



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE MEDICINA

DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSTGRADO E INVESTIGACIÓN

SECRETARÍA DE SALUD DEL DISTRITO FEDERAL

DIRECCIÓN DE EDUCACIÓN E INVESTIGACIÓN

SUBDIRECCIÓN DE POSTGRADO E INVESTIGACIÓN

CENTRO DERMATOLÓGICO "DR. LADISLAO DE LA PASCUA"

CURSO UNIVERSITARIO DE ESPECIALIZACIÓN EN DERMATOLOGÍA

**DETERMINACION DEL FACTOR DE TRANSCRIPCION NUCLEAR TOX EN
PARAPSORIASIS, COMO FORMA CLINICA DE MICOSIS FUNGOIDE**

PRESENTADO POR: EMANUEL FIGUEROA BENITEZ

TESIS QUE:

PARA OBTENER EL DIPLOMA DE ESPECIALISTA EN DERMATOLOGIA

ASESOR DE LA INVESTIGACIÓN:

DR. GIBRAN PEREZ MONTESINOS

Vo.Bo.

Dr. Fermín Jurado Santa Cruz

Director del Centro Dermatológico Dr. Ladislao de la Pascua



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.

Vo.Bo.

Dr. Gibrán Pérez Montesinos

Dra. Laura Bonifaz Alfonso

INDICE

1. MARCO TEORICO	
1.1 Antecedentes.....	5
1.2 Planteamiento del Problema.....	20
1.3 Pregunta de Investigación	22
1.4 Hipótesis.....	22
1.5 Justificación.....	22
1.6 Objetivo General.....	23
1.7 Objetivos Específicos.....	23
2. MATERIAL Y MÉTODOS	
2.1 Tipo de estudio.....	24
2.2 Diseño del universo.....	24
2.2.1 Criterios de Inclusión.....	24
2.2.2 Criterios de Exclusión.....	24
2.2.3. Diseño de la muestra.....	25
2.3 Determinación de variables.....	25
3. ASPECTOS ÉTICOS Y DE BIOSEGURIDAD.....	25
4. ASPECTOS LOGISTICOS	
4.1 Etapas del estudio.....	26
4.2 Recursos Humanos.....	26
4.3 Recursos materiales.....	26
4.4. Recursos Físicos	26
4.5 Técnica de Inmunofluorescencia y microscopia.....	27
5. RESULTADOS.....	29
6. DISCUSION.....	32

7. CONCLUSIONES.....	35
8. BIBLIOGRAFIA.....	37
9. ANEXOS (TABLAS, INMUNOFLUORESCENCIAS).....	40
10.AGRADECIMIENTOS.....	44

ANTECEDENTES

PARAPSORIASIS

La Parapsoriasis constituye un grupo de enfermedades cutáneas, de causa desconocida y de evolución crónica, caracterizadas por placas eritematoescamosas persistentes y con un potencial de desarrollar trastornos linfoproliferativos cutáneos de células T.

Fue descrita por primera vez por Unna y colaboradores en 1890, denominándola en ese entonces Parapsoriasis variegata. En 1902 Brocq describe tres variedades de Parapsoriasis: en gotas, liquenoide y en placas. En 1905 Radcliffe-Crocker utilizó el término de xantoeritrodermia pertans, conocida hoy como una variante de la Parapsoriasis en pequeñas placas¹.

En 1994 se definen dos grupos: Parapsoriasis digitiforme y poiquilodérmica.

MICOSIS FUNGOIDE

La Micosis Fungoide (MF) está comprendida dentro de los Linfomas Cutáneos de Células T (LCCT), considerados como un grupo heterogéneo de linfomas extranodales no-Hodgkin, y por definición, confinados en la mayoría de los casos al diagnóstico en la piel, la MF es la forma más común de estos, junto al Síndrome de Sézary (SS) en hasta un 75% de los casos.

En la mayoría de los casos se encuentran en la piel células T de memoria que expresan CD45RO⁺ CLA y E- Selectina. Las células residentes de la piel sobreexpresan además quimiocinas para los receptores CCR4, CCR6 y CCR10, entre otras; las cuales son necesarias para la migración en la piel.²

La MF fue descrita por primera vez en 1806 por Alibert, nombrándola en ese entonces *pian fungoid*, debido a la similitud morfológica con los hongos.³

EPIDEMIOLOGÍA

Las Parapsoriasis son más frecuentes en la edad adulta y en la tercera edad, aunque también pueden presentarse en la infancia, el pico de presentación oscila entre los 40 y 50 años, sin diferenciar razas o regiones geográficas, sin embargo existe un predominio por el género masculino 3:1.⁴

La Parapsoriasis en grandes y pequeñas placas se consideran las formas clínicas más comunes, mientras que la pitiriasis liquenoides y varioliformes son las menos frecuentes.

La clasificación actual se presenta a continuación:

1. Parapsoriasis en grandes placas (PGP)
 - a. Parapsoriasis retiforme (reticular) o variegata
 - b. Poiquilodermia atrófica vascular
2. Parapsoriasis en pequeñas placas (PPP)
 - a. Xantoeritrodermia pertans
3. Pitiriasis Liquenoide

- a. Aguda (Mucha-Habermann)
- b. Crónica (Juliusberg)

Por otro lado, la MF típicamente afecta individuos de edad entre 55 y 60 años y más frecuente varones (2:1), sin embargo, puede observarse en jóvenes e incluso en población infantil ⁶. En México se realizó un estudio epidemiológico en tres centros hospitalarios del Distrito Federal en un período de 7 años donde se encontró una prevalencia de 0.4% de MF dentro de las neoplasias linfoides³.

Los pacientes con MF y SS tienen un riesgo incrementado para desarrollar un segundo linfoma, muy particularmente Linfoma Hodgkin, e incluso neoplasias malignas no hematológicas⁶.

PATOGENIA

Se desconoce la etiología de la Parapsoriasis en grandes y pequeñas placas. Ambas se caracterizan por presencia de infiltrados linfoides cutáneos superficiales compuestos, constituidos principalmente por células T CD4⁺. Al día de hoy se ha establecido que la Parapsoriasis de grandes placas y sus variantes son manifestaciones de estadios tempranos de MF ⁴.

Por otro lado, la células que originan la MF son los linfocitos T maduros de memoria CD4⁺ CD45RO⁺. La unión de estos a través de L-selectina es requerida para la migración de Linfocitos T. Las células T residentes en piel sobreexpresan receptores CCR4, CCR6 y CCR10, indispensables para la migración a la piel. Los

disparadores de estos procesos son complejos y aún no se han aclarado por completo, por ejemplo, se han asociado agentes infecciosos (virus linfotropo humano, Epstein-Barr, Citomegalovirus), factores ocupacionales y mutaciones genéticas.

Ante lo explicado anteriormente los queratinocitos responden liberando citocinas reclutadoras de leucocitos que inician y mantienen la inflamación cutánea, así como la perpetuación de lesiones en MF.

Dentro de los factores genéticos asociados a MF se ha observado hiperexpresión de GATA-3, un factor de transcripción nuclear importante para la diferenciación de Linfocitos T CD4 hacia Th2; además de JunB, regulador de la expresión de IL-4.⁷

FACTORES DE TRANSCRIPCIÓN NUCLEAR

TOX (Selección de Timocito asociado a proteína HMG bOX) se expresa en varias células del sistema inmune, siendo de vital importancia en el desarrollo de linfocitos T CD4 y células asesinas naturales (NK). TOX es un factor de transcripción nuclear expresado en timo como regulador en la fase de maduración de linfocitos T CD4 Sin embargo la expresión de TOX no se limita a timo, se observa también en hígado, donde probablemente regula procesos metabólicos. Existen cuatro subtipos de TOX, TOX 1 juega un rol fundamental en la maduración de linfocitos dentro del timo, TOX2 puede jugar un papel en la reproducción de órganos, TOX3 se ha

implicado en la regulación de la supervivencia de neuronas y en el cáncer de mama y finalmente TOX4 interactúa con el complejo fosfatasa e involucra el control de la estructura de la cromatina y la progresión del ciclo celular.

TOX desempeña un papel de suma importancia en la regulación positiva de linfocitos t durante la selección y parte de linfocitos B en los timocitos, esto es mediado por TCR-señalización vía calcineurina: de manera paralela se ha postulado también un rol en la remodelación de la cromatina, sin embargo, esto aún no se ha determinado.

