0-1
III	T4	N0-2	M0	B0-1
IVA1	T1-4	N0-2	M0	B2
IVA2	T1-4	N3	M0	B0-2
IVB	T1-4	N0-3	M1	B0-2

**Cuadro 3.** Ruta diagnóstica en sospecha de Micosis Fungoide.

- Manifestaciones clínicas en piel, ganglios, hígado y bazo
- Biopsia de piel con enfoque en:
  - Histología
    - Linfocitos epidérmicos de medianos a grandes, con núcleo convolucionado
    - Linfocitos epidérmicos con un halo
    - Microabscesos de Pautrier: acúmulos de linfocitos T rodeando células de Langerhans
  - Inmunofenotipo
    - Clásico: CD2+, CD3+, CD4+, CD5+, CD45RO+, CD8-, CD30-
    - Menos frecuente: CD4-, CD3+, CD8+
    - Test para CD30 en caso de papulosis linfomatoide, linfoma anaplásico, transformación de células grandes
  - PCR para buscar rearrreglos del receptor de células T

- Biopsia de adenomegalias

Número de linfocitos atípicos, desorganización de la arquitectura ganglionar  
 Considerar PCR en búsqueda de clonalidad de células T e inmunofenotipo

- Evaluación de sangre periférica  
 Biometría hemática con diferenciación, pruebas de función hepática y química sanguínea.  
 En sospecha de estadios IIB-IV
  - DHL, receptor soluble de IL2
  - Citometría de flujo para CD2, CD3, CD4, CD5, CD7, CD8, CD20, CD26CD45RO
  - PCR en búsqueda de rearreglos del receptor de linfocitos T

- Imagenología  
 Estadios IA-IB
  - Radiografías de tórax posteroanterior y lateral
  - Considerar USG de cadenas ganglionares periféricas
 Estadios IIA-IV
  - Tomografía axial computada de tórax, abdomen y pelvis
  - Considerar tomografía por emisión de positrones

Cuadro 4. Algoritmo propuesto para el diagnóstico de MF.

Crterios		Definición	Puntaje
Clínicos	Básicos	Manchas o placas persistentes o progresivas	1 básico+2 adicionales = 2 puntos
	Adicionales	1. Topografía: regiones no fotoexpuestas. 2. Forma y tamaño variable 3. Poiquilodermia	1 básico+1 adicional = 1 punto
Histopatológicos	Básicos	Infiltrado superficial linfoide	1 básico+2 adicionales = 2 puntos
	Adicionales	1. Epidermotropismo sin espongirosis 2. .Atipia linfoide	1 básico+1 adicional = 1 punto
Biología	Básico	Rearreglo clonal del receptor de células T	Clonalidad = 1

molecular			punto
Inmunopatología	Básicos	1. <50% de células T CD2, CD3 y/o CD5 2. <10% de células T CD7 3. Discordancia epidermis/dérmis de CD2, 3, 5 o 7	1 ó más criterios = 1 punto

### 3.- PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La génesis del proceso linfoproliferativo se ha descrito como de causa multifactorial, los pasos que provocan la progresión del tumor no han sido esclarecidos aunque se ha postulado que el origen de la micosis fungoide se debe a una transformación de linfocitos T a partir de un estímulo antigénico persistente o de inflamación crónica.<sup>1,6</sup>

La célula origen de la micosis fungoide son los linfocitos T de memoria CD4+ CD45RO, estas células por si solas puede que no tengan potencial proliferativo, ya que este se da como respuesta al microambiente cutáneo que las estimula<sup>6</sup> o en repuesta al desequilibrio entre la vigilancia inmunológica y los factores protumor estimulados por la neoplasia en la piel. Y por lo tanto estos factores influyen en la progresión de la neoplasia.

En estudios previos la expresión de FOXP3 ha sido variable, algunos autores sugieren que en el linfoma cutáneo existe la expresión de linfocitos T reguladores, que controlan la proliferación de linfocitos T CD4 neoplásicos,<sup>6</sup> por lo que además según Solomon y cols, se relacionan con la evolución de la enfermedad. Se ha propuesto que la disminución de los mismos se asociaría a un estado permisivo en el desarrollo de Micosis Fungoide.<sup>31</sup>

La expresión del factor de transcripción asociado a hipoxia 1 alfa, promueve la degradación del factor de transcripción Foxp3 que induce la diferenciación de las líneas celulares hacia linfocitos T reguladores.



Debido a lo anterior el interés de buscar los niveles de linfocitos T reguladores y de HIF1a en relación a pacientes con micosis fungoide en estadios tempranos de la enfermedad y relacionar los niveles de estos factores con la extensión clínica de la micosis fungoide, para estudiar si estas moléculas están relacionadas con el estadio de la neoplasia.

#### **4.- PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN**

¿Los niveles de HIF1a son mayores y los de Foxp3 son menores en biopsias de piel de pacientes con Micosis Fungoide en estadios Ia y Ib comparados con controles sin esa enfermedad?

#### **HIPÓTESIS**

HIF1a estará en niveles elevados, mientras que Foxp3 se encontrará en niveles disminuidos en las biopsias de piel de pacientes con Micosis Fungoide en estadios Ia y Ib comparado con controles sin esta enfermedad.

#### **5.- JUSTIFICACIÓN**

La Micosis Fungoide es la forma más común de Linfoma cutáneo, siendo aproximadamente de 65%.

