

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID

PROGRAMA DE DOCTORADO EN BIOCIENCIAS MOLECULARES



BÚSQUEDA Y CARACTERIZACIÓN DE
NUEVAS ALTERACIONES
MOLECULARES EN LINFOMA DE
CÉLULA T PERIFÉRICO

TESIS DOCTORAL

REBECA MANSO ALONSO

Madrid, 2017

DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA MOLECULAR

FACULTAD DE CIENCIAS

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID

BÚSQUEDA Y CARACTERIZACIÓN DE
NUEVAS ALTERACIONES
MOLECULARES EN LINFOMA DE
CÉLULA T PERIFÉRICO

Memoria presentada por

Rebeca Manso Alonso

Licenciada en Biología,

para optar al grado de Doctor por la Universidad Autónoma de Madrid

Directores de Tesis:

Dr. Miguel Ángel Piris Pinilla

Dra. Socorro María Rodríguez Pinilla

Instituto de Investigación Sanitaria-Fundación Jiménez Díaz

Área de Cáncer, Departamento de Anatomía Patológica

Esta Tesis Doctoral, ha sido realizada en el Área de Cáncer, Departamento de Anatomía Patológica del IIS-Fundación Jiménez Díaz, y dirigida por los doctores Miguel Ángel Piris Pinilla y Socorro María Rodríguez Pinilla.

Los estudios de esta Tesis Doctoral han sido posibles gracias al apoyo de la Asociación Española Contra el Cáncer (AECC) en el proyecto “Neoplasias hematológicas: terapia apoyada en el diagnóstico molecular”.

AGRADECIMIENTOS

Durante todos estos años he pensado mucho sobre este apartado y siempre creí que sería la parte más fácil de escribir de toda la Tesis, sin embargo es la más complicada. Me siento frente al ordenador, delante de una hoja en blanco y no sé por dónde empezar. Parece mentira que hayan pasado tantos años desde que crucé por primera vez la puerta de Anatomía Patológica y decidí embarcarme en esta “apasionante y loca” aventura llamada TESIS. Ha sido un camino largo y muy duro, pero cuando miro hacia atrás me doy cuenta de que nunca he estado sola. Siempre ha habido alguien a mi lado celebrando conmigo los buenos momentos y apoyándome en los malos. Han sido muchas las personas que han formado parte de mi vida durante estos años y a las que estoy profundamente agradecida porque sin ellas, esta Tesis no hubiese existido. Este es el motivo por el que me cuesta tanto escribir este apartado; porque es muy difícil recopilar en unas cuantas hojas los nombres de todas esas personas, y porque es cuanto menos imposible, intentar resumir en unos pocos folios lo infinitamente agradecida que os estoy. No sé si al final conseguiré expresar todo lo que siento y quiero transmitir, pero de lo que sí estoy segura es que repetiré la palabra GRACIAS hasta la saciedad, ya que al pensar en todos vosotros es la única que me surge.

En primer lugar quiero darle las gracias a mi directora, la Dra. Rodríguez Pinilla por brindarme la oportunidad de realizar la Tesis. Por creer que una chica ilusionada pero sin apenas currículum ni experiencia era una apuesta de futuro. Gracias María por valorar mi trabajo, por la libertad de maniobra que siempre me has dado, por tus sabios consejos y por darme la oportunidad de conocer de cerca el mundo de los linfomas. Muchas gracias por tu confianza, apoyo, paciencia y ánimo cuando más lo he necesitado. Gracias también al Dr. Piris, mi otro director de Tesis, por tu apoyo y confianza depositados en mi. Gracias Miguel Ángel por tu implicación y la ayuda que siempre me has brindado, por preocuparte por mí y por tu atención e interés.

A la Fundación Conchita Rábago, gracias por la ayuda que ofrecéis a los becarios para poder llevar a cabo estos trabajos.

También quiero darle las gracias a todas y cada una de las personas que forman parte del laboratorio de Patología Molecular y a los que pasaron por aquí y ya no están, por hacer del labo no sólo un agradable lugar de trabajo, sino también un acogedor hogar. Muchas gracias por compartir conmigo todos los buenos momentos y especialmente, por ayudarme a superar los malos. Os debo mucho a todos, porque sin

vosotros esto hubiese sido muy diferente. Gracias Paula, por tu amabilidad (aunque digas que eres borde), por esa fuerza y ganas de aprender, y por ser una “seta” más ofreciéndome tu amistad, apoyo y ayuda siempre. Gracias Raúl por tu autenticidad, por haber hecho un gran equipo conmigo y por tu amistad. Gracias Cris, por enseñarme los trucos de las PCRs, por tu sonriente y positiva manera de ser, y por ser mi mami del labo. Gracias Ester (sin h), por tus consejos y apoyo, sabes que negaré haber dicho esto. Gracias Sandra, por tu absoluta dedicación. Gracias Pedro, por estar siempre dispuesto a ayudar, por tus visitas sorpresa y tu amistad. Gracias Ion, por todo el trabajo juntos durante estos años y por tu amistad. Gracias a Olga, por tu apoyo en todo momento, ayuda y amistad. Gracias también a Lina y Carlos, nuestros patólogos moleculares. Y a Blanca, Irene y Raquel, por vuestra alegría. Gracias a Fredi y Juan por vuestra profesionalidad y precisión, por darme todo lo que siempre he necesitado sin pegas y por aguantarme con una paciencia infinita. Y gracias a mis chic@s de diagnóstico molecular, que sois un ejemplo de profesionalidad: Nuria (mi primera maestra en esto del diagnóstico allá por el año...), Laura, Nerea, Virginia, Jeni, Linah, Almu e Iván.

Gracias también a todo el personal de Anatomía Patológica, que ha hecho más fácil y agradable el trabajo durante estos años.

Quería darle las gracias también a May, por tu interés y la atención que me has prestado, por estar siempre dispuesta a ayudarme sin importar el momento ni el tiempo. Gracias a Julia y Sagrario, por acogerme como una más en vuestro laboratorio y ayudarme en todo momento. A las chicas del IDIVAL, a Nerea, por estar siempre dispuesta a echar una mano en lo que haga falta; y a Laura (ahora chica FJD), por tu paciencia con mis “bombardeos” de e-mails, eres única buscando datos.

No puedo olvidarme de mis compañeros del IIB con los que comencé mi vida científica. Gracias al Dr. Leandro Sastre y la Dra. Margarita Fernández, por su rigurosidad científica y por enseñarme a hacer ciencia. Y a la gente del 2.13 por el buen rollo que siempre había en el labo.

El camino para llegar aquí pasó por una carrera con muchas horas de clase y prácticas compartidas entre todos. Gracias a mis “perrus bioloc@s”, por tantas y tantas risas y por todos los buenos momentos que hemos vivido juntos.

Gracias también a todos mis amigos de siempre, por estar ahí después de tantos años. En especial a Noelia, mi “eterna compañera”. Mi compañera de colegio, de carrera, de Facultad, clases prácticas, fiestas... Muchas gracias por estar ahí siempre, compartiendo y disfrutando de los buenos momentos y apoyándome en los malos.

Gracias a mi familia, porque aunque nunca habéis llegado a entender que hacía, siempre habéis valorado mi trabajo y os habéis preocupado por mí. A Esther, que más que una prima es una hermana. Gracias por estar siempre dispuesta a ayudarme en lo que sea, sin importar el motivo, el momento o el tiempo. A mi tita Andrea, mi segunda madre, por ayudar a criarme y darme la educación que tengo. Seguro que parte del esfuerzo que he puesto en esta Tesis me lo enseñaste tú. Gracias por el infinito amor que me tienes, por sentirte orgullosa de mí y por no enfadarte cuando te digo “¡sólo uno!”. Os quiero muchísimo.

Gracias de todo corazón a mi hermana y mis padres, los pilares de mi vida. Gracias por vuestro inmenso cariño, por creer en mí, y hacerme sentir que soy alguien importante. María, que a pesar de ser más joven que yo siempre has sido para mí un ejemplo de honradez, madurez e inteligencia. Gracias por estar siempre ahí, especialmente en los malos momentos. Por tu cariño, ayuda y apoyo incondicional. Simplemente no sé qué haría sin ti, eres una edición limitada, te quiero con locura. Papi, Mami, gracias por la educación que me habéis dado, de la que estoy muy orgullosa, pero sobre todo por enseñarme a vivir con honestidad y sinceridad. Gracias por apoyarme incondicionalmente en todo momento y no dejarme abandonar nunca, enseñándome a plantarle cara a la adversidad y a ser valiente. Gracias por apreciar tanto mi trabajo y sentiros tan orgullosos de mí. Si hay alguien que se merezca esta Tesis, esos sois vosotros, porque todo lo que soy y lo que tengo os lo debo a vosotros, GRACIAS de corazón. Os quiero infinito.

Y por último, me gustaría dar las gracias a los pacientes y sus familiares. La lucha contra la enfermedad es la motivación de nuestro trabajo.

AGRADECIMIENTOS

“En la vida ni se gana ni se pierde, ni se fracasa ni se triunfa. En la vida se aprende, se crece, se descubre, se escribe, borra y reescribe, se hila, se deshila y se vuelve a hilar”

Ana Cecilia Blum

RESUMEN

Los linfomas de célula T periféricos (LTP) son enfermedades agresivas, donde los tratamientos actualmente disponibles solo consiguen supervivencia del 30% de pacientes a los 5 años del diagnóstico, con terapia fundamentalmente basada en citotóxicos. En esta tesis presento los resultados de una serie de estudios de expresión génica y mutacionales que han llevado a la identificación de diferentes perfiles moleculares y genes mutados que permiten avanzar en la subclasificación de los LTP y en la identificación de biomarcadores que podrían ser objeto de terapias dirigidas.

Para el análisis de expresión se utilizaron una serie de muestras congeladas de LTP y tejidos linfoides reactivos, y la tecnología de micromatrices de expresión génica. Los resultados obtenidos fueron validados mediante estudio inmunohistoquímico en una serie independiente. Por otro lado, para el análisis mutacional se utilizaron las tecnologías de qPCR por discriminación alélica y secuenciación masiva -*Next Generation Sequencing* (NGS). En ambos trabajos, los datos se correlacionaron con variables clínicas para determinar su aplicabilidad pronóstica.

El primer trabajo permite identificar vías de señalización sobre-expresadas en LTP, así la expresión inmunohistoquímica de p-ERK, C-MYC y Ki-67 permite identificar subgrupos de pacientes con supervivencia inferior. Adicionalmente, se ha observado que la expresión de p-ERK y GATA3 permite reconocer pacientes diagnosticados de Linfoma T angioinmunoblástico (LTAI) y linfoma T periférico no especificado (LTPNE), respectivamente, con un peor pronóstico. El segundo trabajo, permite identificar diversas mutaciones en genes implicados en la patogénesis de los LTP. La mutación RHOA-G17V se relaciona con la expresión de p-ERK, p52 y marcadores de fenotipo T_{FH}. Por otro lado, la presencia de dicha mutación y en reguladores epigenéticos no ayuda a distinguir de forma clara los LTAI de otros linfomas con fenotipo T_{FH}. Por otro lado, la mutación PLCG1-S345F se relaciona con la expresión de CD30, p50 y GATA3, y confiere peor pronóstico a pacientes con LTPNE. Además, pacientes con mutaciones en genes de la vía de JAK/STAT muestran un curso clínico agresivo.

Los análisis de expresión y mutacionales permiten identificar firmas y genes mutados que ayudan a entender la biología de los LTP, revisar su clasificación y proponer dianas terapéuticas.