De manera interesante TOX induce regulación a la alza de linfocitos T CD8 y depleción de CD4, esto se logra por inactivación de los factores de transcripción nuclear RUNX3 y ThPOK (inhibidores de la progresión de linaje de CD8) en ausencia de una señalización positiva para CD4.

En la ausencia de TOX se inicia una regulación a la alza de CD69, CD5 y GATA3, y regulación a la baja de CD4 y CD8, este bloqueo en el desarrollo no solo afecta el linaje de CD4 sino también de células NK y FOXP3⁺.

TOX puede también participar en la regulación de la Proteína E en los timocitos (necesaria para la regulación positiva de CD4), de manera interesante, cuando existe una pérdida de la expresión de la proteína E se presenta una regulación a la baja de genes blanco para IL-7R α , CCR7 y L-selectina ¹⁵.

Recientemente se ha asociado a TOX como un marcador molecular en el diagnóstico histológico de Micosis fungoide en estadio inicial.

Zhang y col., realizaron una búsqueda de marcadores tempranos para MF, partiendo del análisis de 349 genes, estos se asociaron a vías de inflamación, activación inmunológica y regulación de apoptosis, de ellos, 330 tuvieron una amplia regulación a la alza en procesos inflamatorios crónicos, siendo excluidos de manera inicial, restando 19 genes que no tenían sobreexpresión en inflamación crónica; pero solo dos de esos genes demostraron discriminación entre MF y procesos inflamatorios benignos, TOX y PD-L1. De manera interesante TOX demostró alta especificidad en Inmunohistoquímica e inmunofluorescencia en biopsias de piel con MF, incluyendo epidermotropismo inicial en microabcesos de Pautrier. Con esta información, ellos concluyen que TOX puede ser un marcador inicial en MF ⁸.

Morimura y cols., investigaron la presencia de TOX a través de Inmunohistoquímica en diferentes tipos de linfomas cutáneos, en micosis fungoide en su fase de parches, placas y tumoral; también se incluyó el Síndrome de Sézary (SS), papulosis linfomatoide, linfoma cutáneo primario anaplásico (LCPACG) de células grandes, dermatitis atópica y piel normal. Ellos encontraron una expresión alta de TOX en MF, SS y LCPACG en comparación con piel normal, concluyendo que TOX se comporta como un marcador específico para ciertos tipos de linfomas cutáneos ¹⁰.

Huang y cols., examinaron la expresión de TOX en 113 muestras de piel de MF, distribuidas en dos cohortes, una de 59 pacientes, y la otra de 54 pacientes, la primera en estadios avanzados de MF, y la otra en estadio temprano. Se encontró una expresión anormal de

TOX en la mayoría de las muestras, encontrando además que niveles altos de TOX correlacionaban con progresión de la patología¹³.

CUADRO CLINICO

La PPP se presenta clínicamente principalmente en el tronco , mostrando placas eritematosas o amarillentas pequeñas, circulares, ovales o digitiformes, no exceden 5 cm de diámetro, con poca escama. Cabe mencionar que esta topografía tiende a seguir las líneas de Blaschko; en esos casos se le denomina dermatosis digitada, y cuando las lesiones son de color amarillo predominante se le denomina *Xantoeritrodermia perstans* (descrita por Radcliffe y Crocker en 1905).

Por otro lado la PGP se presenta principalmente en nalgas y zonas intertriginosas. En las mujeres se observa con cierta frecuencia en la región mamaria, se observan placas mayores a 10 cm de diámetro, mal delimitadas, eritematosas, en parches o en ocasiones placas atróficas. La superficie de la piel presenta en ocasiones la apariencia de “papel de cigarrillo”, consecuencia a la atrofia del epitelio⁵.

MICOSIS FUNGOIDES (ASPECTOS CLINICOS)

Bazin en 1806 caracterizó las tres fases que corresponden a la progresión de la enfermedad, la cual inicia usualmente en zonas no expuestas al sol (distribuidas en traje de baño), en áreas periaxilares, cara interna de brazos, muslos y nalgas; sin embargo, pueden existir lesiones en cara y piel cabelluda en la variante folicular de MF, de manera inicial se observan manchas eritematosas múltiples, aunque se puede manifestar una sola placa, en algunos casos encontramos

poiquilodermia (atrofia, hipo o hiperpigmentación moteada y telangiectasias). Posteriormente, en algunos casos las lesiones progresan a placas y/o tumores e incluso puede presentarse el estado eritrodérmico.^{3,5, 11}.

Esta clasificación es arbitraria en muchas ocasiones, debido a que algunos pacientes pueden presentar lesiones cutáneas en todas las fases de manera simultánea, mientras que en algunos pacientes la enfermedad no progresa.

Las lesiones tipo placas son generalmente más eritematosas y mejor definidas con presencia de escama, localizadas en áreas donde existieron manchas o en superficies distintas. Las placas pueden aumentar de tamaño y formar tumores que pueden ulcerarse y desarrollar infecciones secundarias.

Ocasionalmente, los pacientes con MF desarrollan eritrodermia, linfadenopatía y compromiso visceral.

Existen variantes de MF, entre ellas, MF foliculotrópica, afecta con frecuencia cuello y cabeza, presenta pápulas foliculares, pudiendo encontrarse lesiones acneiformes, comedones, quistes y lesiones con aspecto de prurigo nodular. Se considera una forma menos indolente con poca respuesta al tratamiento tópico,

La variante de reticulosis pagetoide o enfermedad de Woringer-Kolopp (MF unilesional) es poco frecuente, se caracteriza por una placa solitaria psoriasiforme en pie o mano; más común en mujeres

durante la infancia, de curso indolente que posee buena respuesta a la radioterapia.

Existen otras variantes menos frecuentes, como la forma palmar y plantar, observada en el 0.6% de los casos, caracterizada por placas delgadas³.

DIAGNÓSTICO

HISTOPATOLOGÍA, INMUNOHÍSTOQUÍMICA

Con respecto a la PPP en la epidermis se observa hiperqueratosis con áreas paraqueratósicas y espongiosis leve. En la dermis encontramos escaso infiltrado de linfocitos T cooperadores, perivasculares, no existe epidermotropismo o formación de microabcesos de Pautrier. Para el diagnóstico final se requiere correlación clínico-patológica.

La Inmunohistoquímica tiene un valor limitado para distinguir entre PPP y PGP.

Las lesiones de PPP surgen de forma insidiosa durante un período de meses y pueden persistir por años, por lo general son asintomáticas, la exposición a la luz solar es beneficiosa en la mayoría de los casos. En raras ocasiones se ha reportado la progresión a MF.

Por otro lado, la PGP presenta atrofia variable uniforme o no uniforme de la epidermis, encontrándose hiperqueratosis variable, así como un infiltrado en banda a nivel dérmico constituido básicamente por linfocitos. Se pueden observar linfocitos T hipercromáticos con contorno nuclear convoluto en epidermis o en la unión dermoepidérmica. No se encuentran Microabscesos de Pautrier.

Para algunos autores la PGP es considerada como una variante o fase temprana de MF.

MICOSIS FUNGOIDE

HISTOPATOLOGÍA

Para el diagnóstico histológico de MF se han establecido diversos criterios; a continuación, presentamos los más aceptados hasta el momento:

1. Presencia de células linfoides atípicas que son ligeramente más grandes que los linfocitos normales, además de tener núcleos hipercromáticos y contorno irregular.
2. Presencia de linfocitos atípicos con halo individual dentro de la epidermis.
3. Presencia de una hilera de linfocitos entre la capa basal y la epidermis con distribución pagetoide.
4. Incremento sesgado de número de linfocitos (no necesariamente atípicos) en relación a una dermatitis típica,

distribuidos individualmente o en pequeñas colecciones. Se expresa aquí el término de epidermotropismo desproporcionado.

5. Presencia de dermatitis de interfase.
6. Presencia de fibrosis en dermis papilar⁶.

Las variantes de MF pueden presentar los mismos cambios histológicos, algunas formas clínicas presentan rasgos distintivos. La variante folicular muestra linfocitos atípicos alrededor y en el epitelio folicular (foliculotropismo), con menos epidermotropismo, presentando mucinosis folicular hasta en 50% de los casos. Se puede observar también un patrón similar a Foliculitis eosinofílica, patrón quístico, hiperplasia basaloide foliculolinfoide y patrón mixto foliculotrópico y siringotrópico.