HIF1a es un factor de transcripción que se expresa en tumores en respuesta a hipoxia, que regula la transcripción de citocinas y factores de transcripción, que permiten la evolución de una neoplasia. Se ha demostrado su expresión en patologías premalignas y malignas, por lo que la presencia de este factor en pacientes con linfoma cutáneo, podría ser un descubrimiento en la fisiopatogenia del fenómeno inflamatorio que da lugar a la transformación maligna de los pacientes con micosis fungoide y podría dar pie a que se propusieran líneas de investigación que demuestren que al inhibir este factor, se suprime el metabolismo en condiciones de hipoxia, que ayuda a subsistir a las células malignas.

## **6.- OBJETIVO GENERAL**

Describir la expresión de HIF1 $\alpha$  y de Foxp3 en biopsias de piel de pacientes con estadios Ia y Ib de Micosis Fungoide que acuden al Centro Dermatológico “Dr. Ladislao de la Pascua”

## **7. OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Determinar la expresión de HIF-1 $\alpha$  y de Foxp3 en los tejidos lesionados de pacientes con MF.
- Determinar la relación entre los niveles de expresión de HIF-1 $\alpha$  con el porcentaje de superficie corporal afectada.
- Determinar la relación entre los niveles de expresión de Foxp3 con el porcentaje de superficie corporal afectada.
- Determinar la relación entre los niveles de expresión de HIF1 $\alpha$  con el porcentaje de superficie corporal afectada.

## **8. MATERIAL Y MÉTODOS**

### **Tipo de estudio**

Investigación epidemiológica

### **Diseño del estudio**

Transversal, descriptivo.

### **Definición del universo**

Los pacientes fueron reclutados de la consulta dermatológica general del Centro Dermatológico Dr. Ladislao de la Pascua desde el 1 de septiembre del 2010 hasta el 01 de marzo del 2012.

Se realizó historia clínica y se identificaron a los pacientes elegibles, en caso de serlo, se les preguntó si aceptaban participar en el estudio y con previo

consentimiento informado se tomarón dos biopsias de piel en el sitio determinado por un dermatopatólogo del Centro Dermatológico “Dr. Ladislao de la Pascua”.

Una de las muestras de piel será analizada por el servicio de dermatopatología del Centro Dermatológico “Dr. Ladislao de la Pascua”, para emitir el diagnóstico histopatológico de la muestra.

La otra muestra de piel se llevará a cabo un estudio observacional descriptivo realizando una caracterización de la expresión de los factores de transcripción FOXP3 y HIF1 $\alpha$  en las biopsias de piel, el procesamiento y análisis de las muestras se llevará a cabo por inmunohistoquímica en la UIMEA del Hospital de Especialidades a cargo de la Dra. Laura Bonifaz Alfonso.

## **9. CRITERIOS DE INCLUSIÓN**

- Pacientes mayores de 8 años, cualquier género, que cumplan con los criterios clínicos de Micosis Fungoide en estadios tempranos, que no tengan adenopatía, en quienes el diagnóstico sea confirmado histológicamente por un dermatopatólogo del Centro Dermatológico “Dr. Ladislao de la Pascua”.
- Pacientes con lesiones en cualquier topografía, estadios temprano con cualquier extensión de superficie corporal.
- Pacientes que hayan firmado y aceptado la carta de consentimiento informado.
- Pacientes de reciente diagnóstico, que acepten la toma de biopsia incisional en huso antes de recibir tratamiento con esteroides tópicos, inmunosupresores orales o fototerapia.
- Pacientes residentes de los Estados Unidos Mexicanos

## **10. CRITERIOS DE EXCLUSIÓN**

- Pacientes con alguna enfermedad autoinmune concomitante.
- Pacientes que hayan recibido tratamiento inmunosupresor en los últimos 6 meses.

- Pacientes quienes hayan aplicado esteroides tópicos o inhibidores de calcineurina las dos semanas previas a la toma de biopsia
- Pacientes que hayan recibido fototerapia en los últimos 6 meses.
- Pacientes cuya dermatosis se encuentre impetiginizada

### 11.CRITERIOS DE ELIMINACIÓN

- Correlación clínico patológica que no concuerde con el diagnóstico de Micosis fungoide

### 12.TAMAÑO DE MUESTRA

No se aplico tamaño de muestra ya que por la poca frecuencia de la enfermedad decidimos valorar a toda la población. . Selección consecutiva de pacientes que acudieron a la consulta de dermatología general en el Centro Dermatológico Dr. Ladislao de la Pascua desde el 1 de septiembre del 2010 hasta el 01 de marzo del 2012, a quienes se les haya realizado el diagnóstico clínico de micosis fungoide.

### 13.DETERMINACIÓN DE LAS VARIABLES

VARIABLE	TIPO	DEFINICIÓN OPERACIONAL	ESCALA DE MEDICIÓN	CALIFICACIÓN	FUENTE
Edad	Cuantitativa	Tiempo que una persona ha vivido desde su nacimiento.	Continua	Años	Interrogatorio
Sexo	Cualitativa	Constitución orgánica que distingue masculino de femenino.	Dicotómica	Femenino Masculino	Interrogatorio
Tiempo de Evolución	Cuantitativa	Tiempo en meses, desde que el paciente refiere el inicio de la dermatosis	Continua	Años	Interrogatorio
Factor inducido por hipoxia (HIF1 $\alpha$ ) en	Cuantitativa	Cantidad de pixeles positivos en inmuno-histoquímica en	Continua	Número de pixeles positivos por unidad de área de tejido.	Biopsias de piel