SUMMARY

Peripheral T cell lymphomas (PTCLs) are aggressive diseases. The currently available treatments, which are fundamentally cytotoxic, only achieve 5-year survival following diagnosis in 30% of patients. In this thesis, I present the results of a series of gene expression and mutational studies that have led to the identification of different molecular profiles and mutated genes, enabling advances in the subclassification of PTCLs, and of biomarkers that could be targets of directed therapies.

For the expression analysis, a series of frozen samples of PTCLs and reactive lymphoid tissues were used, in conjunction with gene-expression microarray technology. The results obtained were validated by an immunohistochemical study in an independent series. qPCR technologies for allelic discrimination and massive sequencing –Next-Generation Sequencing (NGS)– were used for the mutational analysis. In both components of the work, correlations of the data with clinical variables were sought to determine their prognostic applicability.

The first component of the work enabled the identification of overexpressed signalling pathways in PTCL. In this way, the immunohistochemical expression of p-ERK, C-MYC and Ki-67 allowed subgroups with poorer survival to be distinguished. Additionally, it was observed that the expression of p-ERK and GATA3 allows the recognition of patients diagnosed with angioimmunoblastic T-cell lymphoma (AITL) and peripheral T-cell lymphoma not otherwise specified (PTCL NOS), respectively, who have poorer outcomes. The second component of the work allowed various mutations in genes involved in the pathogenesis of PTCL to be identified. The RHOA-G17V mutation is associated with the expression of p-ERK, p52 and markers of the T_{FH} phenotype. On the other hand, the presence of this mutation and epigenetic regulators does not help distinguish AITL clearly from other types of lymphoma with a T_{FH} phenotype. The PLCG1-S345F mutation is associated with the expression of CD30, p50 and GATA3, which confer a poorer prognosis on patients with PTCL NOS. Furthermore, patients with mutations in genes of the JAK/STAT pathway exhibit an aggressive clinical course.

The analysis of expression and of mutations facilitates the identification of gene signatures and mutations that help us to better understand the biology of PTCLs, to revise their classification and to propose therapeutic targets.

ÍNDICE

ABREVIATURAS	1
INTRODUCCIÓN.....	9
1.1. Linfomas	11
1.1.1. Características generales	11
1.1.2. Epidemiología	11
1.1.3. Linfoma de célula T periférico.....	11
1.1.3.1. Características generales	11
1.1.3.2. Características moleculares	12
1.1.3.3. Factores pronóstico, supervivencia y tratamiento	18
1.2. Vías de señalización implicadas en LTP.....	19
1.2.1. Vía de señalización de TCR.....	19
1.2.1.1. Vía de señalización de las MAPK.....	20
1.2.1.2. Vía de señalización de Calcineurina.....	21
1.2.1.1. Vía de señalización de las RHO GTPasas	22
1.2.2. Vía de señalización de NF- κ B	23
1.2.3. Vía de señalización de JAK/STAT	24
1.2.4. Reguladores epigenéticos.....	25
1.2.4.1. TET2.....	25
1.2.4.2. DNMT3A	26
1.2.4.3. IDH2	26
OBJETIVOS.....	29
MATERIAL Y MÉTODOS	33
3.1. Muestras de pacientes	35
3.2. Inmunohistoquímica.....	35
3.2.1. Construcción de micromatrices de tejidos (TMAs).....	35
3.2.2. Tinciones inmunohistoquímicas	35
3.2.2.1. Doble inmunohistoquímica	36
3.2.3. Análisis y cuantificación.....	37
3.3. Extracción de ARN	38
3.4. Extracción de ADN genómico (ADNg).....	39
3.5. Micromatrices de expresión génica.....	40
3.5.1. Síntesis de ADNc desde ARN total.....	40

3.5.2. Síntesis de ARNc fluorescente: transcripción in vitro e incorporación de fluorocromo	41
3.5.3. Hibridación	41
3.5.4. Análisis de datos	42
3.5.4.1. Análisis de enriquecimiento en grupos de genes (Gene Set Enrichment Analysis (GSEA))	42
3.6. Detección de mutaciones en <i>KRAS</i> y <i>NRAS</i>	43
3.6.1. Detección de mutaciones en <i>KRAS</i> mediante PCR en tiempo real (RT-PCR) ..	43
3.6.2. Detección de mutaciones en <i>KRAS</i> y <i>NRAS</i> mediante RT-PCR y pirosecuenciación	43
3.6.3. Detección de mutaciones en <i>KRAS</i> y <i>NRAS</i> mediante RT-PCR y pirosecuenciación con el ensayo RAS Extension Pyro	44
3.7. Detección de mutaciones en los genes <i>RHOA</i> y <i>PLCG1</i> por PCR cuantitativa (qPCR)	44
3.7.1. Detección de las mutaciones por discriminación alélica mediante qPCR	44
3.7.2. Detección de la mutación S345F en el gen <i>PLCG1</i> por PCR a tiempo real combinado con LNA (locked-nucleic-acid)	45
3.7.3. Detección de las mutaciones por secuenciación de Sanger	46
3.8. Secuenciación de última generación (NGS) mediante Ion Torrent	46
3.8.1. Diseño del panel de genes a estudiar	46
3.8.2. Cualificación y cuantificación del ADNg mediante RT-PCR	47
3.8.3. Construcción de librerías de ADN	48
3.8.3.1. Cuantificación de las librerías por qPCR	49
3.8.4. PCR en emulsión (ePCR) y enriquecimiento	49
3.8.5. Secuenciación	50
3.8.6. Análisis de datos	50
3.8.7. Validación de las mutaciones	51
3.9. Análisis estadístico	51
RESULTADOS I	53
4.1. Firma molecular de expresión génica en LTP	55
4.2. Expresión de p-ERK, Ki-67 y C-MYC en LTP	60
4.3. Relación entre la expresión de p-ERK, Ki-67 y C-MYC y la supervivencia de los pacientes con LTP	65

4.4. Análisis de supervivencia en pacientes con LTP tratados con esquema terapéutico CHOP o CHOP-like	69
4.5. La expresión de C-MYC se relaciona con GATA3 y confiere peor pronóstico a pacientes con LTP	73
RESULTADOS II	79
5.1. Mutación G17V en el gen <i>RHOA</i>	81
5.1.1. Frecuencia mutacional.....	81
5.1.2. Significado clínico y pronóstico	83
5.1.3. Correlación entre la presencia de mutación y la expresión de marcadores subrogados de vías de señalización implicadas en LTP	86
5.1.4. El papel del tratamiento en la mutación G17V en el gen <i>RHOA</i>	87
5.1.4.1. Significado pronóstico de la mutación <i>RHOA</i> -G17V y la expresión de p-ERK.....	89
5.2. Mutación S345F en el gen <i>PLCG1</i>	92
5.2.1. Frecuencia mutacional.....	92
5.2.2. Significado clínico y pronóstico	92
5.2.3. Correlación entre la presencia de mutación <i>PLCG1</i> -S345F y la expresión de marcadores subrogados de vías de señalización implicadas en LTP	95
5.3. Estudio de secuenciación de última generación (NGS)	97
DISCUSIÓN.....	119
6.1. Identificación de una firma molecular de expresión génica revelando rutas de señalización importantes en la patogenia de los LTP	121
6.1.1. Firma molecular de expresión génica.....	121
6.1.2. Relevancia clínica y biológica de la expresión de p-ERK	122
6.1.3. Relevancia clínica y biológica de la expresión de C-MYC y Ki-67	123
6.1.4. Relevancia clínica y biológica de la expresión de GATA3.....	123
6.2. Identificación de mutaciones en genes de vías de señalización implicadas en la patogenia de los LTP.....	124
6.2.1. Mutación G17V en el gen <i>RHOA</i>	124
6.2.1.1. Frecuencia mutacional.....	124
6.2.1.2. Relevancia clínica y biológica de la mutación <i>RHOA</i> -G17V.....	125
6.2.2. Mutaciones en el gen <i>PLCG1</i>	126
6.2.2.1. Frecuencia mutacional.....	126
6.2.2.2. Relevancia clínica y biológica de las mutaciones en <i>PLCG1</i>	127
6.2.3. Otras mutaciones frecuentes en LTP	128

6.2.3.1. Reguladores epigenéticos	128
6.2.3.2. Vía de señalización de NF- κ B	130
6.2.3.3. Vías de señalización de PI3K y ciclo celular	130
6.2.3.4. Vía de señalización de JAK/STAT	131
6.2.3.5. Vías de señalización de TCR y MAPK	132
6.3. Observaciones finales y perspectivas	133
CONCLUSIONES	135
BIBLIOGRAFÍA	139
ANEXOS	181
ANEXO I	183
ANEXO II	185

ABREVIATURAS

AKT	Serina/Treonina quinasa 1
ALK	Quinasa de linfoma anaplásico
AP	Inmunofosfatasa
ATL	Leucemia/Linfoma T del adulto
BAM	Mapa de alineación binaria
BANK1	Proteína scaffold de células B con repeticiones de ankirina
BCL10	Proteína 10 de Linfomas de célula B
BCL6	Proteína 6 de Linfomas de célula B
BCOR	Corepresor BCL6
BCR	Receptor de células B
BLIMP-1	Proteína de maduración 1 inducida por linfocitos B
BRAF	Proto-oncogen, Serina/treonina quinasa
$[Ca^{2+}]_i$	Concentración intercelular de calcio
Ca^{2+}	Calcio
CARD11	Miembro 11 de la familia de dominios de reclutamiento de caspasas
CCR4	Receptor de quemoquinas tipo 4
CCR5	Receptor de quemoquinas tipo 5
CD10	Metaloenzimas de membrana
CD2	Cluster de diferenciación 2
CD23	Cluster de diferenciación 23
CD28	Glicoproteína de superficie celular de células T
CD3	Cluster de diferenciación 3
CD30	Miembro 8 de la superfamilia de receptores TNF
CD36	Receptor de colágeno tipo 1
CD4	Cluster de diferenciación 4
CD40	Miembro 5 de la superfamilia de receptores TNF
CD43	Cluster de diferenciación 43
CD5	Cluster de diferenciación 5
CD52	Cluster de diferenciación 52
CD7	Cluster de diferenciación 7
CD79A	Proteína asociada a inmunoglobulina de membrana
CD8	Cluster de diferenciación 8
CDC25	Cadena alfa del receptor de Interleuquina 2

CDC42	Ciclo de división celular 42, proteína de unión a GTP
CDK5	Quinasa 5 dependiente de ciclina
CHOP	Ciclofosfamida, doxorubicina, vincristina y prednisona
CHOP-like	CHOP + antraciclina
CNIO	Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas
COT	Oncogen tiroideo de cáncer de Osaka
CREB	Proteína de unión al elemento respuesta de AMPc
c-REL	Subunidad de NF- κ B
CSF2RB	Receptor beta del factor estimulador de colonias
Ct	Valor del umbral del ciclo
CXCL13	Ligando 13 de chemoquinas
CXCR4	Receptor 4 de chemoquinas
CYLD	Cilindromatosis
DAB	Diaminobencidina
DAG	Diacilglicerol
DNMT3A	ADN metiltransferasa 3A
EATL	Linfoma de célula T asociado a enteropatía tipo 2
EBV	Virus de Epstein-Barr
ECM	Matriz extracelular
ECOG	Grupo Cooperativo de Oncología del Este
ePCR	PCR en emulsión
ERK	Quinasa regulada por señales extracelulares
EZH2	Potenciador de zeste homólogo 2
FAS	Receptor de muerte de superficie celular
FDR	Tasa de descubrimiento falso
FFIP	Fijado en formol e incluido en parafina
FJD	Fundación Jiménez Díaz
FYN	Proto-oncogen tirosina quinasa de la familia Src
GAP	Proteína activadora
GATA3	Factor de transcripción específico de células T trans-activadas
GDI	Factor inhibidor de nucleótidos de guanina
GEF	Factor intercambiador de nucleótidos de guanina
GLI3	Oncogen asociado a glioma de la familia de dedos de zinc 3