La reticulosis pagetoide se presenta con hiperqueratosis paraqueratósica, con un infiltrado epidérmico prominente de linfocitos atípicos más allá de la membrana basal y Microabscesos de Pautrier, mientras la variante palmo-plantar tiene un infiltrado linfocítico Dermo-epidérmico y puede contener eosinófilos.

Por otro lado, un dato de mal pronóstico es la transformación a células grandes (aumento en al menos 25% del tamaño normal de un linfocito) siendo frecuente este cambio en la variedad tumoral y eritrodérmica³.

ESTADIO CLÍNICO

En contraste con muchos otros trastornos linfoproliferativos donde los hallazgos citogénéticos y de laboratorio juegan un papel preponderante en la estratificación del riesgo, la clasificación TNMB (tumor, nódulo, metástasis y sangre) mantiene un factor pronóstico importante en la MF.

En 2007, la ISCL y EORTC revisaron la clasificación TNMB para MF. Pacientes con solo parches y placas tienen estadio I de la enfermedad, además, basados en la extensión de piel afectada se puede clasificar en Estadio IA (<10% de superficie corporal afectada o T1) o Estadio IB (>10% de superficie corporal afectada o T2). Para propósitos prácticos el área de una mano representa 1% de superficie corporal.

Pacientes con placas y/o parches con preservación de la arquitectura de cualquier nodo anormal se clasifican en Estadio IIA. Los pacientes en estadio I y IIA tienen estadio limitado de la enfermedad.

Por otro lado, pacientes en Estadio tumoral (T3), eritrodermia (T4), afección de nódulos (N3), metástasis viscerales (M1) o afección leucémica significativa (B2) tienen un estadio avanzado de la enfermedad.²

TABLE I. ISCL/EORTC Staging

Stage	TNMB classification				Median OS (years)	10-Year(5)		
	T	N	M	B		OS (%)	DSS (%)	RDP (%)
IA	1	0	0	0,1	35,5	88	95	12
IB	2	0	0	0,1	21,5	70	77	38
IIA	1,2	1	0	0,1	15,8	52	67	33
IIB	3	0-2	0	0,1	4,7	34	42	58
IIIA	4	0-2	0	0	4,7	37	45	62
IIIB	4	0-2	0	1	3,4	25	45	73
IVA1	1-4	0-2	0	2	3,8	18	20	83
IVA2	1-4	3	0	0-2	2,1	15	20	80
IVB	1-4	0-3	1	0-2	1,4	18 (5 year)	18 (5 year)	82 (5 year)

DSS: disease-specific survival; OS: overall survival; RDP: risk of disease progression.

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	Baja carga tumoral en sangre (menos de 5% de células de Sézary, pero no B2)
B1	Baja carga tumoral en sangre (5% de linfocitos circulantes (o <5% de linfocitos) circulantes (o <5% de linfocitos)
B2	Alta carga tumoral en sangre (1000/mL de células de Sézary + una clona positiva)

EVALUACION DE SUPERFICIE CORPORAL AFECTADA

La forma más utilizada para el cálculo de la superficie corporal afectada es la de Lund-Browder; ésta se basa en regiones anatómicas que guardan relación con la proporción de un área

corporal, tomando el cuerpo como un todo, cuando las lesiones no ocupan la totalidad del segmento corporal se utiliza la palma corporal como guía (previamente señalado el 1%).

TRATAMIENTO

El tratamiento depende de forma exclusiva del estadio de la enfermedad. En el estadio I y IA el objetivo principal es mejorar los síntomas y la calidad de vida mientras se evita la toxicidad relacionada al tratamiento. Para muchos pacientes el manejo puede ser expectante (“ver y esperar”) o bien, usando terapias directas en la piel.

Pacientes con estadio avanzado requieren manejo multidisciplinario con varias terapias combinadas dirigidas a la piel, modificadores de la respuesta biológica (bexaroteno e interferón α) y últimamente el uso Inhibidores de la desacetilación de histonas.²

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La Micosis Fungoide representa el 60% de los linfomas cutáneos de células T, a menudo existe dificultad para llegar al diagnóstico de Micosis Fungoides cuando se encuentra en estadio de parches o placas debido a que simula una gran variedad de enfermedades inflamatorias, entre ellas, el grupo comprendido por las Parapsoriasis. En un intento por establecer el diagnóstico temprano de esta entidad patológica la Sociedad Internacional de Linfomas Cutáneos (ISCL) estableció un algoritmo diagnóstico donde se consideran criterios Clínico-patológicos, así como la pérdida de marcadores de superficie CD2, CD3, CD7 y CD26 por Inmunohistoquímica. Sin embargo, a la fecha, no existe un marcador específico que defina la presencia de Micosis Fungoide.

T. Zhang y cols., proponen al factor de Transcripción nuclear TOX (Selección de Timocito-asociado a Proteína HMG-bOX); que pertenece a la subfamilia de proteínas HMG-box, tiene un papel fundamental en el desarrollo de células T en el Timo; como marcador molecular para Micosis Fungoides en estadio temprano, mientras que Huang y cols., mencionan que la expresión del factor de transcripción nuclear TOX está ligado a un pobre pronóstico.

En nuestro país no se han realizado estudios con este factor de transcripción nuclear en el contexto de Parapsoriasis y Micosis Fungoides. Debido a esto, surge la inquietud de determinar la expresión del factor de transcripción nuclear TOX en biopsias de

pacientes con diagnóstico clínico de Parapsoriasis y así establecer el diagnóstico temprano de Micosis Fungoide y con ello iniciar el tratamiento de manera temprana en estos pacientes y mejorar su supervivencia.

PREGUNTA DE INVESTIGACION

¿Existe expresión de TOX en biopsias de pacientes con diagnóstico de Parapsoriasis y biopsias de Micosis Fungoide?

HIPÓTESIS

TOX se encontrará expresado en biopsias con Parapsoriasis así como de Micosis Fungoide.

JUSTIFICACION

Clínica e histopatológicamente la Micosis fungoide en estado inicial puede confundirse con Parapsoriasis, resulta relevante encontrar un marcador molecular que permita esta diferenciación.

TOX es un factor de transcripción que regula la transición de linfocitos T CD4 y CD8 durante la selección positiva de células T. Tras la maduración de las células T CD4, TOX se inactiva antes de que los linfocitos CD4 salgan del timo, y nunca se expresa de nuevo en un linfocito T CD 4 maduro.

Recientemente se ha comunicado y propuesto a TOX como marcador molecular para el diagnóstico histológico de micosis fungoide.

OBJETIVO GENERAL.

Determinar la expresión del factor de Transcripción nuclear TOX en biopsias con Parapsoriasis y en biopsias de Micosis Fungoide de pacientes del Centro Dermatológico Pascua

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar la expresión de TOX en biopsias de Parapsoriasis
- Determinar la expresión de TOX en biopsias de Micosis Fungoide.
- Correlacionar la expresión de TOX en Parapsoriasis y Micosis Fungoide.

MATERIAL Y MÉTODOS.

- TIEMPO Y LUGAR

El estudio se llevara a cabo en el Laboratorio de Inmunología de Centro Médico Nacional Siglo XXI.

- DISEÑO

Retrospectivo, comparativo

- POBLACIÓN

No aplica

- CRITERIOS DE INCLUSIÓN

1. Bloques de parafina con diagnóstico de Parapsoriasis y Micosis Fungoides del Centro Dermatológico Pascua en el período 2006 a 2016

- CRITERIOS DE EXCLUSIÓN

1. No Aplica

- UNIVERSO DE LA MUESTRA

No aplica

• VARIABLES

VARIABLES	TIPO	DEFINICION OPERACIONAL	ESCALA DE MEDICION	CALIFICACION	FUENTE
Factor de transcripción nuclear TOX	Cualitativa	Positividad a anticuerpo primario al tejido (TOX).	Continua	Emisiones correspondientes a rangos: 425-475 nm (Hoechst), 500-550 nm (verde) y 570-620 nm (rojo)	Bloque de Parafina
CD 4	Cualitativa	Positividad a anticuerpo primario al tejido (CD4).	Continua	Positivo en núcleo en epidermis y Dermis	Bloque de Parafina

RECURSOS

Este trabajo de tesis de especialidad será presentado por el Dr. Emanuel Figueroa Benítez, médico residente del Centro Dermatológico Dr. Ladislao de la Pascua, inscrito en el programa de Residencias Médicas de la Universidad Nacional Autónoma de México.