epidermis		un área de epidermis de 120 mm <sup>2</sup> , del factor de transcripción que interviene en apoptosis, regulado por la presencia de oxígeno			
Factor inducido por hipoxia (HIF1α) en dermis	Cuantitativa	Cantidad de pixeles positivos en inmunohistoquímica en un área de dermis de 60 mm <sup>2</sup> , del factor de transcripción que interviene en apoptosis, regulado por la presencia de oxígeno	Continua	Número de pixeles positivos por unidad de área de tejido.	Biopsias de piel
Factor de transcripción FOXP3 en epidermis	Cuantitativa	Cantidad de pixeles positivos en inmunohistoquímica en un área de epidermis de 120 mm <sup>2</sup> , del factor de transcripción con dominio de unión de cabeza de tenedor, que se fijan al DNA.	Continua	Número de pixeles positivos por unidad de área de tejido.	Biopsias de piel
Factor de transcripción FOXP3 en epidermis	Cuantitativa	Cantidad de pixeles positivos en inmunohistoquímica en un área de dermis de 60 mm <sup>2</sup> , del factor de transcripción con dominio de unión de cabeza de tenedor, que se fijan al DNA.	Continua	Número de pixeles positivos por unidad de área de tejido.	Biopsias de piel
Porcentaje de superficie corporal	Cuantitativa	Porcentaje de superficie corporal, ocupada por las manchas y/o placas de micosis fungoide al momento de la exploración	Continua	Número de pixeles positivos por unidad de área de tejido.	Biopsias de piel

#### **14.RECOLECCIÓN DE DATOS**

A los pacientes con diagnóstico clínico de micosis fungoide se les solicitó que participen en el estudio y en caso de aceptar, se les pidió su consentimiento por escrito y se procedió a la toma de biopsia incisional en huso, de una placa elegida por un dermatopatólogo del Centro Dermatológico “Dr. Ladislao de la Pascua”. El paciente no requirió asistir en ayuno o con alguna preparación en especial.

#### **15.PROCESAMIENTO ESTADÍSTICO**

Plan de análisis estadístico

Para el análisis las diferencias entre Fox3 y HIF1 $\alpha$ , entre los porcentajes de superficie corporal afectado se utilizará ANOVA

Estadística descriptiva

Las variables cuantitativas se expresarán en promedios, las variables nominales se expresarán en porcentajes. Se determinará una diferencia de los promedios y medias de las variables estudiadas.

#### **16.ASPECTOS ÉTICOS Y DE BIOSEGURIDAD**

Aspectos éticos

En la hoja de consentimiento informado se explicó detalladamente el proceso de toma de biopsia de piel y de la recolección de sangre periférica así como sus potenciales complicaciones.

Medidas de bioseguridad

Asepsia y antisepsia del sitio de biopsia

Uso de material estéril y desechable

El protocolo se apega a los estándares éticos internacionales establecidos en Helsinki y modificados en Tokio y se desarrollará siguiendo los lineamientos de las buenas prácticas clínicas.

La toma de biopsia se realiza de rutina a los pacientes sospechosos de micosis fungoide.

Los datos que resulten contarán con la garantía de confidencialidad y buen uso de los mismos. La participación de pacientes es indispensable para abrir una nueva línea de investigación en esta área, lo que finalmente nos permitirá tener un conocimiento más amplio acerca de la enfermedad y abre la posibilidad de nuevas alternativas de tratamiento inmunológico para el cáncer.

Medidas de bioseguridad para los investigadores

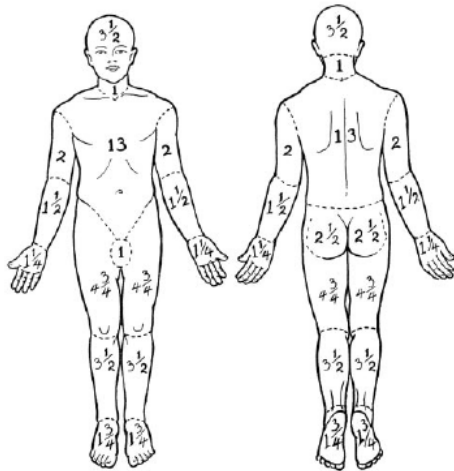
Uso de guantes

## **17.ASPECTOS LOGISTICOS**

Etapas del estudio

Realizar historia clínica al paciente → realizar exploración física → calcular porcentaje de superficie corporal afectado → la forma de realizar este cálculo es que se dividió el cuerpo en 12 áreas, cada una con un porcentaje de SC previamente determinado, se suman los porcentajes de superficie afectada para obtener el porcentaje total → descartar la presencia de adenomegalias → llenar hoja de recolección de datos →

Figura 1. Áreas de superficie corporal.



Muestra de piel lesionada → Colocación en parafina → microcortes en laminillas tratadas con poli-lisina → Incubación de laminillas con anticuerpos anti Foxp3 y HIF-1 $\alpha$  → Incubar con el anticuerpo secundario biotinilado acoplado a peroxidasa → Revelado con Peróxido de hidrógeno → escaneado de laminillas con el software Imagepro

#### Análisis de Imágenes

Para el análisis de los tejidos, se tomaron fotos en un microscopio Zeiss a 40X. Las imágenes se analizaron con el software ImagePro 6.2, seleccionando regiones de promedio 120 mm<sup>2</sup> en la dermis y 60 mm<sup>2</sup> en la epidermis. Se seleccionó un análisis de densidad en el que se cuantifican los pixeles positivos en la imagen entre el área analizada (IOD). Los datos representan el promedio de 4 fotos de regiones representativas

#### Recursos humanos

Este trabajo será la Tesis de Especialidad de la alumna Susana Sil Zavaleta, becaria del Centro Dermatológico “Dr. Ladislao de la Pascua” e inscrita en el



programa de Dermatología en la Universidad Nacional Autónoma de México, se cuenta con el apoyo del Dr. Fermín Jurado Santa Cruz director del Centro Dermatológico “Dr. Ladislao de la Pascua”. y de la Dra. Maria Antonieta Domínguez Gómez, médico a cargo de la unidad de fototerapia del Centro Dermatológico “Dr. Ladislao de la Pascua”. También se trabajara en colaboración con la Unidad de Investigación Médica en Enfermedades Autoinmunes (UIMEA) en Centro Médico Siglo XXI, a cargo de la doctora Laura C. Bonifaz Alfonzo, cuyo laboratorio posee la infraestructura necesaria para la realización del estudio.