GRB-2	Proteína 2 unida al factor de crecimiento
GSEA	Análisis de enriquecimiento de grupo de genes
GSK3	Glucógeno sintasa quinasa 3
HHV6B	Virus del herpes humano 6B
HRP	Peroxidasa de rábano
HTLV1	Virus linfotrópico humano tipo 1
HUMV	Hospital Universitario Marqués de Valdecilla
ICOS	Coestimulador inducible de células T
IDH2	Isocitrato dehidrogenasa 2
IGF1	Factor de crecimiento insulínico tipo 1
IGV	Integrated Genome Viewer
IHQ	Inmunohistoquímica
IL6ST	Transductor de señal de la interleuquina 6
IP3	Inositol 1,4,5-trifosfato
IPI	Índice pronóstico internacional
IPTCLP	Puntuación proyecto internacional de Linfoma de célula T Periférico
IRF3	Factor 3 regulador de interferón
ITGAM	Subunidad alfa M de integrinas
ITK	Quinasa de célula T inducida por Interleuquina 2
Ikk	Inhibidor de NF-κB
Ki-67	Antigen identificado por el anticuerpo Ki-67
KRAS	Kristen RAS
LACG	Linfoma anaplásico de células grandes
LAT	Vinculador para la activación de las células T
LCCT	Linfoma cutáneo de célula T
LCK	Proteína tirosina quinasa específica de leucocitos
LDH	Lactato deshidrogenasa
LH	Linfoma de Hodgkin
LMA	Leucemia mielode aguda
LNA	Ácido nucléico bloqueado
LNH	Linfoma no-Hodgkin
LPL	Lipoproteína lipasa
LTAI	Linfoma de célula T Angioinmunoblástico

LTAI-like	LTPNE con características de LTAI
LTP	Linfoma de célula T Periférico
LTPNE	Linfoma de célula T Periférico, no especificado
MAF	Menor frecuencia alélica
MALT1	Proteasa de tejido linfoide asociado a mucosa
MAP3K14	
(NIK)	Proteínas 3 quinasas activadas por mitógenos 14
MAP3K5	Proteínas 3 quinasas activadas por mitógenos 5
MAPK14	Proteínas quinasas activadas por mitógenos 14
MET	Receptor tirosina quinasa
MGAC	Acetato de magnesio
MgCl₂	Cloruro de magnesio
MMLV-RT	Transcriptasa inversa del virus de la leucemia murina de Moloney
mPIT	Índice pronóstico para linfoma de célula T modificado
mTOR	Diana de Rapamicina
MYC	Oncogen de mielocitomatosis
MYD88	Proteína 88 de respuesta primaria de diferenciación mieloide
NFAT	Factor nuclear de activación de células T
NF-κB	Factor nuclear kappa B
NGS	Secuenciación de última generación (next-generation sequencing)
NK	Natural killer
NLRP2	NLR Family Pyrin Domain Containing 2
NOTCH	Proteína Notch asociada a translocación
NPM	Nucleoplasmina
NPM-ALK	Nucleoplasmina-quinasa de linfoma anaplástico
NRAS	Neuroblastoma RAS
nt	Nucleótido
NTP	Nucleósido trifosfato
OMS	Organización Mundial de la Salud
PAK7	Quinasa 7 activadora de p21
PASK	Serina/Treonina quinasa con dominio PAS
PDCD1/PD-1	Proteína programadora de muerte celular 1
PEG	Polietilenglicol

p-ERK	ERK fosforilada
PIK3C2B	Fosfoinositol-4-fosfatasa 3-quinasa, subunidad catalítica tipo 2 Beta
PIK3CA	Subunidad catalítica alfa de la 3 quinasa fosfatidilinositol-4,5-bifosfato
PIK3R1	Subunidad 1 reguladora de PI3K
PIP2	Fosfatidilinositol-4,5-bifosfato
PIT	Índice pronóstico para linfoma de célula T
PLC	Fosfolipasa C
PLCG1	Fosfolipasa C gamma 1
pM	Picomolar
PTEN	Fosfatidilinositol-3,4,5-trisfosfato 3-fosfatasa
PTK	Proteína tirosina quinasa
qPCR	PCR cuantitativa
RAC	Sustrato de Toxina Botulínica C3 Relacionado con Ras 1
RAF	Proto-oncogen RAF1, serina/treonina quinasa
RAS	Proto-oncogen, GTPasa
RASA1	Proteína activadora 1 de RAS
RB1	Corepresor transcripcional RB1, retinoblastoma
RC3H1	Anillo y dominio tipo CCCH
RELA	Subunidad de NF-κB
RELB	Subunidad de NF-κB
RHO	Rhodopsin
RHOA	Miembro A de la familia homóloga de RAS
ROCK	Proteína quinasa 1 con coiled-coil asociada a RHO
RT-PCR	PCR en tiempo real
SH2	Dominio 2 homólogo a SRC
SHM	Hipermutación somática
SNF5	Regulador de cromatina
SNV	Variante nucleotídica única
SOCS5	Supresor 5 de señalización de citoquinas
SOS	Factor intercambiador de nucleótidos RAS/RAC
SPI1	Factor de transcripción hematopoyético PU.1
SPSS	Paquete estadístico para la Sociedad Científica
SRC	Proto-oncogen tirosina quinasa

STAT	Transductor de señal y activador de la transcripción
SYK	Tirosina quinasa de bazo
T-ALL	Linfoma/Leucemia linfoblástica aguda de células T
TBK	Quinasa activadora de NF-κB
TBX21	Factor de transcripción T-box
TCR	Receptor de linfocitos T
TET2	Ten-Eleven translocation 2
T_{FH}	Célula T colaboradora folicular
Th	Linfocito T colaborador
TIA-1	Antígeno intracelular restringido a célula T
TLR	Receptor similar a Toll
TMA	Micromatriz de tejido (tissue microarray)
TNFAIP3	Proteína 3 inducida por TNF alfa
TNFR2	Receptor 2 de TNF
TNFRSF21	Miembro 21 de la superfamilia de receptores TNF
TP53	Supresor tumoral p53
TRAF	Factor asociado a TNF
TYK2	Tirosina quinasa 2
VAV	Factor intercambiador de nucleótidos
VEGF	Factor de crecimiento endotelial vascular
XPB1	Proteína de unión X-box
ZAP-70	Proteína quinasa 70, asociada a la cadena Zeta de TCR

CÓDIGOS DE UNA Y TRES LETRAS PARA LOS AMINOÁCIDOS

Alanina	Ala, A	Leucina	Leu, L
Arginina	Arg, R	Lisina	Lys, K
Ácido aspártico	Asp, D	Metionina	Met, M
Asparagina	Asn, N	Fenilalanina	Phe, F
Cisteína	Cys, C	Prolina	Pro, P
Ácido glutámico	Glu, E	Serina	Ser, S
Glicina	Gly, G	Tirosina	Tyr, Y
Glutamina	Gln, Q	Treonina	Thr, T
Histidina	His, H	Triptófano	Trp, W
Isoleucina	Ile, I	Valina	Val, V
Terminación	Ter, *		

INTRODUCCIÓN

1.1. Linfomas

1.1.1. Características generales

Los Linfomas constituyen un grupo heterogéneo de enfermedades neoplásicas derivados de células T, B o NK en diferentes etapas de su diferenciación. Las características clínicas y patológicas de las diferentes categorías de las neoplasias linfoides son recogidas en la clasificación de los tejidos hematopoyéticos y linfoides de la Organización Mundial de la Salud (OMS) ¹, que categoriza los subtipos teniendo en cuenta la morfología de las células, el inmunofenotipo y las características clínicas y genéticas.

La clasificación de la OMS clasifica los linfomas en dos categorías principales: linfoma de Hodgkin (LH, el primer tipo de linfoma descrito por Thomas Hodgkin en 1832) y linfoma no-Hodgkin (LNH). El primer tipo representa alrededor del 13% de los linfomas y su característica principal es la presencia de células multinucleadas Reed-Stemberg en un contexto polimorfo. Por su parte, el LNH engloba el 87% restante de las neoplasias linfoides. Sólo una pequeña fracción de LNH deriva de las células T y NK, mientras que el resto deriva de células B.

1.1.2. Epidemiología

Los datos epidemiológicos de los linfomas pueden ser diferentes dependiendo del tipo específico de linfoma, la edad y la región geográfica del grupo de estudio ¹. Así, dentro de los LNH, en países occidentales, los linfomas de células T constituyen el 5-10% del total del conjunto de los linfomas y el 15-20% de los de mal pronóstico ².

En esta sección se describe el tipo de linfoma relevante para el trabajo de esta Tesis Doctoral, linfoma de célula T periférico.

1.1.3. Linfoma de célula T periférico

1.1.3.1 Características generales

Los linfomas de célula T periféricos (LTP) comprenden una variedad de desórdenes neoplásicos derivados de linfocitos T maduros post-tímicos. Los linfomas derivados de las células NK están también englobados en esta categoría. La mayoría de

los linfomas T clasificados como LTP, surgen a partir de linfocitos maduros en el tejido linfoide periférico (ganglios linfáticos, bazo y tejidos linfoides asociados a mucosas).

La clasificación actual de la OMS de las neoplasias de células T maduras y células NK tiene en cuenta principalmente la presentación clínica y el lugar primario de aparición de la enfermedad (Tabla 1) ¹. Los LTP constituyen un subgrupo muy heterogéneo de LNH, atendiendo a su presentación clínica, histología, respuesta a tratamiento y pronóstico, que representan aproximadamente el 12% de todas las neoplasias linfoides ^{2,3}. En la Figura 1 se muestra la distribución de los subtipos de LTP procedente de un estudio internacional con 1314 pacientes ².

La incidencia de estas neoplasias varía en función de la región geográfica y la raza. En Europa y el norte de América, los linfomas T más frecuentes son los ganglionares, que incluyen el linfoma T angioinmunoblástico (LTAI), el linfoma T periférico no especificado (LTPNE) y el linfoma anaplásico de células grandes (LACG) (ALK-positivo/negativo), mientras que en Asia son más frecuentes el linfoma de células maduras NK/T y la leucemia/linfoma de células T del adulto (ATL) ². En general, los LTP tienen una alta incidencia en Asia y el sur/centro de América ^{1, 4, 5}, relacionados con la endemicidad de ciertos virus como el virus linfotrópico humano tipo 1 (HTLV1) y el virus de Epstein-Barr (EBV), descritos como factores de riesgo en muchos tipos de linfomas T ^{1,6}.

En la Tabla 2 se muestra una breve descripción de los subtipos de LTP más frecuentes en nuestro entorno: el linfoma T angioinmunoblástico (LTAI), el linfoma T periférico no especificado (LTPNE) y el linfoma anaplásico de células grandes (LACG). En la revisión de la OMS del 2016 ¹, se ha descrito una entidad provisional denominada linfoma T periférico con un fenotipo T_{FH} (LTP-TFH) (Tabla 1). Dobay y cols. muestran que este tipo histológico comparte características fenotípicas, clínicas, genéticas y moleculares con los LTAI ⁷.