Tal trabajo cuenta con el soporte del Dr. Fermín Jurado Santa Cruz director del Centro Dermatológico "Dr. Ladislao de la Pascua" y de Dr. Gibrán Pérez Montesinos, especialistas a cargo del laboratorio de Inmunodermatología del Centro Dermatológico "Dr. Ladislao de la Pascua".

Contamos con el apoyo de la Dra. Laura Bonifaz Alfonzo en la Unidad de Investigación Médica en Inmunohistoquímica, perteneciente al Centro Médico Nacional Siglo XXI, que cuenta con la infraestructura necesaria para el desarrollo de este proyecto.

RECURSOS MATERIALES

- Bloques de parafina del servicio de Dermatopatología del Centro Dermatológico Pascua
- Hoja de recolección de número de bloques de parafina

RECURSOS FISICOS

- Laboratorio de Dermatopatología del Centro Dermatológico "Dr. Ladislao de la Pascua".
- Laboratorio de la Unidad de Investigación Médica en Inmunohistoquímica del Centro Nacional Siglo XXI.

TECNICA DE INMUNOFLUORESCENCIA.

1. A partir de tejidos embebidos en parafina y después de haber realizados cortes de tejido en histomo de 5 μ m.
2. Desparafinar los tejidos durante 40 minutos en un horno a 70 oC
3. Pasar los tejidos a un tren de solventes para rehidratar los tejidos, el cual consiste en:
 - Xilol – 5 minutos
 - Xilol – 5 minutos
 - Xilol – etanol (50/50) – 5 minutos
 - Etanol 100%, etanol 80%, etanol 80%, etanol 50%, agua destilada – cada uno durante 5 minutos.
4. Lavar con PBS, 5 minutos en buffer de citratos disuelto en agua destilada ó agua miliQ.
5. Colocar los tejidos en baño María (90 oC, 15 minutos).
6. Enfriar buffer de citratos.
7. Lavar con PBS, 5 minutos.
8. Para evitar la unión inespecífica de los anticuerpos y permeabilizar, incubar con una solución de albúmina sérica bovina 10 mg/ml, suero normal de caballo 5%, azida de sodio 0.02% y tritón x-100 al 0.5% (solución de bloqueo y permeabilización) durante 40 minutos.
9. Adicionar 30 μ L de anticuerpo primario al tejido. (TOX Rabbit polyclonal; Thermo Scientific y CD4 Monoclonal mouse; DAKO) y dejar incubar toda la noche en cámara húmeda a 4oC.
10. Al día siguiente, se realizan 5 lavados con la solución de lavado, 5 minutos por cada lavado.

11. Incubar con el anticuerpo secundario (Anti-Rabbit – AF488 y anti-mouse – AF594) durante 2 horas
12. Hacer 5 lavados con PBS, 5 minutos por cada lavado.
13. Adicionar Hoescht 33285 a una dilución 1:2000 durante 10 minutos.
14. Hacer 2 lavados con PBS, 5 minutos por cada lavado.
15. Montar con el medio Vectashield y almacenar a 4 oC.
16. Lectura a Microscopio

ESPECIFICACIONES DE MICROSCOPIO, TECNICA DE MICROSCOPIA Y SOFTWARE PARA IMÁGENES.

Las imágenes fueron adquiridas en un microscopio invertido Nikon Ti Eclipse, equipado con un sistema de adquisición de imágenes A1, ambos controlados desde el software NIS Elements v.4.5.0. Las imágenes fueron tomadas utilizando un objetivo de 20x (sin inmersión, NA 0.8) o 60x (inmersión de aceite, NA 1.4). Los colorantes fueron excitados en modo secuencial utilizando los láseres proveídos por el fabricante: 403 nm (Hoechst), 488 nm (colorante verde) y 563 (colorante rojo). Las emisiones correspondientes fueron registradas en los siguientes rangos: 425-475 nm (azul) (Hoechst), 500-550 nm (verde) y 570-620 nm (rojo) utilizando los filtros y espejos dicróicos del fabricante. Las imágenes fueron obtenidas y analizadas utilizando el software NIS Elements v.4.5.0 e ImageJ v.

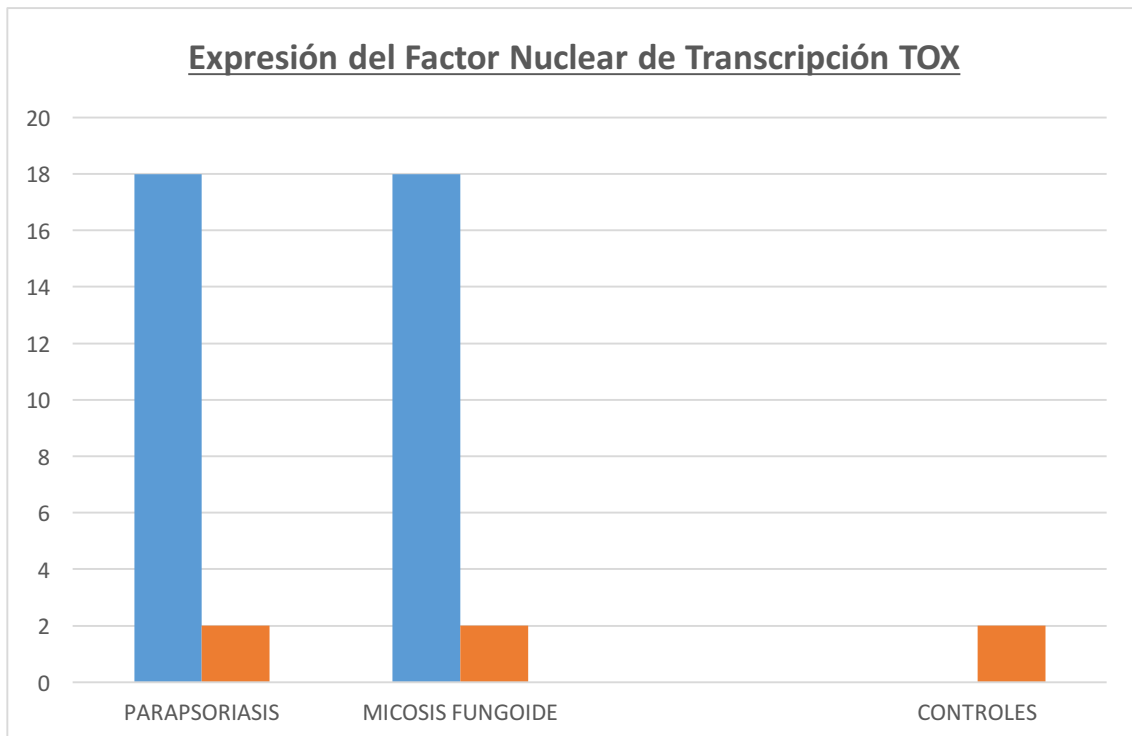
RESULTADOS

Se realizó inmunofluorescencia a 42 cortes de bloques de parafina, 20 con diagnóstico de Micosis Fungoide, 20 con diagnóstico de Parapsoriasis y 2 controles (psoriasis, sano) (ver tabla 1. en sección de anexos).

CORRELACION EN LA EXPRESION DE TOX EN MICOSIS FUNGOIDE Y PARAPSORIASIS.

se observó expresión en 18 muestras de MF (ver fotografía 1) y 18 muestras de Parapsoriasis (ver fotografía 2), 2 muestras de cada enfermedad no expresaron este marcador así como 2 controles negativos(ver fotografía 3 y 4).