#### Recursos materiales

-Equipo para cirugía dermatológica esterilizado por cada paciente a quien se le realice biopsia.

-Material consumible de laboratorio de histopatología para fijación, corte e interpretación de biopsia de piel.

-Un citómetro de flujo FACs Aria con capacidad para evaluar 15 parámetros simultáneos.

-Microscopio APERIO con software imagescope para lectura digital de laminillas

-Una computadora

-Una cámara fotográfica

-Hojas para recolección de datos

#### Recursos físicos

\*Clínica de Fototerapia del Centro Dermatológico “Dr. Ladislado de la Pascua”

\*Laboratorio de Dermatopatología del Centro Dermatológico “Dr Ladislao de la Pascua”

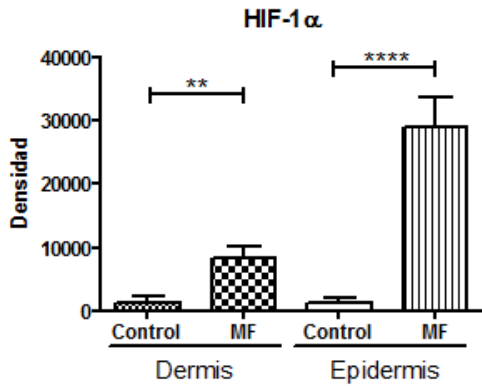
\*Laboratorio de Inmunología del Centro Médico Nacional Siglo XXI.

## **18. RESULTADOS**

### Discusión de Resultados

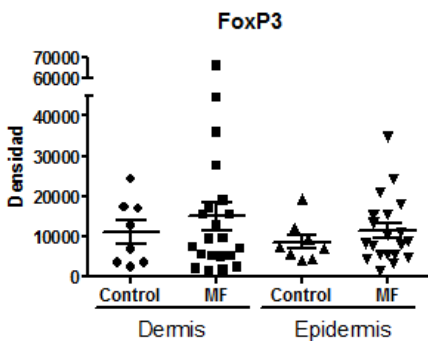
Para el presente estudio se reclutaron 20 pacientes con el diagnóstico de MF, 8 masculinos y 13 femeninos, con una media de edad de 35 años, una desviación estándar de 18 años, edad mínima de 9 años y la edad máxima de 66 años.

Se analizó la expresión de HIF1 $\alpha$ , en epidermis y dermis, de los 20 pacientes, 16 fueron positivos para HIF1 $\alpha$ , con una media de densidad de expresión (IOD) en epidermis de 28,827.49, con un valor máximo de 78,739 y un mínimo de 233, en dermis la media de expresión fue de 8,430.56, con un valor máximo de 24,227 y un mínimo de 564. Al comparar la expresión en MF VS lo controles de piel sana, se demostró una diferencia estadísticamente significativa, ( $P < 0.0001$  para epidermis y de  $p = 0.0017$  en dermis) demostrando por primera vez que HIF1 $\alpha$  está francamente presente en MF.



Cuadro 5. Expresión de HIF1 $\alpha$  en epidermis y dermis de biopsias de piel con MF y controles de piel sana.

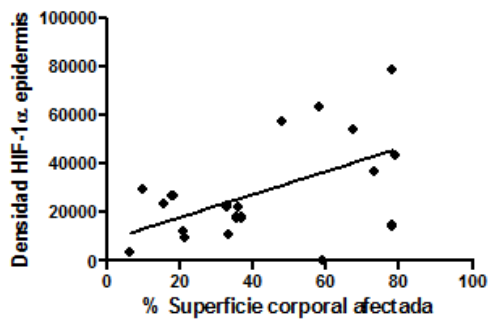
Por medio de tinción para inmunohistoquímica, estudiamos que la densidad de la expresión de FOXP3 en pacientes con MF fue mayor que en los controles, siendo la media de FOXP3 en pacientes con MF en epidermis de 11,355, con un valor máximo de 34,819 y un mínimo de 1,534, y una media en dermis de 15,005, con un valor máximo de 66,006 y un mínimo de 1,416, sin embargo aunque la diferencia entre estos no fue estadísticamente significativa, los pacientes tienen una distribución importante en los valores, se sugiere que esta diversidad puede estar ocasionada por otros factores.



Cuadro 6. Expresión de HIF1 $\alpha$  en epidermis y dermis de biopsias de piel con MF y controles de piel sana.

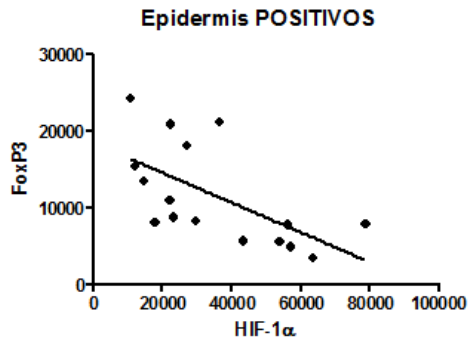
Respecto a la expresión de HIF1 $\alpha$  con la clínica, encontramos una correlación positiva entre HIF1 $\alpha$  y los porcentajes de superficie corporal, el aumento en la expresión de HIF1 $\alpha$ , se presenta a mayor diseminación topográfica de las lesiones, lo cual si demostró significancia estadística con una p de 0.0175 con una r=0.53 y con un coeficiente de determinación de 0.28 (cuadro 7).