1.1.3.2 Características moleculares

La patogenia de los LTP no es bien conocida, ni tampoco los mecanismos moleculares implicados en su desarrollo y progresión, debido a su heterogeneidad, baja frecuencia, su gran agresividad clínica y la falta de modelos experimentales.

Los LACG son neoplasias compuestas por grupos cohesivos de células grandes atípicas, que expresan CD30⁸. Alrededor del 50% expresan la quinasa del linfoma anaplásico (ALK1) y constituyen una entidad denominada LACG-ALK+. Los casos restantes se recogen en otra entidad (LACG-ALK-)¹. Entre las translocaciones cromosómicas en las que se encuentra involucrada la quinasa ALK1 en los LACG-ALK+, se destaca la translocación t(2;5)(p23;q35), que involucra a los genes *ALK* y *NPM* (nucleoplasmina), lo que da lugar a la proteína de fusión NPM-ALK⁹, que está constitutivamente activa favoreciendo la transformación de las células e induciendo la activación de la vía de *ERK* de forma independiente de *RAF*, por lo que se considera un evento clave en la patogénesis de este tumor¹⁰⁻¹². También se han descrito variantes de la pareja de fusión con *ALK* y todas conducen a una sobre-expresión y activación de la proteína ALK¹³. Por lo tanto, la activación constitutiva de la quinasa ALK induce la transformación celular y está involucrada en una red de señalización compleja, incluyendo las vías de señalización de STAT3, PI3K/AKT y RAS/ERK¹³.

Por otro lado, la translocación t(5;9)(q33;q22) que resulta en la fusión del transcrito *ITK-SYK* se ha descrito principalmente en LTP con patrón folicular y perifolicular¹⁴. Algunos autores sugieren que dichos subgrupos forman parte del espectro del LTAI¹⁵. Además, estudios en ratones transgénicos con esta translocación mostraron un incremento en la señalización crónica de TCR que podría ser inhibida por el tratamiento con inhibidores de la quinasa SYK¹⁶⁻¹⁸. La proteína SYK aparece sobre-expresada en más del 90% de LTP y el gen mutado en subgrupos específicos de LTP¹⁹.

Tabla 1. Clasificación de la OMS para neoplasias de células T maduras y NK ¹.

<p>Leucemia prolinfocítica T</p> <p>Leucemia de linfocitos grandes granulares</p> <p>Enfermedad linfoproliferativa crónica de células NK*</p> <p>Leucemia agresiva de células NK</p> <p>Enfermedad linfoproliferativa sistémica EBV positiva de la infancia</p> <p>Linfoma tipo Hydroa vacciniforme</p> <p>Leucemia/ Linfoma T de adulto (ATL)</p> <p>Linfoma de células NK/ T extranodal, tipo nasal</p> <p>Linfoma T asociado a enteropatía</p> <p>Linfoma T intestinal monomófico epiteliotrófico</p> <p>Enfermedad linfoproliferativa indolente del tracto gastrointestinal*</p> <p>Linfoma T hepato-esplénico</p> <p>Linfoma T subcutáneo paniculítico</p> <p>Micosis Fungoide</p> <p>Síndrome de Sézary</p> <p>Enfermedades lifoproliferativas primarias cutáneas CD30 positivas</p> <p style="padding-left: 20px;">Papulosis linfomatoide</p> <p style="padding-left: 20px;">Linfoma primario de células grandes anaplásico</p> <p>Linfoma primario cutáneo T gamma/delta</p> <p>Linfoma primario cutáneo T agresivo epidermotrópico citotóxico CD8 positivo*</p> <p>Linfoma primario cutáneo T acral CD8 positivo*</p> <p>Linfoma primario cutáneo T pequeñas/ medianas CD4 positivo*</p> <p>Linfoma T periférico no especificado (LTPNE)</p> <p>Linfoma T angioinmunoblástico (LTAI)</p> <p>Linfoma T folicular*</p> <p>Linfoma T periférico con fenotipo T_{FH} (LTP-TFH)*</p> <p>Linfoma de células grandes anaplásico ALK positivo (LACG/ALK+)</p> <p>Linfoma de células grandes anaplásico ALK negativo (LACG/ALK-)</p> <p>Linfoma de células grandes anaplásico asociado al implante de mama*</p>
<p>*Entidades provisionales</p>

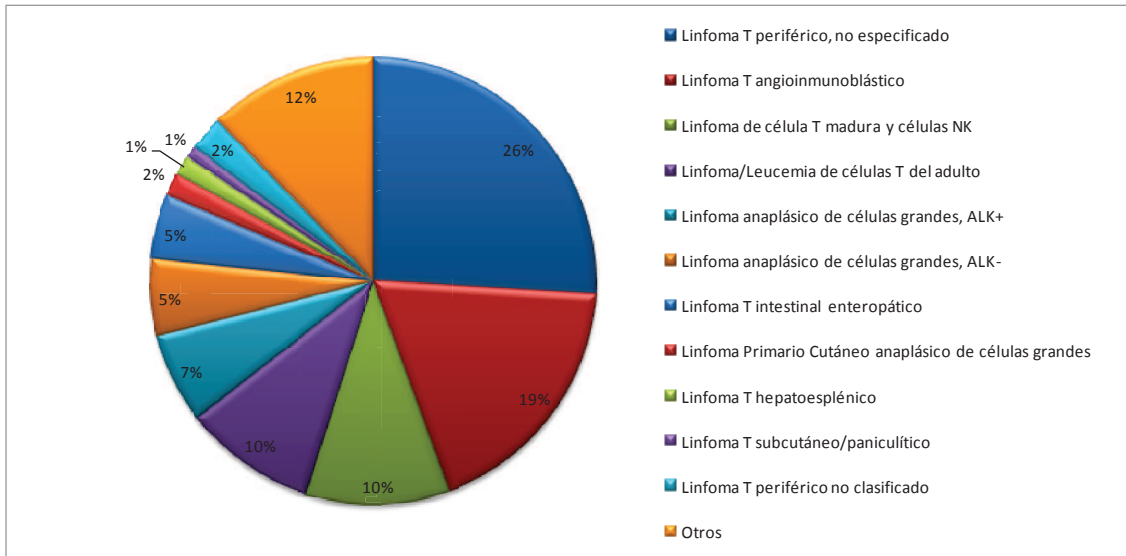


Figura 1. Frecuencia relativa de los subtipos de LTP en un estudio internacional de Linfoma de célula T. NK= natural killer; ALK= quinasa del linfoma anaplásico ².

Recientemente, el uso de técnicas de secuenciación masiva ha demostrado la presencia de mutaciones en genes de potencial relevancia en linfomas T/NK ²⁰⁻²⁸. Así se han descrito mutaciones activantes en la tirosina quinasa FYN en un 3% de los LTP analizados, una quinasa perteneciente a la familia SRC encontrada en linfocitos T y que tiene un importante papel en la activación de células T a través de la señalización de TCR ²⁰. Además, otros genes relacionados con la vía de señalización de TCR, como *CD28*, *LCK*, *FYN*, *EZH2*, *VAV-1* y *PLCG1* han sido encontrados mutados en LTP ^{20-22, 25-27}. También, se han descrito mutaciones en genes implicados en mecanismos de modificación epigenética del ADN como *IDH2*, *TET2* y *DNMT3A* hasta en un 70% de los LTP, según las series, especialmente en LTAI ^{27, 29-32}.

Por otro lado, se ha descrito la activación, en linfomas de célula T, de diferentes vías de señalización como PI3K/AKT, NOTCH, JAK/STAT y MAPK ^{33, 34}. Algunos autores muestran que la presencia de infecciones virales están involucradas en la etiología de los LTP ^{1, 6, 35}.

Estudios de expresión génica han puesto de manifiesto la existencia de diferentes perfiles moleculares en los diferentes subtipos de LTP así como dentro de cada subtipo de LTP ³⁶⁻⁴². En concreto, se han identificado similitudes moleculares entre LTAI y un subconjunto de células T CD4+ denominada célula T colaboradora folicular (T_{FH}) ^{38, 39},

sugiriendo que las células neoplásicas de LTAI podrían derivar de estas células T_{FH} . Varios estudios identificaron un subgrupo de LTPNE con características de LTAI y células T_{FH} , lo que denominaron LTAI tipo like (LTAI-like) ^{38, 43}. En la clasificación actual de la OMS se destaca una entidad provisional que englobaría a este tipo de LTP denominado linfoma T periférico con fenotipo T_{FH}^1 (Tabla 1). Recientemente, se han identificado tres subgrupos de LTPNE con implicación pronóstica: uno de ellos caracterizado por la sobre-expresión de TBX21 y una mejor supervivencia, y aquellos con sobre-expresión de GATA3 o marcadores citotóxicos y peor pronóstico ⁴⁴. Además, los mismos autores identificaron que el subgrupo de tumores con expresión de GATA3 se relacionaba con las firmas génicas de *MYC* y proliferación ⁴⁴. *MYC* es uno de los oncogenes más frecuentemente desregulado en cáncer y está críticamente involucrado en el desarrollo de LTP ⁴⁵.

Los estudios de expresión génica han demostrado que no todos los LTP dependen de la señalización a través de TCR. De Leval y cols. subclasificaron los LTP según si su perfil de expresión génica estaba asociado a la vía de señalización de TCR/CD3 o de CD30 ³⁸. A su vez, está ampliamente demostrado la correlación inversa existente entre la expresión de proteínas de ambas vías de señalización en LTP ^{46, 47}. Los estudios de expresión génica han llevado a la identificación de nuevos biomarcadores con relevantes implicaciones diagnósticas, pronósticas y terapéuticas en LTP ^{42, 48}.

En la Tabla 2, se muestran más características moleculares y genéticas de los diferentes subtipos histológicos de LTP.

Tabla 2. Características de los tipos más comunes de LTP¹.