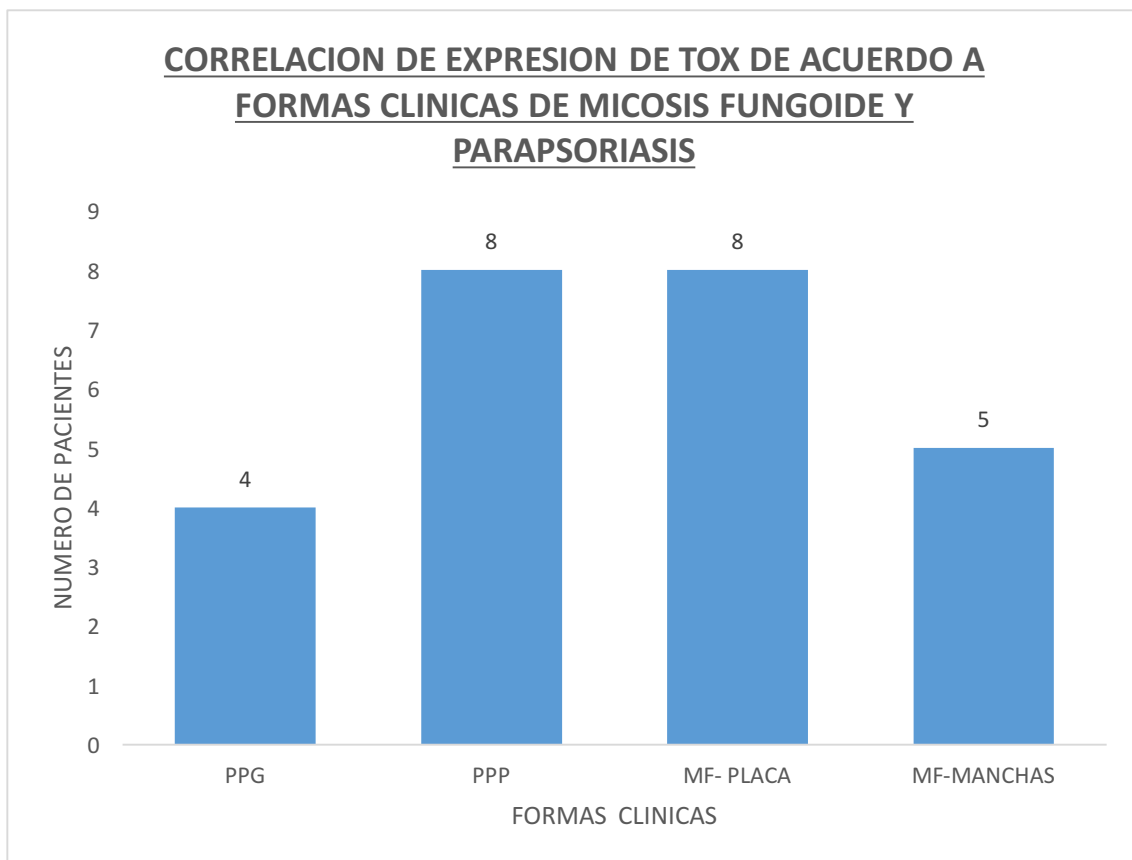
No. 42



Grafica 1. La inmunofluorescencia mostró positividad para 18 muestras de MF y 18 de Parapsoriasis (azul), y 4 negativas respectivamente, así como 2 controles (naranja).

CORRELACION EN LA EXPRESION DE TOX CON LAS VARIETADES CLINICAS DE MICOSIS FUNGOIDE Y PARAPSORIASIS

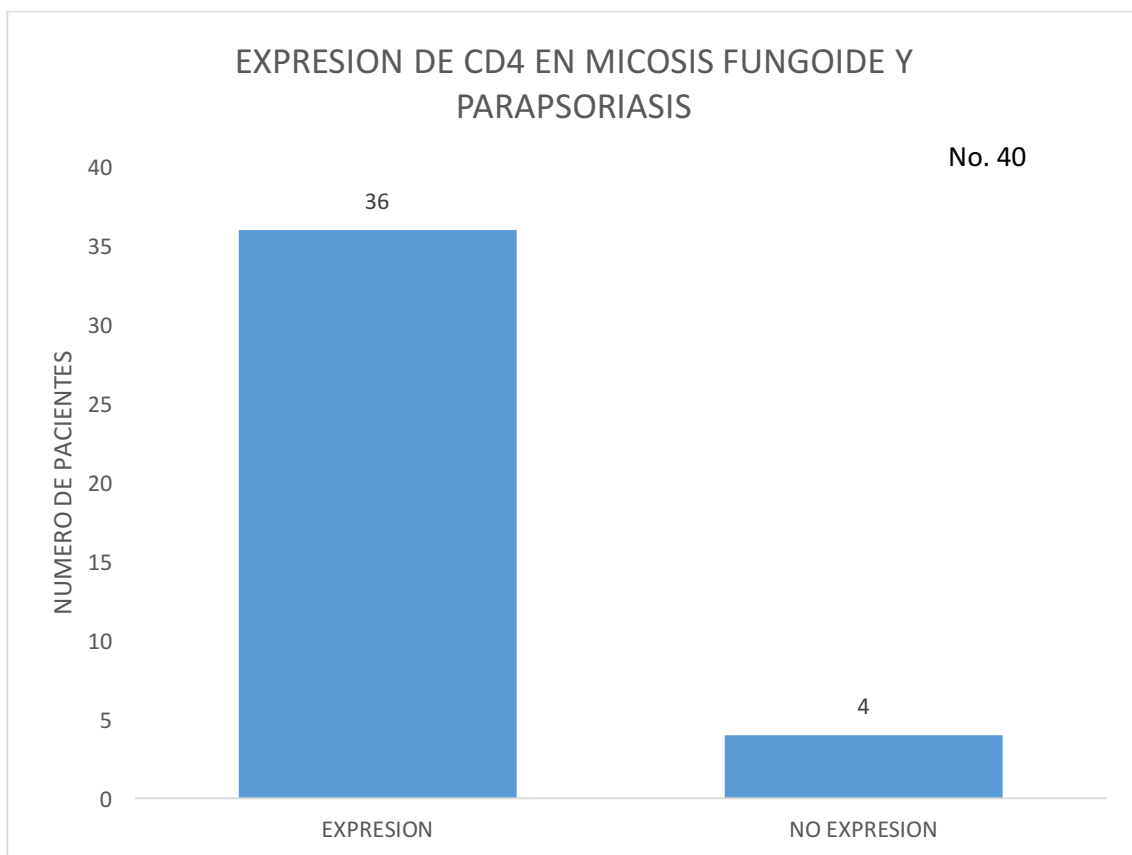
De los 20 pacientes con Micosis fungoide la expresión de TOX se encontró en la forma clínica de placas, mientras que 8 pacientes con diagnóstico de parapsoriasis de pequeñas placas mostraron positividad a este marcador, 4 de PPG expresaron TOX. En el resto de muestras no se especificó la variedad clínica (ver tabla 2)



Grafica 2. Número de pacientes que expresaron TOX de acuerdo a la forma clínica presentada. PPG (Parapsoriasis en grandes placas), PPP (Parapsoriasis en pequeñas placas), MF (Micosis Fungoide)

CORRELACION EN LA EXPRESION DE CD 4 EN MICOSIS FUNGOIDE Y PARAPSORIASIS.

En nuestro trabajo encontramos positividad nuclear de 36 de las 40 muestras estudiadas, esto correlaciona con la expresión de linfocitos T atípicos en epidermis y dermis que marcaron a su vez positivamente con TOX.



Grafica 3. Número total de inmunofluorescencia en bloques de parafina de pacientes con Micosis Fungoide y Parapsoriasis.

DISCUSION

La MF es el tipo más común de Linfomas cutáneos de células T, y la forma más frecuente de linfomas cutáneos primarios. Por otro lado el grupo de las parapsoriasis constituyen enfermedades cutáneas de causa desconocida y de evolución crónica con tendencia a desarrollar procesos linfoproliferativos cutáneos de células T.

Clínicamente las lesiones de Parapsoriasis pueden confundirse con estadios iniciales de Micosis fungoide, retrasando con ello el diagnóstico así como un tratamiento temprano, debido a ello se han realizado múltiples clasificaciones basadas tanto en la presentación clínica, hallazgos de histopatología convencional e Inmunohistoquímica entre otros. Aunque CD2, CD3, CD5 y CD7 están incluidos en los criterios de la ISCL para determinar la MF temprana, la pérdida de CD2, CD3, y / o CD5 en las células T es sólo un 10% sensible. Se ha reportado un pequeño número de marcadores para biopsias cutáneas de MF, incluyendo pérdida de CD13, expresión ectópica del gen BLK, microRNAs (incluyendo miR-155, miR-203 y miR-205), pérdida de BCL7A, el aumento de HIF1 y CD158K / KIR3DL2 en MF avanzada²²⁻²⁵. Sin embargo al momento no existe un marcador que defina la presencia de Micosis fungoide así como la evolución de dicha entidad.

TOX tiene un papel esencial para la transición de linfocitos T CD4 y CD8 durante su fase de maduración en el timo, tras su maduración TOX se inactiva y no se expresa nuevamente en linfocitos T madurados, debido a ello su expresión se ha ligado al inicio de Micosis Fungoide así como su progresión a etapas avanzadas (placas, tumor)¹⁹. McGirt et al, proponen a TOX como un marcador diagnóstico de MF, además de ser positivo en parapsoriasis, lo cual denota un riesgo mayor de desarrollar MF²⁰.