Cuadro 7. Correlación entre porcentaje de superficie corporal y expresión de HIF1 $\alpha$ .



Con el objeto de encontrar una asociación entre HIF1 $\alpha$  y FOXP3, se obtuvieron las gráficas de dispersión, las cuales se muestran en el cuadro 8 lo cual fue significativo ya que al obtener el análisis por correlación de Pearson, encontramos una p de 0.0109 con una r=0.16 y un coeficiente de determinación de 0.023 siendo una correlación inversa.

Cuadro 8. Correlación entre la expresión de HIF1 $\alpha$  en epidermis y la expresión de FOXP3 en epidermis.



Además realizamos una matriz de correlación entre todas las variables, los coeficientes de correlación se muestran en la matriz en el cuadro 9.

Cuadro 9. Matriz de correlaciones.

		HIF dermis	HIF epidermis	FOX Dermis	FOX epidermis	Tiempo de evolución (años)	Superficie corporal (%)
HIF dermis	Correlación de Pearson	1	.480 <sup>*</sup>	-.069	-.395	.260	.023
	Sig. (bilateral)		.032	.771	.094	.267	.926
	N	20	20	20	19	20	19
HIF epidermis	Correlación de Pearson	.480 <sup>*</sup>	1	.032	-.522 <sup>*</sup>	.231	.420
	Sig. (bilateral)	.032		.889	.018	.314	.065
	N	20	21	21	20	21	20
FOX Dermis	Correlación de Pearson	-.069	.032	1	.370	-.208	.467 <sup>*</sup>
	Sig. (bilateral)	.771	.889		.109	.365	.038
	N	20	21	21	20	21	20
FOX epidermis	Correlación de Pearson	-.395	-.522 <sup>*</sup>	.370	1	-.307	.022
	Sig. (bilateral)	.094	.018	.109		.189	.928
	N	19	20	20	20	20	19
Tiempo de evolución (años)	Correlación de Pearson	.260	.231	-.208	-.307	1	-.277
	Sig. (bilateral)	.267	.314	.365	.189		.237
	N	20	21	21	20	21	20
Superficie corporal (%)	Correlación de Pearson	.023	.420	.467 <sup>*</sup>	.022	-.277	1
	Sig. (bilateral)	.926	.065	.038	.928	.237	
	N	19	20	20	19	20	20

\*. La correlación es significativa al nivel 0,05 (bilateral).

En esta matriz en la diagonal principal aparecen unos, que son la correlación de una variable consigo misma. Fuera de la diagonal, se muestran los coeficientes de correlación lineal simple de Pearson, mismas que se describirán a continuación: las correlaciones en general fueron de valores pequeñas a valores medianos, el

nivel de significancia utilizado para declararlas diferentes de cero fue de 0.05, con excepción de la correlación entre HIF epidermis con superficie corporal, la cual resulto  $p < 0.065$ .

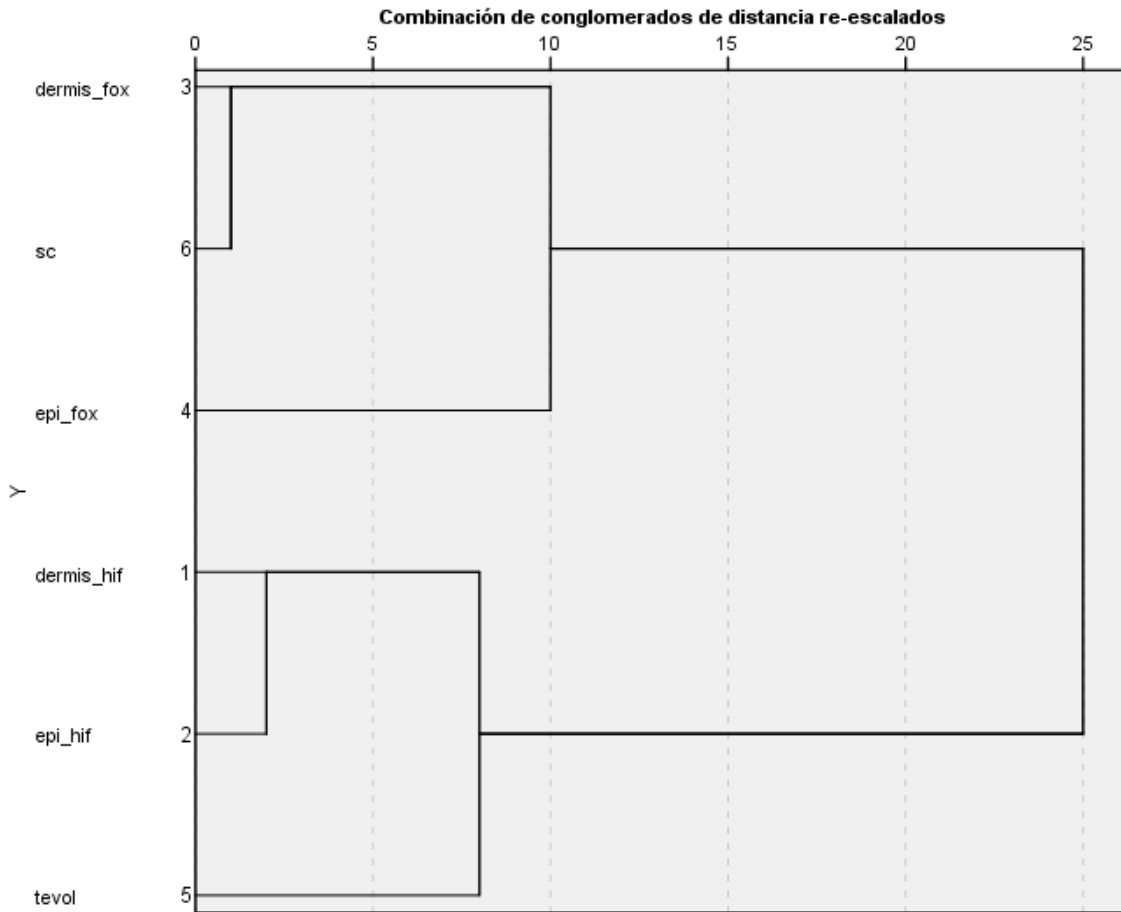
La correlación entre HIF1 $\alpha$  entre dermis con epidermis fue de 0.048 ( $p < 0.032$ ).