	Linfoma T angioinmunoblástico (LTAI)	Linfoma T periférico no especificado (LTPNE)	Linfoma anaplásico de células grandes (LACG)
Manifestaciones clínicas	Enfermedad sistémica con linfadenopatía generalizada. Los síntomas comunes son: fiebre, pérdida de peso y presencia de hepatomegalia, esplenomegalia y erupciones en la piel. La afectación extraganglionar es frecuente. Los pacientes son de mediana edad y ancianos. Incidencia similar en hombres y mujeres ^{49, 50} .	Categoría heterogénea, que no cumple el criterio para ser clasificado en otra entidad específica de LTP. Los pacientes presentan ganglios linfáticos agrandados, y a menudo afectación de médula ósea, hígado, bazo y tejidos extraganglionares. Muchos pacientes son adultos. Estos linfomas son raros en niños. Son más frecuentes en hombres.	Los LACG/ALK+ son frecuentes en niños y adultos jóvenes, predominantemente en hombres. Las fases avanzadas de la enfermedad se caracterizan por la presencia de linfadenopatía, fiebre y afectación de tejidos ganglionares y extraganglionares. Los LACG/ALK- ocurren en pacientes mayores y tienen un peor resultado clínico ^{2, 51, 52} .
Morfología	Infiltrado de células polimórficas de tamaño mediano con citoplasma claro, involucrando nódulos linfoides. Proliferación de vénulas endoteliales altas y células dendríticas foliculares. A menudo, células B EBV+ ^{2, 53} .	Infiltrados difusos de células atípicas con núcleo irregular. Vénulas endoteliales altas incrementadas.	Proporción variable de células típicas de este linfoma, con un citoplasma abundante y núcleo arriñonado y excéntrico.
Inmunofenotipo	Fenotipo CD4+/CD8+. Expresión de antígenos de célula T (CD2, CD3 y CD5). Expresión de marcadores T _{FH} (CD10, CXCL13 y PD-1) ^{38, 54} .	Predominantemente fenotipo CD4+/CD8-. Pérdida de CD5, CD7 y CD52, y expresión de CD2. Frecuentemente TCRβ+. Algunos casos, expresan CD30. Proliferación alta ^{5, 55, 56} .	Células CD30+. Pérdida de expresión de CD2, CD3, CD5 y CD43 ⁵⁷ . Muchos casos expresan antígenos citotóxicos como TIA-1, granzima B y perforina ⁵⁸ .
Alteraciones genéticas y Patogénesis	Frecuentemente, reordenamiento clonal de TCR. Anormalidades genéticas han sido descritas, como trisomía de los cromosomas 3 y 5, ganancia de los cromosomas X, 22q, 19 y 11q13, y pérdida 13q ^{49, 59} . Se ha sugerido que la presencia de los virus EBV y HHV6B juegan un papel en la transformación maligna de estas células ^{5, 6} .	Reordenamiento clonal de TCR ³ . Cariotipos complejos. Se han observado ganancia en los cromosomas (7q, 8q, 17q y 22q) y pérdida (4q, 5q, 6q, 9p, 10q, 12q y 13q) ^{59, 60} . Estudios de expresión génica han revelado un subtipo de casos con características de LTAI. El subtipo LTPNE es una entidad heterogénea, que probablemente englobe diferentes subtipos ^{42, 43} .	Translocaciones en las que está involucrada la quinasa ALK en LACG/ALK+, lo que conlleva a desequilibrios cromosomales ^{9, 61, 62} . Alteraciones en los LACG/ALK-, como ganancia de 1q y 6p21 ⁶² . Los LACG/ALK+ y ALK- tienen alteraciones cromosómicas y perfiles de expresión génica diferentes, probablemente tienen mecanismos moleculares diferentes ⁶¹ .

Abreviaturas: ALK=quinasa de linfoma anaplásico; EBV=virus de Epstein-Barr; HHV6B=virus del herpes humano 6B; TIA-1=antígeno intracelular restringido a célula T-1; TCR=receptor de célula T; TCRβ=cadena beta del receptor de célula T; T_{FH}=célula T colaboradora folicular.

1.1.3.3 Factores pronóstico, supervivencia y tratamiento

Un factor pronóstico importante dentro de los LTP es el subtipo histológico; así, la supervivencia global estimada a los 5 años es del 32% en los subtipos LTAI, LTPNE y todos los linfomas de células maduras NK/T, 14% en ATL, 70% en los LACG/ALK+ y 49% en los LACG/ALK-².

Diversos estudios han descrito múltiples factores pronóstico para la respuesta y supervivencia en LTP. El Índice Pronóstico Internacional (IPI) se utiliza para separar grupos pronósticos en pacientes con LTP⁶³ y se calcula teniendo en cuenta el estadio, el nivel de lactato deshidrogenasa (LDH) en suero, el estado funcional (ECOG), el número de localizaciones extraganglionares afectadas y la edad al diagnóstico¹. Recientemente, se ha desarrollado el Índice Pronóstico para Linfoma de célula T (PIT) para pacientes con LTPNE basado en la edad, el estado funcional (ECOG), el nivel de LDH en suero y la afectación de la médula ósea^{64, 65}. Este índice se ha modificado (mPIT, índice pronóstico modificado para el linfoma de células T) sustituyendo la afectación de la médula ósea por el estudio inmunohistoquímico del índice de proliferación Ki-67⁵⁵. Por otro lado, se ha desarrollado el IPTCLP (índice de un proyecto internacional de LTP) en pacientes con LTAI y LTPNE, que tiene en cuenta la edad, el estado funcional y el recuento de plaquetas como variables principales². Los cuatro factores son útiles para predecir la respuesta y la supervivencia en pacientes con LTP⁶⁶. Otros marcadores han sido sugeridos para predecir la supervivencia en LTP como p53, Ki-67, CD30 y la infección por EBV^{4, 6, 67}.

Actualmente, los pacientes con LTP son tratados con CHOP (ciclofosfamida, doxorubicina, vincristina y prednisona) o CHOP-like en el que se incorpora antraciclina, pero se trata de una terapia frecuentemente no curativa^{68, 69}. La respuesta inadecuada, ya sea la recaída o la imposibilidad de lograr una remisión, sigue siendo un problema importante en estos pacientes. La presencia de una supervivencia global de sólo 5.5 meses para los pacientes con LTP en recaída o refractarios que no se sometieron a trasplante, destaca la falta de terapias disponibles y eficaces para estos pacientes⁷⁰. Además, no se destaca una diferencia estadísticamente significativa en la supervivencia global después de la recaída entre cada uno de los subtipos de LTP: LTAI; 7.7 meses, LTPNE; 6.5 meses, y LACG; 3 meses⁷⁰. El mal pronóstico de estos

pacientes y el escaso conocimiento de su mecanismo etiopatogénico confirman la necesidad de encontrar nuevos regímenes terapéuticos^{2, 68}.

Recientemente, se han puesto en marcha ensayos clínicos, que emplean fármacos diferentes a los clásicos, para los diferentes subtipos de LTP, con la esperanza de descubrir un tratamiento más eficaz. Estos regímenes, que incluyen antraciclinas, análogos de nucleósidos, inhibidores de histonas deacetilasas, inhibidores del proteasoma y anticuerpos monoclonales, no han incrementado la supervivencia global, son mal tolerados o están aún en proceso de experimentación^{65, 69, 71-80}. Los resultados tras el trasplante autólogo de progenitores hematopoyéticos parece prometedor, si bien los resultados en la literatura son escasos, controvertidos y la técnica en si misma confiere una alta morbilidad⁸¹.

Recientes avances en el conocimiento de la biología de estas neoplasias ha resultado en la identificación de nuevas dianas terapéuticas que podrían ser utilizadas en una terapia individualizada impulsada por biomarcadores⁸².

1.2. Vías de señalización implicadas en LTP

1.2.1. Vía de señalización de TCR

Existen numerosos datos que sugieren que la supervivencia de los linfocitos T normales y tumorales es dependiente de la activación de su receptor de membrana (TCR)^{18, 83}. TCR es un complejo multimérico constituido por dos cadenas polipeptídicas conocidas como α y β , que permanecen unidas covalentemente por puentes disulfuro. Se organizan en tres dominios estructurales: un dominio extracelular, que es el responsable de la alta especificidad del receptor, una región transmembrana y un tallo intracelular, el cual carece de actividad enzimática. TCR se expresa en la superficie celular en asociación con cuatro moléculas CD3, las cuales permiten la transmisión de la señal al interior celular tras el reconocimiento antigénico.

Tras el ligamiento del receptor, dos residuos de tirosina son fosforilados rápidamente por proteínas tirosinas quinasas (PTK) de la familia SRC (LCK y FYN), transformándolos en ligandos de alta afinidad para la PTK de la familia SYK (ZAP-70). Estudios realizados con células de humanos y ratones deficientes en *ZAP-70*⁸⁴⁻⁸⁶ confirman la función que esta PTK ejerce en la transducción de la señal. Las acciones

coordinadas de estas PTKs permiten el reclutamiento de moléculas de señalización portadoras de dominios SH2, incluyendo *SOS*, *GRB-2*, *PLCG1* y *VAV*, las cuales se asocian con otras proteínas portadoras de residuos de tirosina fosforilados, a través de la molécula adaptadora *LAT*⁸⁷⁻⁸⁹. De esta manera, se inicia una cascada de señales que conduce finalmente a la proliferación celular, la secreción de citoquinas y las funciones efectoras. El aumento de la concentración intracelular de calcio ($[Ca^{2+}]_i$), que se produce como resultado de la fosforilación y activación de *PLCG1*⁹⁰, es fundamental para la estimulación de TCR. La activación de *PLCG1* genera los segundos mensajeros inositol 1,4,5-trifosfato (IP3) y diacilglicerol (DAG) a partir de la hidrólisis de fosfatidilinositol-4,5-bisfosfato (PIP2)⁹¹. Mientras que IP3 media la elevación de $[Ca^{2+}]_i$, esencial para la activación del factor nuclear de activación de células T (NFAT), DAG activa la vía de señalización de ERK⁹² y la proteína quinasa C (PKC), la cual media la activación de NF- κ B a través del complejo *CARD11-BCL10-MALT1*⁹³. Por otro lado, se ha sugerido que *ZAP-70* estaría encargada de la unión *GRB-2/VAV/LAT*⁸⁸, facilitando la translocación de *VAV* a la membrana y su fosforilación; esto contribuye a la reorganización del citoesqueleto a través de la activación de las GTPasas *RAC*, *RHO* y *CDC42*⁹⁴ (Figura 2). Estudios realizados con líneas celulares deficientes en *LAT* muestran un defecto importante en la fosforilación de *PLCG1*, así como una disminución del flujo de Ca^{2+} y de la activación de *ERK*⁹⁵, sin embargo la fosforilación de *ZAP-70* no se ve alterada^{87,95}.

1.2.1.1. Vía de señalización de las MAPK

La vía de señalización de las MAPK (proteínas quinasas activadas por mitógenos) es importante para la regulación de la expresión de genes que controlan diversos procesos vitales para la función celular⁹⁶. *ERK1* y *2* regulan la expresión génica en el núcleo celular, donde fosforilan diversos factores de transcripción, entre ellos C-MYC⁹⁷.

La activación de dicha vía se inicia con la activación de la GTPasa *RAS* a través de las moléculas de señalización *GRB-2* y *SOS*. A continuación, *RAS* recluta a la quinasa *RAF*, la cual se encarga de activar a *MEK-1* y ésta a *ERK*⁹⁸. Se ha descrito que *ZAP-70* transloca a *SOS* y *GRB-2* del citoplasma a la membrana, uniéndose a *LAT*, permitiendo la activación de la vía en células T⁸⁸. Por otra parte, se han descrito vías alternativas de activación de *RAS* independientes de *SOS*⁹⁹. Además, se le ha atribuido a *VAV* la capacidad de activar la vía^{100,101}.

Muchos de los genes implicados en la activación de la vía se han encontrado mutados en diferentes tipos de tumores ¹⁰²⁻¹⁰⁴, lo que sugiere una activación aberrante de *ERK*. Por otro lado, se han desarrollado diversos compuestos farmacológicos para inhibir la actividad de esta vía, con beneficios clínicos en el tratamiento de tumores sólidos ¹⁰⁵. Además, el uso de técnicas de inmunohistoquímica podrían ayudar a identificar la activación de la vía, a través del reconocimiento de la presencia en el núcleo de la proteína ERK fosforilada (p-ERK).

Estos datos sugieren que la vía de señalización RAS/RAF/MEK/ERK es un candidato a ser explorado molecularmente en tumores como los LTP.

1.2.1.2. Vía de señalización de Calcineurina

Como se ha comentado anteriormente, tras la estimulación de TCR, se induce la activación de *PLCG1*, el cual lleva a cabo la hidrólisis de PIP2 que genera como segundos mensajeros IP3 y DAG, los cuales son esenciales para la activación de las células T ¹⁰⁶. El primero, induce la liberación de $[Ca^{2+}]_i$, que favorece la activación de la fosfatasa calcineurina, que defosforila a NFAT y permite su translocación al núcleo ¹⁰⁷, en el cual participa en la regulación transcripcional de *GATA3* ¹⁰⁸. Además, *PLCG1* está involucrado en múltiples procesos celulares incluyendo proliferación, angiogénesis, adhesión, migración y apoptosis ¹⁰⁹⁻¹¹³.