Huang et al., correlacionan la expresión de TOX con evolución tórpida, progresión de la enfermedad y pobre pronóstico¹³.

En nuestro país es la primera vez que se mide la expresión de TOX en biopsias de pacientes con diagnóstico histopatológico de Micosis fungoide y Parapsoriasis, de manera interesante en los 18 pacientes con MF se encontró positividad nuclear de linfocitos en epidermis y dermis, 18 de

pacientes con parapsoriasis mostraron positividad. La técnica de inmunofluorescencia para determinar TOX nos permite observar la positividad nuclear de los linfocitos atípicos en MF, siendo más específica que la Inmunohistoquímica convencional. Por otro lado, reconocemos que es necesario crear una escala de positividad para medir la intensidad de las inmunofluorescencias en nuestro estudio que nos permita cuantificar de forma más precisa la intensidad de la fluorescencia en diversas zonas del corte estudiado.

Por lo tanto, TOX como marcador puede identificar pacientes de bajo riesgo para quienes el manejo conservador sea el adecuado en lugar de ser sometidos a tratamientos con mayores efectos secundarios. Por el contrario, los pacientes con MF con altos niveles de expresión de TOX pueden beneficiarse de un tratamiento temprano y más agresivo para prevenir la progresión de la enfermedad y reducir la mortalidad relacionada con esta entidad.

Por lo tanto, es importante realizar la determinación de TOX ya sea con técnica de Inmunohistoquímica o inmunofluorescencia en todas las biopsias de pacientes con parapsoriasis debido al riesgo elevado de progresión a MF.

Es posible que los casos positivos de Parapsoriasis de nuestro estudio en realidad sean MF en fase inicial, tomando en cuenta esto, el valor diagnóstico de este marcador es importante para el manejo y seguimiento de estos pacientes.

Consideramos que nuestro estudio coloca un precedente para el estudio de estos trastornos linfoproliferativos, tomando en cuenta que se requiere un diagnóstico preciso y seguimiento estrecho de estos

pacientes debido a la evolución tórpida que algunos de ellos pueden presentar.

A pesar de este precedente, es necesario considerar que el diagnóstico MF sigue siendo un reto, por lo que el diagnóstico debe ser por correlación clínico-patológica, tomando en cuenta el perfil de inmunohistoquímica así como el perfil TOX en todos los pacientes que sean diagnosticados como Parapsoriasis o MF.

CONCLUSIONES.

Establecer el diagnóstico precoz de MF tiene importancia en el tratamiento y seguimiento de nuestros pacientes.

TOX puede ser un marcador específico para el diagnóstico de Micosis Fungoide así como de dermatosis que clínicamente se pueden confundir con esta entidad nosológica entre ellas parapsoriasis.

Se debe de realizar un estudio con un mayor número de pacientes y establecer de manera contundente el rol que juega TOX tanto en el sentido diagnóstico como evolutivo.

Es necesario realizar un seguimiento estrecho en los pacientes con PP que mostraron positividad a TOX ante la posibilidad de evolución anómala.

Es de importancia establecer un diagnóstico temprano debido a la mayoría de los pacientes que presentan parapsoriasis en los casos estudiados son niños y un manejo temprano puede marcar diferencia en el pronóstico de estos pacientes.

Consideramos que de ser posible a pacientes recién diagnosticados como Micosis fungoide o parapsoriasis se realice de rutina la determinación de TOX y observar la evolución de dichos pacientes y correlacionaran la expresión de este marcador con la progresión a fases avanzadas de este proceso linfoproliferativo.

Sin duda este trabajo abre un abanico inmenso para proyectos de investigación futuros tanto en Micosis fungoide como en parapsoriasis, además de que este marcador es prometedor para un diagnóstico y seguimiento específico de trastornos proliferativos primariamente cutáneos.

BIBLIOGRAFÍA

1. Dominguez MA, Membrillo G, Ramos A. Parapsoriasis en grandes placas tratada con PUVA. Reporte de un caso. *Rev Cent Dermatol Pascua*. 2004, 13(3): 143-146
2. Wilcox R. CME Information: Cutaneous T-cell lymphoma: 2014 Update on diagnosis, risk-stratification, and management. *Am J Hematol*. 2014, 89(8): 837-851
3. Sil S. Estudio descriptivo de la expresión de HIF1 α 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".
4. Bologna J, Jorizzo J, Rapini R. *Dermatología*. 2ª. Edición. 151-153
5. Torres V, Camacho F, Mihm M, González S, Jurado F, Sanchez I. *Dermatología práctica Ibero-latinoamericana*. 2ª. Edición. 50.1-50.9
6. Jawed S, Myskowski P, Horwitz S, Moskowitz A, Querfeld C. Primary cutaneous T-cell lymphoma (mycosis fungoides and Sézary syndrome). *J Am Acad Dermatol*. 2014; 70(2): 205e4-16.
7. Girardi M, Heald P, Wilson L. The Pathogenesis of Mycosis Fungoides. *N Engl J Med*. 2004; 350: 1978-88.
8. Zhang Y, Wang Y, Yu R, Huang Y, Su M, Martinka M, Dutz J, Zhang X, Zheng Z, Xiao C, Zhou Y. Molecular Markers of Early-Stage Mycosis Fungoides. *Journal of Investigative Dermatology* (2012), Volume 132.
9. O'Flaherty E, Kaye J. TOX defines a conserved subfamily of HMG-box proteins. *BMC Genomics* 2003, 4:13.
10. Morimura S, Ohmatsu H, Kadono T, Sugaya M, Fujita H, Sato S, Suga H, Asano Y, Miyagaki T. TOX expression in different subtypes of cutaneous lymphoma. *Arch Dermatol Res* 2014.
11. Pimpinelli et al. Defining early mycosis fungoides. *Jam Acad Dermatol* 2005, 53 (6) 1053-1063.
12. Sil S. Estudio descriptivo de la expresión de HIF 1a, y FOXP3 en biopsias de pacientes con Micosis Fungoide en estadio temprano y su implicación clínica en el Centro Dermatológico "Dr. Ladislao de la Pascua". 2013

13. Huang Y, Litvinov I, Wang Y, Su M, Jiang X, Kupper T, Dutz J, Sasseville D, Zhou Y. Thymocyte selection-associated high mobility group box gene (TOX) is aberrantly over-expressed in mycosis fungoides and correlates with poor prognosis. *Oncotarget*, 2014; 5(2) 4418-4425.
14. Girardi M, Heald P, Wilson L. The Pathogenesis of Mycosis Fungoides. *N Engl J Med* 2004;350:1978-88.
15. Aliahmad P, Seksenyan A, Kaye J. The many roles of TOX in the immune system. *Curr Opin Immunol*. 2012 ; 24(2): 173–177.
16. McGirt L, Adams C, Baerenwald D, Zwerner J, Eischen C. miR-223 regulates cell growth and targets proto-oncogenes in mycosis fungoides/cutaneous T-cell lymphoma. *J Invest Dermatol*. 2014 ; 134(4): 1101–1107.
17. Glusac E. Criterion by Criterion, Mycosis Fungoides. *The American Journal of Dermatopathology*, 2003 25(3): 264–269.
18. Bernier C, Nguyen J, Quereux G, Renault J, Bureau B, Drbno B. CD13 and TCR Clone: Markers of Early Mycosis Fungoides. *Ada Derm Venereol* 2007; 87: I55-I5.
19. McGirt L, Degesys C, Johnson V, Zic J, Zwerner J, Eischen C. TOX expression and role in CTCL. *JEADV* 2016; 30: 1497-1502
20. Yu X, Luo Y, Liu J, Liu Y, Sun Q. TOX Acts an Oncological Role in Mycosis Fungoides. *PloS ONE*; 10 (3): 1-12.
21. Weiyun Z, Keegan T, Press D, Yang J, Pincus L, Kim Y, Chang E. Outcomes after diagnosis of mycosis fungoides and Sézary Syndrome Before 30 Years of age a population-based study. *JAMA Dermatol* 2014; 150 (7): 709-715.
22. Carbone A, Bernardini L, Valenzano F, Bottillo I, De Simone C, Capizzi R, Capalbo A, Romano F, Novelli A, Dallapiccola B and Amerio P. Array-based comparative genomic hybridization in early-stage mycosis fungoides: recurrent deletion of tumor suppressor genes BCL7A, SMAC/DIABLO, and RHOF. *Genes Chromosomes Cancer*. 2008; 47(12):1067-1075.
23. Litvinov IV, Zhou Y, Kupper TS and Sasseville D. Loss of BCL7A

expression correlates with poor disease prognosis in patients with early-stage cutaneous T-cell lymphoma. *Leuk Lymphoma*. 2013; 54(3):653-654.