Mientras que en epidermis HIF1 $\alpha$  y FOXP3 mostraron una correlación de -0.522 ( $p < 0.018$ ) con FOX epidermis.

En relación a la superficie corporal HIF1 $\alpha$  en epidermis mostró una de 0.42 ( $p < 0.065$ ) y FOXP3 dermis correlacionó con superficie corporal, con una r de 0.467 ( $p < 0.038$ ).

Las estadísticas anteriormente descritas, sugirieron realizar un análisis de conglomerados de las variables en estudio, tomando como medida de asociación los valores de la correlación de Pearson. El dendograma obtenido se muestra en la figura 2.

Figura 2. Dendograma que utiliza una vinculación media entre grupos.



Nótese como las variables FOXP3 dermis, superficie corporal y FOXP3 epidermis forman un conjunto, en el primer nivel de agrupación, mientras que HIF1 $\alpha$  dermis, HIF1 $\alpha$  epidermis y tiempo de evolución forman otro grupo.

Con base a los grupos obtenidos se obtuvieron las correlaciones parciales mismas que se muestran a continuación, FOXP3 dermis y superficie corporal en presencia de FOXP3 en epidermis presentan una correlación de 0.492 ( $p < 0.038$ ). HIF1 $\alpha$  en epidermis y dermis en presencia del tiempo de evolución, con una correlación de 0.0446 ( $p < 0.055$ ).

Analisis de regresión

Con el objeto de poder cuantificar una asociación causal de FOX epidermis con todas las variables (HIF1 $\alpha$ , FOXP3 dermis, tiempo de evolución y superficie corporal), se realizó un análisis de regresión.

El modelo resultante fue (cuadro 10):

$$\text{FOXP3 epidermis} = 14,788.586 - 0.203 * (\text{HIF1}\alpha \text{ epidermis}) + 0.171(\text{FOXP3 dermis})$$

El modelo anterior presenta una R cuadrada de 0.478, es decir explica el 47.8% de la variabilidad total. Este no es con fines de pronóstico clínico, ya que este modelo no es del todo satisfactorio, pero es un intento de asociar FOXP3 epidermis con HIF1 $\alpha$  epidermis y FOXP3 dermis.

Cuadro 10. Análisis de regresión, para FOXP3 en epidermis (variable dependiente).

MODELO	COEFICIENTES NO ESTANDARIZADOS		COEFICIENTES TIPIFICADOS BETA	T	SIG.
	B	DESVIACIÓN TÍPICA			
Constante	14,788.586	2,895.832		5.107	
HIF1 $\alpha$ Epidermis	-.203	.066	-.573	-3.069	.008
FOXP3 Dermis	.171	.085	.375	2.009	.063

Para el caso de FOX dermis se propuso el modelo de regresión con todas las variables (HIF1 $\alpha$ , FOXP3 epidermis, tiempo de evolución y superficie corporal)



El modelo resultante fue (cuadro 11):

$$\text{FOXP3 dermis} = 2014.540 + 309.482 * (\text{Superficie corporal } \%)$$

El modelo anterior presenta una R cuadrada de 0.219, es decir explica el 22% de la variabilidad total de FOXP3 en la dermis. Este modelo no se puede pensar con fines de pronóstico clínico, es un primer paso en tratar de asociar la expresión de FOXP3 en dermis, con otras variables como fue la superficie corporal.

Cuadro 11. Análisis de regresión, para FOXP3 en dermis (variable dependiente).

MODELO	COEFICIENTES NO ESTANDARIZADOS		COEFICIENTES TIPIFICADOS BETA	T	SIG.
	B	DESVIACIÓN TÍPICA			
Constante	2,014.540	7,485.646		.269	.791
Superficie corporal %	309.482	146.186	.478	2.117	.050

## 19. DISCUSIÓN

Actualmente hay un gran interés por demostrar nuevos blanco terapéuticos en el tratamiento de neoplasias, la sobre-expresión de HIF1 $\alpha$  se ha asociado a una pobre respuesta a tratamiento y a un aumento en la mortalidad de los pacientes en diferentes tipos de neoplasias (Tomita et.al 2007, Semenza GL 2003, Aebersold

DM 2001; Bimer P, et al. 2001). En los resultados obtenidos en este trabajo es la primera vez que se demuestra la presencia de este importante factor de transcripción en pacientes con MF. Esta expresión se ha descrito que se ocasiona por alteraciones genéticas provocadas por oncogenes y genes supresores de tumores y/o por la inflamación producida en respuesta al linfoma. Estos resultados son una evidencia más, de la importancia que tiene el microambiente en el desarrollo de neoplasias.