PLCG1 se encuentra sobre-expresado en algunos tumores sólidos ¹¹⁴⁻¹¹⁶. Recientemente, Vaqué y cols. ²³ han identificado un 20% de casos de linfoma T cutáneo (LCCT) con la mutación S345F en el gen *PLCG1*. Se trata de una mutación que está presente en uno de los dominios catalíticos de la proteína. Un hallazgo similar ha sido descrito en LTAI ^{22, 26, 27} y en ATL ²⁴. Estudios funcionales han mostrado que la mutación incrementa la actividad de NFATc1 y aumenta la sensibilidad a inhibidores de calcineurina ²³. Por otro lado, diversos inhibidores de *PLCG1* han sido descritos para inhibir los procesos celulares dependientes de *PLCG1* ¹¹⁷⁻¹²⁰. La inhibición de este gen podría tener un efecto antiproliferativo en las células tumorales.

1.2.1.3. Vía de señalización de las RHO GTPasas

Las RHO GTPasas son enzimas de tipo hidrolasas capaces de unirse e hidrolizar moléculas de guanósín trifosfato (GTP), su función es regulada por factores intercambiadores de nucleótidos de guanina (GEF), proteínas activadoras (GAP) y factores inhibidores de nucleótidos de guanina (GDI) ¹²¹. En mamíferos se agrupan en diferentes familias ¹²², siendo una de ellas la familia RHO, cuyos miembros más conservados evolutivamente son *RHOA*, *RAC1* y *CDC42* ^{123, 124}. Son moléculas transductoras de señales, que una vez activadas, interactúan con proteínas efectoras ¹²⁵ a través de las cuales regulan diversos procesos celulares, incluyendo morfogénesis, migración, división y adhesión celular, reordenamiento del citoesqueleto y expresión génica ^{121, 126}.

VAV-1 es un factor intercambiador de nucleótidos de guanina para las RHO GTPasas ¹²⁷, favoreciendo su activación. Juega un importante papel en la señalización de TCR ^{94, 127-130}. Además, es requerido para la activación de las integrinas, el reordenamiento del citoesqueleto y la polarización celular ^{94, 131-134}. Mutaciones en *VAV-1* han sido descritas en ATL ²⁴ y en LTP ^{26, 135}. Por su parte, *RHOA* está involucrado en múltiples procesos celulares incluyendo organización del citoesqueleto de actina, proliferación, migración, protrusión, exocitosis/endocitosis y regulación del ciclo celular ¹³⁶⁻¹⁴². Algunos estudios apoyan la idea de que la activación de *RHOA* promueve la tumorigénesis, sobre todo debido a cambios en la motilidad celular ^{143, 144}.

La expresión y/o actividad de las RHO GTPasas está frecuentemente alterada en las células tumorales ¹⁴⁵. La expresión de *RHOA* se encuentra significativamente elevada en algunos tipos de cáncer ¹⁴⁶⁻¹⁵⁰, con aumento paralelo a la progresión tumoral. Varios estudios recientes han descrito la mutación G17V en el gen *RHOA* ^{20-22, 26-28, 151} en un 70% de casos diagnosticados de LTAI. La activación de *RHOA* provoca el ensamblaje de filamentos de actina y miosina conocidos como fibras de estrés; en cambio, la presencia de la mutación reduce la formación de dichas fibras en los fibroblastos. Debido a esta mutación, *RHOA* no es capaz de unirse a GTP, resultando en un efecto dominante negativo de la señalización ^{20-22, 152}. Además, la mutación tiene un efecto en la proliferación e invasión celular; esto podría explicar el potencial oncogénico de *RHOA* ¹⁴³. Las células que expresan la forma mutada de *RHOA* aumentan la fosforilación de AKT, a través de la vía RHOA/ROCK/PTEN, en

comparación con las células que tienen *RHOA* no mutado, asociado con un incremento en la proliferación celular²². Otras mutaciones en el gen *RHOA* han sido descritas en pacientes con LTP, carcinoma gástrico difuso, linfoma de Burkitt y carcinoma de cabeza y cuello^{20, 26, 153-155}.

La activación de la vía de señalización de TCR tiene un importante papel en la patogénesis de los LTP, ya que induce la expresión de marcadores subrogados. La presencia de mutaciones en genes de dicha vía sugiere el potencial desarrollo de terapia específica contra genes mutados o vías de señalización activadas por dichas mutaciones.

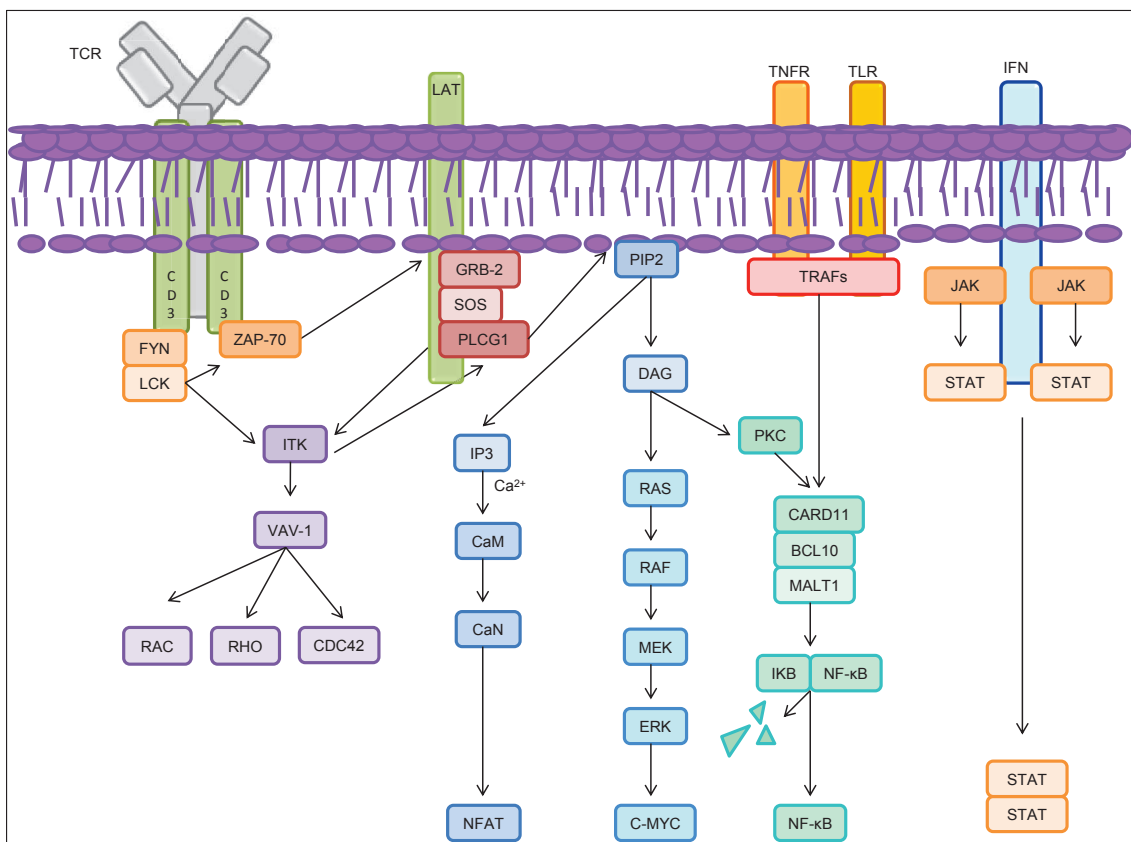


Figura 2. Representación esquemática de las vías de señalización de TCR, NF-κB y JAK/STAT.

1.2.2. Vía de señalización de NF-κB

La familia de factores de transcripción NF-κB (factor nuclear kappa B) incluye 5 miembros: NF-κB1 (p105/p50), NF-κB2 (p100/p52), RelA (también llamado p65), RelB y c-Rel. La señalización a través de NF-κB, se divide en dos vías: la clásica o canónica (p105/p50, RelA, c-Rel) y la alternativa o no canónica (p100/p52 y RelB)¹⁵⁶.

¹⁵⁷. En la mayoría de las células, NF- κ B se encuentra inactivo en el citoplasma a través de la unión de proteínas inhibidoras I κ B (I κ B α , I κ B β , I κ B ϵ), que contienen múltiples dominios con repeticiones de ankirina ¹⁵⁸. Los precursores de las proteínas p50 y p52 (p105 y p100, respectivamente) también se comportan como I κ B, al tener dominios con repeticiones de ankirina ¹⁵⁹. En presencia de un estímulo, se activa el complejo de quinasas I κ B (IKK), responsables de la fosforilación de I κ B y su posterior degradación vía proteasoma. De esta manera, los dímeros p50/RelA, c-Rel o p52/RelB, se translocan al núcleo donde regulan la transcripción génica ¹⁶⁰. La activación de NF- κ B es inducida por TRAFs (factores asociados al receptor del factor de necrosis tumoral, TNF) ¹⁵⁷, TCR ¹⁶¹, TLR (receptor similar a Toll) ¹⁶² o algunos virus como EBV o HTLV-1 ¹⁶³⁻¹⁶⁵ (Figura 2).

Se ha visto que la activación de NF- κ B está involucrada en procesos de tumorigénesis, a través de la regulación de proliferación, supervivencia, angiogénesis, inflamación, metástasis y supresión de apoptosis ^{166, 167}, tanto en tumores sólidos como hematológicos ^{168, 169}.

Se han encontrado alteraciones génicas en diferentes componentes de la vía en leucemias y linfomas, incluyendo linfoma difuso de célula grande, leucemia linfocítica crónica B, leucemia linfoblástica aguda T o B, LCCT y LTP ^{23, 26, 27, 170-174}. Recientemente, se han encontrado mutaciones en *CARD11* en linfoma difuso de célula grande, ATL, LCCT y LTP ^{23, 24, 26, 175}, y en *TNFAIP3* (A20) en linfoma de Hodgkin, linfoma de células del manto, linfoma folicular y LCCT ¹⁷⁶⁻¹⁷⁸. Además, mutaciones en *MYD88* han sido descritas en diferentes tipos de linfomas ¹⁷⁹. La frecuente activación y la presencia de alteraciones génicas en la vía de NF- κ B en linfomas, destacan la importancia de esta vía en su patogénesis. La inhibición de componentes de esta vía podría tener un potencial efecto terapéutico.

1.2.3. Vía de señalización de JAK/STAT

Las proteínas JAK (quinasas Janus, JAK1-3 y TYK2) poseen actividad tirosina-quinasa y se asocian con receptores de citoquinas ¹⁸⁰. Tras la unión del ligando, las JAK se asocian a los receptores permitiendo su fosforilación, lo que produce la activación de miembros de la familia STAT (transductores y activadores de señales de transcripción, STAT1-4, 5A, 5B y 6) ¹⁸¹. A continuación, se produce una interacción STAT/STAT,

que se transloca al núcleo donde activan la transcripción génica ¹⁸² (Figura 2). Cada receptor de citoquinas se acopla a un complejo JAK/STAT específico ^{183, 184}.