24. Litvinov IV, Kupper TS and Sasseville D. The role of AHI1 and CDKN1C in cutaneous T-cell lymphoma progression. *Exp Dermatol*. 2012; 21(12):964-966.

25. Ortonne N, Le Gouvello S, Tabak R, Marie-Cardine A, Setiao J, Berrehar F, Nghe-Tang A, Martin N, Bagot M and Bensussan A. CD158k/KIR3DL2 and NKp46 are frequently expressed in transformed mycosis fungoides. *Exp Dermatol*. 2012; 21(6):461-463.

ANEXOS

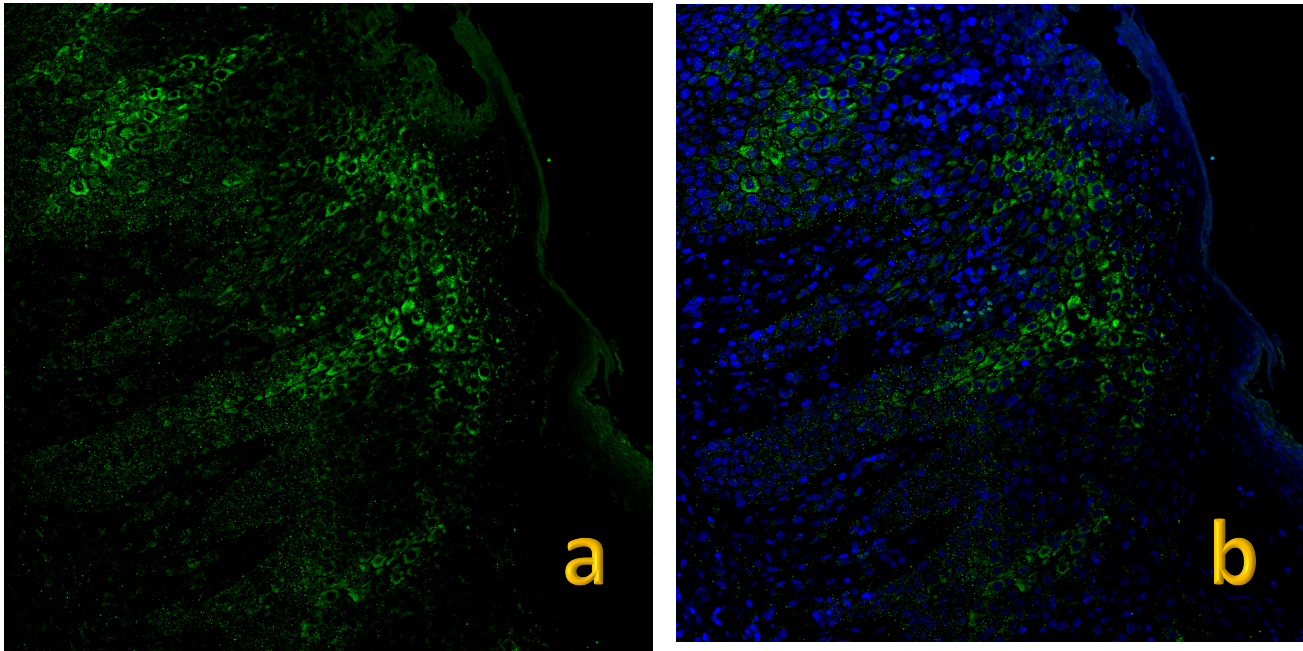
Tabla 1. Bloques analizados de Micosis Fungoide y Parapsoriasis, se muestran los positivos y negativos.

Micosis fungoide	Resultado	Parapsoriasis	Resultado
P-2346-15	+	P-1822-14	+
P-1577-15	+	P-2572-12	+
P-1273-14	+	P-1720-14	+
P-2569-15	+	P-2572-12	+
P-385-14	+	P-2295-14	+
P-919-14	+	P-181-13	+
P-124-13	+	P-2385-13	+
P-2302-12	+	P-1219-14	+
P-1389-14	+	P-1644-12	+
P-2729-14	+	P-61-14	+
P-2898-14	+	P-2247-12	-
P-1552-14	+	P-2209-13	+
P-894-13	-	P-1103-13	-
P-478-14	+	P-1766-14	+
P-2739-14	+	P-639-12	+
P-3003-14	+	P-1315-12	+
P-314-13	+	P-89-12	+
P-1080-13	-	P-1602-13	+
P-289-13	+	P-1979-12	+
P-371-15	+	P-2397-11	+

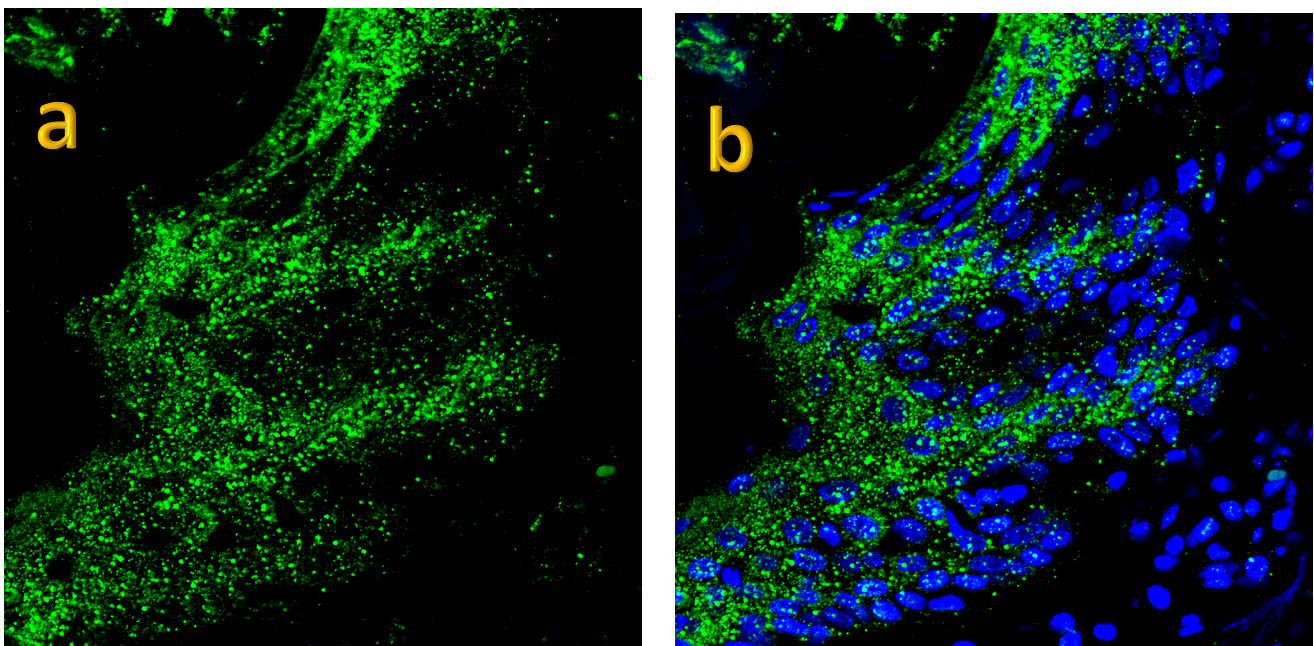
Tabla 2. Aspectos clínicos de Micosis Fungoide y Parapsoriasis