Es sabido que HIF1 $\alpha$  degrada la proliferación de los LTReg, por lo que en nuestros resultados corroboramos que hay una relación inversa entre los niveles de HIF1 $\alpha$  y de LTReg. La presencia de LTReg en pacientes con linfoma cutáneo, ha sido previamente estudiado, con resultados controversiales. Los reportes en los que se realiza un consenso de diferentes publicaciones se menciona que en etapas avanzadas de la enfermedad se encuentra una disminución en los LTReg con respecto a las etapas tempranas.

Ya que está reportado que HIF-1 $\alpha$  promueve la degradación de FoxP3 y por lo tanto, disminuye la diferenciación hacia LTReg, entonces buscamos si existía una relación entre la expresión de estos factores en nuestros pacientes, así pudimos corroborar la relación inversa que hay entre estos dos factores de transcripción, aunque previamente en la literatura no se ha comprobado que factores pueden influenciar la presencia de LTReg en pacientes con MF, al demostrar la expresión de HIF1 $\alpha$ , podemos hipotetizar que HIF1 $\alpha$  en pacientes en estadios tempranos de MF, puede estar favoreciendo que los LTReg se mantengan en niveles parecidos al sano y que por lo tanto no se lleve a cabo una respuesta inmune adecuada en

contra del linfoma. al detallar la asociación entre estos, se aprecia significativamente que la mayor expresión de HIF1 $\alpha$ , se asocia a una disminución en FOXP3, por lo que HIF1 $\alpha$  pudiera ser un factor clave en la promoción del linfoma cutáneo, ya que en presencia de HIF, los LTReg se degradan y probablemente en esta situación no actúen en contra del tumor proliferante. Sería enriquecedor analizar esta correlación en pacientes con MF en estadios avanzados y describir el comportamiento de estos factores.

De manera interesante, al hacer la correlación clínica, el aumento en la expresión de HIF1 $\alpha$ , se presenta a mayor diseminación topográfica de las lesiones, lo cual se relaciona a lo previamente descrito en la literatura en que la disminución de LTReg tiene relación inversa con el estadio de la enfermedad, que si bien en este estudio no demostramos significancia estadística en la relación entre FOXP3+ y la extensión clínica, la tendencia si favorecía a que a mayor expresión de HIF1 $\alpha$ , mayor superficie corporal afectada. Por lo que la búsqueda de HIF1 $\alpha$ , pudiera en un futuro ser considerada un factor asociado una mayor evolución de la enfermedad, aunque debe ser descrita en los diferentes estadios de la misma.

En la literatura algunos autores reportan un aumento de LTReg FOXP3+ en estadios avanzados de MF, asociado a un mal pronóstico por el papel inmunosupresor que se les atribuye a estas células en otras neoplasias, como en melanoma (Berger CL 2005). Así también hay quienes han asociado que la presencia de estas células en estadios tempranos, jugarían un papel fundamental al aumentar la sobrevida de los pacientes, ya que para este caso en particular disminuirían la proliferación de células T neoplásicas, (Gjerdrum LM 2007;

Kasprzycka M 2008), por lo que con estos antecedentes deberíamos plantearnos si la presencia de un factor que degrada LTReg en estadios tempranos, como HIF pudiera asociarse a un peor pronóstico y en un futuro el hallazgo de este factor funcionar como marcador de evolución.

## **20.- CONCLUSIONES**

El factor asociado a hipoxia HIF1 $\alpha$  tiene un papel importante al activar genes que promueven progresión tumoral, esta progresión es también favorecida por una deficiencia en linfocitos T reguladores. La relación inversa entre estos factores de transcripción puede ser un estímulo que provoca la evolución del tumor, encontrar esta asociación en estadios tempranos pudiera determinar el pronóstico de los pacientes; así de acuerdo a estos hallazgos HIF sería un importante blanco terapéutico.

A simple vista hay una diferencia en la distribución comparando a los pacientes con los controles, lo cual parece ser prometedor por lo que sugerimos el control de los confusores universales en próximos estudios e incluir pacientes y controles equivalentes para corroborar los datos expuestos con mayor significancia.

## 21.- REFERENCIAS

1. Wood GS, Reizner G. Other papulosquamous disorders: Small Plaque Parapsoriasis and Large Plaque Parapsoriasis in Bologna JL, Jorizzo JL, Rapini RP. *Dermatology*. Ed Mosby Elsevier. 2da ed. 2008. Cap.10.
2. Olsen E. Revisions to the staging and classification of mycosis fungoides and Sézary syndrome: a proposal of the International Society of Cutaneous Lymphomas (ISCL) and the cutaneous lymphoma task force of the European Organization of Research and treatment of Cancer (EORT). *Blood* 2007;110:1713-1722.
3. Burg G, Dummer R, Nestle F, Doebbeling U, Haeffner A. Cutaneous Lymphomas Consist of a Spectrum of Nosologically Different Entities Including Mycosis Fungoides and Small Plaque Parapsoriasis. *Arch Dermatol* 1996. 132: 567-572.
4. Cho-Vega JH, Tschen JA, Duvic M, Vega F. Early-stage mycosis fungoides variants: case-based review. *Annals of Diagnostic Pathology* 2010;14:369-385.
5. Bañuelos-Espinosa MA, Rodríguez-Montes CE, Zárate-Osorno A. Epidemiología y subtipos de neoplasias linfoides: Estudio multicéntrico. *Rev Sanid Milit Mex* 2007;61:302-309.
6. Wong HK, Mishra A, Hake T, Porcu P. Evolving insights in the Pathogenesis and Therapy of Cutaneous T-cell lymphoma (Mycosis Fungoides and Sezary Syndrome). *Br J Dermatol* 2011;155:150-166.