Se ha visto que la vía JAK/STAT está implicada en varios procesos celulares, incluyendo proliferación, diferenciación y supervivencia ¹⁸⁵⁻¹⁸⁷. Una activación aberrante de la vía ha sido descrita en diversos tipos de tumores sólidos y hematológicos ¹⁸⁸⁻¹⁹³. Recientemente, mutaciones en la vía JAK/STAT han sido encontradas en diferentes tipos de neoplasias hematológicas ^{23, 24, 26, 194-203}. Diversos estudios han descrito el uso de inhibidores de JAK/STAT en líneas celulares con inhibición de la proliferación celular ^{203, 204} y en pacientes con neoplasias hematológicas y tumores sólidos con mejora en los síntomas e incremento en la supervivencia ²⁰⁵⁻²⁰⁸. También se han desarrollado anticuerpos que pueden inactivar a algunas STAT ²⁰⁹. El uso de inhibidores específicos de la vía podría tener un importante papel terapéutico.

1.2.4. Reguladores epigenéticos

Modificaciones epigenéticas como la metilación del ADN o la metilación/acetilación de histonas juegan un importante papel en varios procesos celulares incluyendo la proliferación y diferenciación celular ²¹⁰.

1.2.4.1. TET2

Recientemente, se ha identificado como marcador epigenético a la familia de proteínas TET (Ten-Eleven Translocation, TET 1-3), debido a que catalizan la conversión de 5-metil-citosina (mC) a 5-hidroximetil-citosina (hmC) ²¹¹⁻²¹³. Sólo *TET1* y *TET2* aparecen como involucrados en enfermedades hematológicas malignas ²¹⁴.

Estudios realizados en ratones deficientes en *TET2* han identificado que funciona como un gen supresor cuya haploinsuficiencia está directamente implicada en la transformación neoplásica de células de estirpe linfoide y mieloide ²¹⁵⁻²¹⁷. Se trata de una de las primeras alteraciones moleculares que aparecen en procesos mieloproliferativos y mielodisplásicos relacionados con la edad, se asocia a progresión de la enfermedad y a respuesta a ciertas drogas demetilantes ²¹⁸.

Mutaciones en *TET2* han sido descritas en diferentes tipos de neoplasias hematológicas incluyendo leucemia mielomonocítica crónica, leucemia mieloide aguda (LMA), leucemia mieloide crónica y LTP ^{20-22, 26-28, 30-32, 217, 219-224}. Las mutaciones en

este gen alteran su actividad catalítica, ya que las mutaciones “*missense*” ocurren en el dominio catalítico C-terminal. Mientras que las mutaciones “*nonsense*” ocurren en el dominio N-terminal y dan lugar a una proteína truncada. Estos datos sugieren que la interrupción de los procesos de desmetilación del ADN mediados por *TET2* son importantes para el desarrollo de neoplasias hematológicas ²²⁵. La presencia de mutaciones en *TET2* se ha relacionado con peor pronóstico en LTAI y LTAI-like ³¹.

1.2.4.2. DNMT3A

Los genes de la familia *DNMT* (DNA (Cytosine-5) methyltransferase, DNMT 1, 3A y 3B) son metiltransferasas que catalizan la adición de un grupo metilo al residuo citosina de los dinucleótidos CpG ²²⁶. La metilación del ADN es importante en la regulación de la expresión génica y en el mantenimiento de la integridad genómica ²²⁷. El gen *DNMT3A* metila el ADN en sitios específicos y repetitivos. Parte de su función silenciadora se debe a la modificación de la cromatina tras uniones específicas con proteínas como EZH2 (componente catalítico del complejo represor 2 polycomb) ²²⁸.

Estudios realizados en ratones deficientes en *DNMT3A* han identificado que la supresión de este gen promueve el crecimiento tumoral y la progresión en el cáncer de pulmón, sugiriendo que puede actuar como gen supresor de tumores y puede ser un factor crucial en la génesis de este tipo de tumor ²²⁹.

DNMT3A se encuentra sobre-expresado en diferentes tipos de tumores sólidos como próstata, hepatocelular, páncreas y gástrico ²³⁰⁻²³³, así como en ciertos tipos de leucemias ²³⁴.

Mutaciones en el gen *DNMT3A* han sido descritas en LMA, mielodisplasia, leucemia linfoblástica aguda de célula T y LTP ^{20-22, 26, 28, 30, 32, 226, 235-240}. En este último, la presencia de mutaciones en *DNMT3A* se ha asociado frecuentemente con mutaciones en el gen *TET2* ^{20-22, 27, 30, 32, 240}.

1.2.4.3. IDH2

Los genes *IDH* (Isocitrate Dehydrogenase, IDH 1-2) codifican enzimas presentes en la mitocondria que participan en reacciones de producción de energía para las actividades celulares. Específicamente, *IDH2* convierte el isocitrato a 2-ketoglutarato y éste en energía.

La expresión de *IDH1* se ha visto disminuida en una etapa temprana de la tumorigénesis de piel y se ha visto que está correlacionado con la progresión de este tipo de tumor ²⁴¹. Por otro lado, la sobre-expresión de *IDH2* se ha visto en etapas avanzadas del carcinoma colorrectal en comparación con etapas tempranas de la enfermedad, lo que indicaría que este gen juega un importante papel en este tipo de cáncer ²⁴².

Mutaciones en *IDH* se han identificado en pacientes con diferentes tipos de tumores sólidos y hematológicos ²⁴³⁻²⁴⁸. Todas las mutaciones identificadas hasta la fecha han sido en un único aminoácido dando lugar a la mutación R132-IDH1 o su análogo en *IDH2* (R172). En el caso de LMA, se ha destacado que mutaciones en *IDH2* pero no en *IDH1* se asocian con un pronóstico favorable ²⁴⁹. Recientemente, mutaciones en el gen *IDH2* han sido descritas en un 30-40% de casos diagnosticados de LTAI ^{20-22, 26-29, 32, 249, 250}.

La presencia de mutaciones en genes que participan en la regulación epigenética se ha relacionado con la presencia de la mutación G17V en el gen *RHOA* ^{21, 240}. Se ha propuesto que la adquisición de mutaciones en estos genes podría definir un subgrupo de LTP de fenotipo T_{FH} ampliando el espectro del LTAI ^{21, 251}.

Una mejor comprensión de los mecanismos moleculares de los LTP podría dar lugar a nuevas oportunidades para el tratamiento de este tipo de linfoma.

OBJETIVOS

Los Linfomas de célula T Periféricos son un grupo de linfomas agresivos, con pobres resultados terapéuticos. La patogenia molecular es parcialmente desconocida y la falta de terapias eficientes demanda estudios adicionales para aclarar su mecanismo molecular e identificar nuevas dianas terapéuticas.

La primera parte del proyecto está centrada en el estudio de perfiles de expresión génica en Linfomas de célula T Periféricos. Debido a que estos estudios han revelado la existencia de diferentes perfiles moleculares en los distintos subtipos de Linfomas de célula T Periféricos, los objetivos de esta primera parte de la Tesis fueron:

- a. Identificar firmas moleculares de expresión génica, que revelen rutas de señalización importantes en la patogenia de los Linfomas de célula T Periféricos.
- b. Identificar genes que pudieran tener implicación pronóstica en Linfomas de célula T Periféricos, o que puedan suponer posibles dianas terapéuticas.

Datos previos indican que la presencia de mutaciones en genes relevantes en linfomas de célula T, podría contribuir a explicar su patogenia. Los objetivos de esta segunda parte del proyecto fueron:

- c. Identificar mutaciones predefinidas y analizar su frecuencia en los diferentes subtipos histológicos más comunes de nuestro entorno.
- d. Analizar el significado clínico y pronóstico de dichas mutaciones.
- e. Establecer una correlación entre la presencia de mutaciones y la expresión de marcadores subrogados de vías de señalización implicadas en Linfomas de célula T Periféricos.

La validación de estos hallazgos y el mejor conocimiento de su papel biológico podrían tener un impacto relevante en la identificación de diferentes subtipos de Linfomas de célula T Periféricos con diferente pronóstico, que quizá pudieran beneficiarse de terapias específicas.

MATERIAL Y MÉTODOS

3.1. Muestras de pacientes

Para el estudio de perfiles de expresión génica, se utilizó una serie de cribado compuesta por 37 muestras en fresco de LTP (17 LTAI y 20 LTPNE) y 6 muestras de tejido linfoide reactivo utilizadas como controles, y una serie de validación independiente de 135 muestras (80 LTAI y 55 LTPNE) fijadas en formol e incluidas en parafina (FFIP). Estas series también se utilizaron para el estudio de mutaciones en los genes *RHOA* y *PLCG1* mediante PCR cuantitativa (qPCR).

Por otro lado, para el estudio de mutaciones mediante secuenciación de última generación (NGS), se utilizó una serie compuesta por 166 muestras FFIP (98 LTAI y 68 LTPNE).

Todos los casos incluidos en el estudio fueron tomados al diagnóstico; éste se realizó siguiendo los criterios de clasificación de la OMS para linfomas periféricos ¹. Las muestras biológicas y datos clínicos de los pacientes incluidos en este estudio fueron recogidos, procesados y almacenados de acuerdo a los protocolos de calidad, seguridad y confidencialidad aprobado por los diferentes Biobancos de hospitales españoles y administrados por el biobanco del Hospital Universitario Marqués de Valdecilla (HUMV). Su uso fue aprobado por los Comites Éticos de Investigación Clínica del HUMV (Santander) y de la Fundación Jiménez Díaz, FJD (Madrid) (Anexo I).

3.2. Inmunohistoquímica

3.2.1. Construcción de micromatrices de tejidos (TMAs)

Esta técnica permite el análisis simultáneo de muchas muestras tumorales FFIP en una misma sección. Se seleccionaron áreas representativas del tumor utilizando para ello secciones de hematoxilina-eosina. De dichas áreas se cogieron dos-tres cilindros de 1mm de diámetro cada uno. Estos cilindros se colocaron según una plantilla predefinida, en un nuevo bloque de parafina utilizando un “tissue arrayer” (Beecher Instruments, Silver Spring, MD) ²⁵².

3.2.2. Tinciones inmunohistoquímicas

Las tinciones inmunohistoquímicas (IHQ) se han realizado en los servicios de Anatomía Patológica del HUMV y la FJD y en la Unidad de Anticuerpos Monoclonales

del Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas (CNIO). En la Tabla 3, se muestran los anticuerpos utilizados en esta Tesis Doctoral.

Secciones de los TMAs construidos fueron desparafinadas e hidratadas por incubación a 56°C durante la noche, seguido de inmersión en xilol y en un gradiente decreciente de etanol. La desparafinación, hibridación y desenmascaramiento del antígeno se realizaron en el sistema PT Link (DAKO, Glostrup, Dinamarca). Se llevó a cabo la recuperación de antígenos inducida por calor, para ello se sumergieron los portaobjetos en EnVision™ FLEX Target Retrieval Solution (High pH 1X) durante 20 minutos a 95°C. A continuación, se realizó la técnica de inmunohistoquímica en el sistema robotizado Autostainer Link48 (DAKO) de forma protocolizada utilizando el método EnVision. Los portaobjetos se humedecieron durante 15 minutos con el buffer de lavado (0.05 mol/L TBS con Tween). Posteriormente, se incubaron con EnVision™ FLEX Peroxidasa de rábano (HRP) durante 5 minutos y a temperatura ambiente, para bloquear la actividad peroxidasa endógena. A continuación, se lavaron en el buffer de lavado y durante 30 minutos se incubaron con los anticuerpos primarios diluidos de manera adecuada. Tras un paso de lavado, se incubaron con los anticuerpos secundarios conjugados con un polímero marcado con HRP durante 30 minutos, se lavaron posteriormente y se sumergieron en un buffer que contenía un sustrato de diaminobencidina (DAB) durante 10 minutos. Las preparaciones se contratiñeron con hematoxilina durante 1 minuto, se lavaron y deshidrataron a través de incubaciones consecutivas en un gradiente creciente de etanol y xilol, y se montaron automáticamente en el sistema Ventana Symphony (Roche, Basilea, Suiza).