Micosis fungoide	Edad/Sexo	Evolución	Forma Clínica	Para-psoriasis	Edad/Sexo	Evolución	Forma clínica
P-2346-15	33 a	2 años	Placas	P-1822-14	9 a	2 años	PGP
P-1577-15	66 años/H	40 años	Placas	P-2572-12	16 a/M	4 años	PPP
P-1273-14	22 años/M	1 año	Placas	P-1720-14	7 a/M	2 años	PPP
P-2569-15	38 a/M	6 años	Placas	P-2572-12	16 a/M	4 años	PPP
P-385-14	53 a/M	11 años	Placas	P-2295-14	37 a/M	5 meses	PGP
P-919-14	55 a/H	1 año 6 meses	Placas	P-181-13	12a/M	2 años	SD
P-124-13	19 a/H	11 años	Placas	P-2385-13	16 a/M	5 años	SD
P-2302-12	16 a /M	12 años	Manchas	P-1219-14	13 a/M	1 año	PPP
P-1389-14	51 a/M	30 años	Placas	P-1644-12	17 a/H	7 meses	PPP
P-2729-14	33 a/H	2 años	Placas	P-61-14	11 a/H	3 años	PPP
P-2898-14	29 a /M	13 años	Placas	P-2247-12	11 a/M	4 meses	SD
P-1552-14	15 a/H	4 años	Manchas	P-2209-13	24 a /M	2 años	SD
P-894-13	61 a/H	5 años	Placas	P-1103-13	25 a/M	1 año	SD
P-478-14	12 a/H	5 meses	Placas	P-1766-14	51 a/M	5 años	PPP
P-2739-14	62 a/H	1 año	Manchas	P-639-12	9 a/H	2 años	PPP
P-3003-14	27 a/M	1 año 6 meses	Manchas	P-1315-12	28 a/M	3 años	PGP
P-314-13	30 a/M	5 años	Manchas	P-89-12	27 a/M	4 años	SD
P-1080-13	11 a/H	4 años	Placas	P-1602-13	8 a/M	6 meses	SD
P-289-13	11 a/H	11 años	Placas	P-1979-12	17 a /M	7 años	PGP
P-371-15	14 a/H	4 años	Placas	P-2397-11	22 a/H	10 años	SD

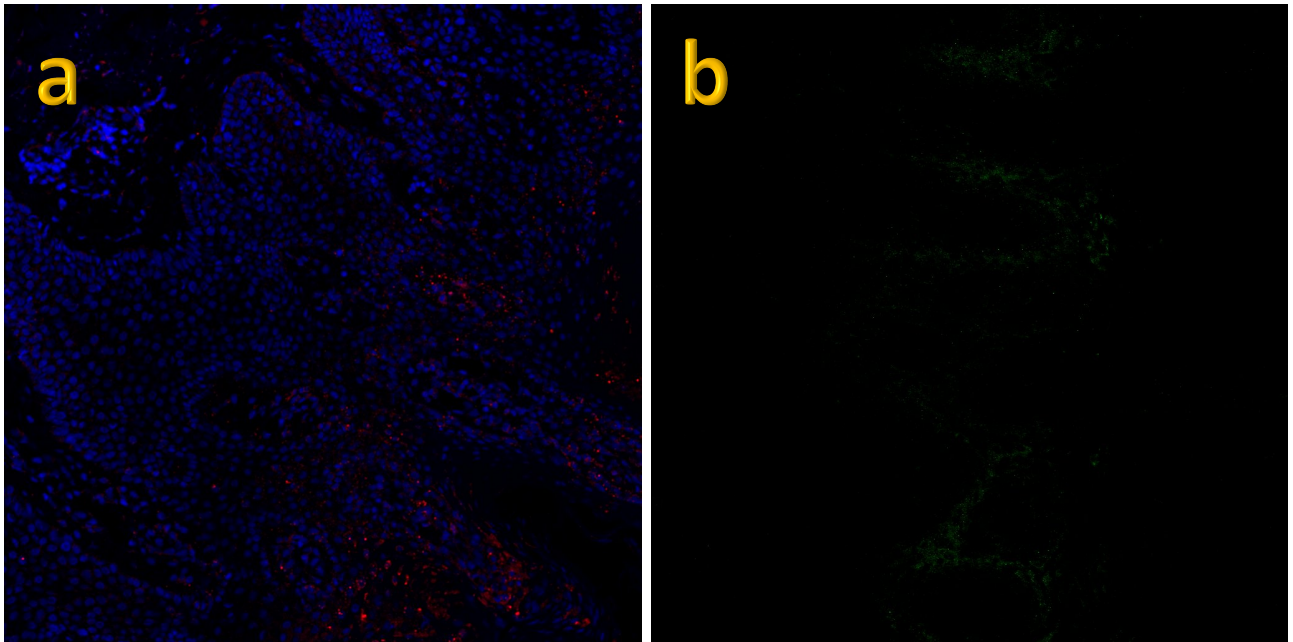
SECCION DE INMUNOFLORESCENCIAS.



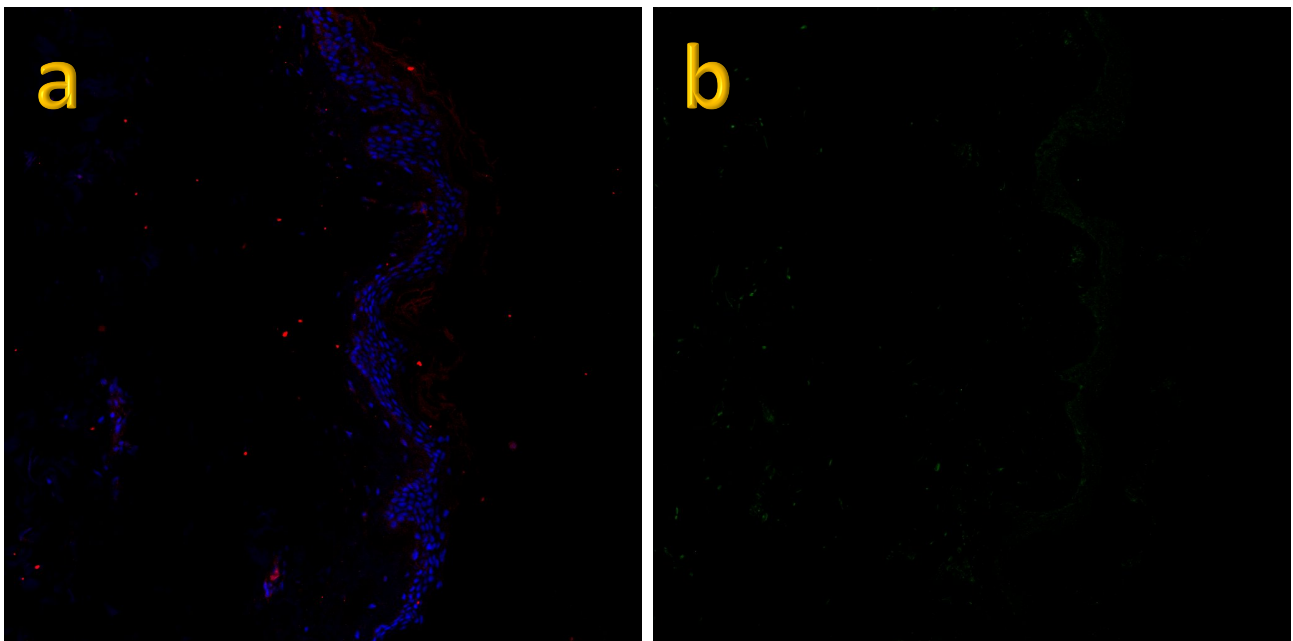
Fotografía 1. A) Tinción TOX (verde) en núcleos en biopsia de paciente con Mucosa Fungoide, B). DAPI (azul), verde (TOX)



Fotografía 2. A) Observe la tinción TOX positiva en paciente con diagnóstico de Parapsoriasis, B) Positividad nuclear de TOX (Zoom)



Fotografía 3. Paciente con Psoriasis, A) DAPI (azul) y CD 4 (Rojo), b. TOX (negativo)



Fotografía 4. Biopsia de piel sana, A y b. No existe expresión de CD 4 y TOX.

AGRADECIMIENTOS

Dra. Gisela Navarrete Franco. Jefa del servicio de Dermatopatología del Centro Dermatológico Pascua.

Dra. Maria Antonieta Dominguez Gómez. Jefa del Servicio de Fototerapia del Centro Dermatológico Pascua

Dr. Gibrán Pérez Montesinos. Jefe de Inmunodermatología del Centro Dermatológico Pascua.

Dra. Laura Bonifaz Alfonzo. Jefa del laboratorio de Inmunología del Centro Médico Nacional Siglo XXI.

QFB. Enrique Murrillo. Laboratorio de Inmunología de Centro Médico Nacional Siglo XXI
Tec. Delia Cañas Ruesga. Histotecnóloga del laboratorio de Dermatopatología del Centro Dermatológico Pascua.

Tec. Jose Alberto Castillo Naranjo. Histotecnólogo del laboratorio de Dermatopatología del Centro Dermatológico Pascua.