7. Galper SL, Smith BD, Wilson LD. Diagnosis and Management of Mycosis Fungoides. *Oncology* 2010;24:491-501.
8. Colotta F, Allavena P, Sica A, Garlanda C, Mantovani A. Cancer-related inflammation, the seventh hallmark of cancer: links to genetic instability. *Carcinogenesis* 2009;30(7):1073-1081.
9. Krejsgaard T, Odum N, Geisler C, Wasik MA, Woetmann A. Regulatory T cells and Immunodeficiency in mycosis fungoides and Sézary syndrome. *Leukemia* 2012;26:424-432.
10. Gershon RK, Kondo K. Cell interactions in the induction of tolerance: the role of thymic lymphocytes. *Immunology* 1970;18:723.
11. Hisashi A, et al. Study of regulatory T cells and NKT cells in jaan: A historical perspective. *Int Immunol* 2009;21:1101-1103.
12. Sakaguchi S, Makoto M, Costantino CM, Hafler DA. FOXP3+ regulatory cells in the human immune system. *Nature* 2010;10:490-500.
13. Berger CL, Tigelaar R, Cohen J, Mariwalla K, Trinh J, Wang N, et al. Cutaneous T-cell lymphoma: malignant proliferation of T-regulatory cells. *Blood* 2005;105:1649-1647.
14. Kasprzycka M, Zhang Q, Witkiewicz A, Marzec M, Potoczek M, Liu X, et al.  $\gamma$ c-Signaling Cytokines Induce a Regulatory T Cell Phenotype in Malignant CD4+ T Lymphocytes. *J Immunol* 2008;181:2506-2512.
15. Gjerdrum LM, Woetman A, Odum N, Burton CM, Rossen K, Skovgaard GL, Ryder LP. FOXP3+ regulatory T cells in cutaneous T-cell lymphomas: association with disease stage and survival. *Leuk* 2007;21:2512-2518.

16. Siachoque H, Satisteban N, Iglesias-Gamarra A. Linfocitos T reguladores: suboblaciones, mecanismo de acción e importancia en el control de la autoinmunidad. *Rev Col Reum* 2011;18:203-220.
17. Shi LZ, Wang R, Huang G, Vogel P, Neale G, Green DR, Chi H. HIF1 $\alpha$ -dependent glycolytic pathway orchestrates a metabolic checkpoint for the differentiation of TH17 and Treg cells. *J Ex med* 2008;208:1367-1376.
18. Fujimura T, Okuyama R, Ito Y, Aiba S. Profiles of Foxp3+ regulatory cells in eczematous dermatitis, psoriasis vulgaris and micosis fungoides. *Br J Dermatol* 2008;1256-1263.
19. de Boer OJ, van der Loos CM, Teeling P, van der Wall AC, Teunissen MBM. Immunohistochemical Analysis of Regulatory T Cell Markers FOXP3 and GIRT on CD4+ CD25+ T Cells in Normal Skin and Inflammatory Dermatoses. *J Histochem Cytochem* 2007;55:891-898.
20. Klemke CD, et. Al. Paucity of FOXP3+ cells in skin and peripheral blood distinguishes Sézary syndrome from other cutaneous T-cell lymphomas. *Leukemia* 2006;20:1123-1129.
21. Harris AL. Hypoxia: a key regulatory factor in tumor growth. *Nat Rev Cancer* 2002;2:38-47
22. Nutsch K, Hsieh C. When T cells run out of breath: The HIF1 $\alpha$  Story. *Cell* 2011;146:672-673.
23. Tomita M, Semenza GL, Michiels C, Matsuda T, Uchihara JN, Okudaira T, et. Al. Activation of hypoxia-inducible factor 1 in human T-cell leukaemia virus type 1-infected cell lines and primary adult T-cell leukaemia cells. *Biochem J* 2007;406:317-323.

24. Ben-Shoshan J, Maysel-Auslender S, Mor A, Keren G, George J. Hypoxia controls CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory T-cell homeostasis via hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$ . *Eur J Immunol* 2008;38:2412-2418.
25. Dang EV y cols. Control of TH17/Treg Balance by Hypoxia-Inducible Factor 1. *Cell* 2011;146:772-784
26. Nys K, Maes H, Dudek AM, Agostinis P. Uncovering the role of Hypoxia inducible factor - 1 $\alpha$  in skin carcinogenesis. *Biochimica et Biophysica Acta* 2011;1816:1-12.
27. Pore N y cols. EGFR tyrosine kinase inhibitors decrease VEGF expression by both hypoxia-inducible factor (HIF)-1-independent and HIF-1 dependent mechanisms. *Cancer Res* 2006;66(6):3197-3204.
28. Tennant DA, Duran RV, Gottlieb E. Targeting metabolic transformation for cancer therapy. *Nat Rev Cancer*;10(4):267-277.
29. Aebbersold DM, Burri P, Beer KT, Laissue J, Donovan V, Greiner RH, Semenza GL. Expression of hypoxia-inducible factor 1 $\alpha$ : a novel redictive and prognostic parameter in the radiotherapy of oropharyngeal cancer. *Cancer Res* 2001;61:2911-2916.
30. Dunn GP, Bruce AT, Ikeda H, Old LJ, Schreiber RD. Cancer immunoeediting: from immunosurveillance to tumor escape. *Nature Immunology* 2002;6:836-848.
31. Solomon GJ, Magro CM. Foxp3 expression in cutaneous T-cell lymphocytic infiltrates. *J Cut Pathol* 2008;35(11):1032-1039.