3.2.2.1. Doble Inmunohistoquímica

En este caso, se llevó a cabo un procedimiento de segunda inmuno-fosfatasa (AP). El desparafinado, rehidratación, y pasos de recuperación de antígeno se omitieron. El anticuerpo primario se aplicó durante 40 minutos, seguido de incubación con el reactivo de bloqueo (20 minutos) y el polímero marcado con AP (30 minutos), ambos son componentes del sistema de detección de AP Red de Bond Polymer (Leica Biosystems). La reacción se desarrolló con el sustrato Fast Red incluido en el sistema de detección de Bond Polymer AP Red. Se realizó la contratinción con hematoxilina.

3.2.3. Análisis y cuantificación

Se evaluó la expresión de los diferentes anticuerpos. El sistema de valoración se muestra en la Tabla 3. Las tinciones inmunohistoquímicas fueron evaluadas por dos patólogos diferentes con experiencia en procesos hematológicos, en el que tuvieron en cuenta tanto la intensidad de tinción como el porcentaje de células tumorales teñidas.

Tabla 3. Panel de anticuerpos utilizados en el estudio.

Anticuerpo	Clon	Casa comercial	Positividad
BCL6 FLEX	Mouse monoclonal (PG-B6p)	DAKO	>10%
CD10 FLEX	Mouse monoclonal (56C6)	DAKO	>10%
CD23 FLEX	Rabbit monoclonal (SP23)	DAKO	>10%
CD3 FLEX	Rabbit policlonal	DAKO	>10%
CD30	Mouse monoclonal (CONGD/B9)	CNIO	>10%
C-MYC	Rabbit monoclonal (Y69)	ABCAM	>20%
CXCL13	Goat Policlonal (AF801)	R&D System	>10%
GATA3	Rabbit policlonal (32858)	ABCAM	>10%
ICOS	Rabbit Policlonal (FL-199)	Santa Cruz Biotechnology	>10%
Ki-67 FLEX	Mouse monoclonal (MIB-1)	DAKO	>80%
NFATc1	Mouse monoclonal (7A6)	BD Biosciences	>10%
NF-κB p50	Rabbit monoclonal	Gene Tex	>10%
NF-κB p52	Mouse monoclonal	Upstate	>10%
PD-1	Mouse monoclonal (NAT)	CNIO	>10%
p-ERK	Rabbit monoclonal (20G11)	Cell Signaling Technologies	>20%
p-STAT3	Rabbit monoclonal (D3A7)	Cell Signaling Technologies	>10%
p-STAT6	Rabbit monoclonal (YE361)	ABCAM	>20%

Los casos fueron considerados positivos para p-ERK cuando más del 20% de células tumorales mostraron tinción nuclear. Se encontró p-ERK no sólo en células tumorales sino también en células dendríticas foliculares, endotelio vascular (usado como control interno), y en otras células dendríticas estromales no especificadas. Para estar seguros de la condición neoplásica de las células p-ERK positivas, se realizó una doble inmunohistoquímica para p-ERK/PD-1 y p-ERK/CD23 en secciones de los TMAs construidos. En la cuantificación de PD-1, se establecieron dos grupos: 0, 0-10% de células positivas; 1, más del 10% de células positivas, de acuerdo a un estudio previamente publicado ²⁵³, aunque también podríamos considerar cuatro grupos: 0, 0-10% de células positivas; 1, 10-30% de células positivas; 2, 30-50% de células positivas; 3, más del 50% de células tumorales positivas, de acuerdo a estudios previos

^{7, 254}. En esos trabajos, también establecieron cuatro grupos para considerar los casos positivos para ICOS, BCL6, CD10 y CXCL13: 0, 0-10% de células positivas; 1, 10-30% de células positivas; 2, 30-50% de células positivas; 3, más del 50% de células tumorales positivas ^{7, 254}. Por su parte, en el caso de C-MYC, se establecieron dos grupos: 0, 0-20% de células positivas; 1, más del 20% de células positivas, de acuerdo a un estudio previamente publicado ²⁵⁵. De acuerdo a un estudio previo ⁴⁷, los casos considerados positivos para Ki-67 fueron aquellos con un alto índice de proliferación (más del 80% de células tumorales). En ese mismo estudio, se establecieron tres grupos para considerar los casos positivos para CD30, CD3 y las subunidades de NF-κB (p50 y p52): 0, 0-10% de células positivas; 1, 10-80% de células positivas; 2, más del 80% de células neoplásicas positivas ⁴⁷. Los casos fueron considerados positivos para NFATc1 de acuerdo a un estudio previo ²³, en el que establecieron tres grupos: 0, 0-10% de células positivas; 1, 10-50% de células positivas; 2, más del 50% de células positivas. Los casos positivos para p-STAT3 se agruparon en dos grupos: 0, 0-10% de células positivas; 1, más del 10% de las células neoplásicas positivas. Por su parte, para considerar los casos positivos para p-STAT6 se establecieron dos grupos: 0, 0-20% células positivas; 1, más del 20% de células neoplásicas positivas. Los niveles de expresión de GATA3 fueron establecidos en dos grupos de acuerdo a estudios previos: 0, 0-10% de células positivas; 1, más del 10% de células positivas ^{44, 256}. Iqbal y cols. establecieron los niveles de expresión de GATA3 en tres grupos: 0, 0-40% de células positivas; 1, 40-80% de células positivas; 2, más del 80% de células positivas ⁴⁴. Por otro lado, Wang y cols. ²⁵⁶ mostraron que la calificación de GATA3 es altamente variable, debido al porcentaje de células positivas y a la intensidad de tinción. Mostraron que más del 85% de casos GATA3 positivos mostraban expresión en más del 30% de las células tumorales. Sin embargo, no todos ellos tenían la misma intensidad de tinción. Así, concluyeron que los casos GATA3 positivos eran aquellos con una tinción nuclear mayor del 10% de las células tumorales. Cuando nosotros subdividimos los casos de acuerdo al porcentaje de células tumorales e intensidad de tinción, hemos establecido tres grupos: 0, 0-10% de células positivas; 1, 10-80% de células positivas; 2, más del 80% de células GATA3 positivas.

3.3. Extracción de ARN

La extracción de ARN de muestras en fresco fue realizada utilizando el reactivo TRIzol (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), siguiendo el siguiente protocolo: las muestras

en fresco fueron cortadas con un criostato y las secciones fueron homogeneizadas utilizando un homogeneizador polytron (Capitol scientific, Inc., Austin, Texas). Las muestras homogeneizadas fueron lisadas añadiendo 1ml de TRIzol. Posteriormente, se añadieron 200µl de cloroformo, se mezclaron y centrifugaron 10 minutos a 12000g y a 4°C. La fase acuosa, conteniendo el ARN, fue transferida a un nuevo tubo y fue recuperado por precipitación al añadir isopropanol (proporción 1:1). El pellet fue incubado durante 10 minutos a temperatura ambiente y centrifugado durante 5 minutos a 7000g y a 4°C. Posteriormente, fue lavado con 500µl de etanol al 70% y resuspendido en 30µl de agua libre de nucleasas. El ARN resultante fue purificado utilizando el kit RNeasy (Qiagen Inc., Valencia, CA). El ADN contaminante fue digerido incubando con DNase I (RNase-free DNase I Set; Qiagen) durante 15 minutos. Los ARNs fueron cuantificados en el NanoDrop ND-2000 (Thermo Scientific) y almacenados a -80°C.

3.4. Extracción de ADN genómico (ADNg)

La extracción de ADNg de muestras FFIP para el estudio de mutaciones, fue realizada con el kit QIAamp® DNA FFPE Tissue (Qiagen Inc, Valencia, CA, USA), siguiendo el siguiente protocolo: las muestras FFIP fueron cortadas con el micrótopo, realizando 3 cortes de 10µm de espesor cada uno (30µm). A continuación, se llevó a cabo la desparafinación de las muestras; para ello, se añadió 1ml de xilol y se dejó fijar durante 15 minutos, posteriormente, se centrifugó 3 minutos a 13000 rpm. Este paso se repitió dos veces más. Las muestras fueron hidratadas añadiendo 1ml de etanol al 100% y dejando reposar durante 15 minutos, posteriormente se centrifugó durante 3 minutos a 13000 rpm. Este paso se repitió dos veces más. A continuación, se incubaron las muestras a 56°C durante 20 minutos para la evaporación del etanol. Las muestras liofilizadas fueron sometidas a digestión enzimática, resuspendiendo el tejido en 180µl de buffer ATL y 20µl de Proteinasa K, se homogeneizaron en el vórtex y se incubaron a 56°C durante toda la noche y en agitación. Posteriormente, se incubaron durante 1 hora a 90°C, para deshacer las alteraciones que ocasiona el formol en los ácidos nucleicos. Finalmente, se llevó a cabo la extracción del ADN: se añadieron 200µl de buffer AL y 200µl de etanol al 100%, se homogeneizaron las muestras con el vórtex. Se añadió todo el volumen en la columna y se centrifugó a 8000 rpm durante 1 minuto. Se añadieron 500µl del buffer de lavado AW1 y se centrifugó a 8000 rpm 1 minuto. Posteriormente, se añadieron 500µl del buffer de lavado AW2 y se centrifugó a 8000 rpm 1 minuto. Se centrifugó la columna vacía para secar la membrana completamente durante 3 minutos a

13000 rpm. Se añadió agua libre de nucleasas (100µl), se incubó 1 minuto a temperatura ambiente y se centrifugó a 13000 rpm durante 1 minuto. La cuantificación de los ADNs se llevó a cabo en el Qubit® 2.0 (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), utilizando el kit Qubit® dsDNA HS Assay (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA). Los ADNs fueron almacenados a -20°C.

3.5. Micromatrices de expresión génica

Las micromatrices de expresión génica son técnicas de alto rendimiento que se utilizan para el análisis de expresión de miles de genes de forma simultánea, utilizando la intensidad de fluorescencia capturada a través del escaneo de una imagen. La intensidad de cada pixel en el que se divide la imagen se transforma en un número utilizando las herramientas de análisis de imagen adecuadas. En este estudio se ha utilizado la micromatriz Whole Human Genome Microarray (Agilent Technologies, Inc., Santa Clara, CA, USA) (formato 4x44K). Para el análisis de expresión génica se utilizaron 37 muestras LTP en fresco, incluyendo 17 LTAI y 20 LTPNE, y 6 hiperplasias linfoides reactivas ganglionares utilizadas como controles. La extracción del ARN se describe en el apartado 2.3. La purificación, amplificación e hibridación en la micromatriz fue realizada por el Servicio de Microarrays del CNIO, siguiendo las instrucciones del fabricante (Agilent Technologies), que se muestran a continuación. Los datos están disponibles en la base de datos Gene Expression Omnibus (GEO) con el número de acceso GSE36172.

3.5.1. Síntesis de ADNc desde ARN total

Se mezclaron 2µg de ARN total con 2µl del Agilent's Two-Color Spike-in RNA control (diluido 5000 veces) y amplificado utilizando el kit Agilent Low RNA Input Fluorescent Amplification (Agilent Technologies). La mezcla en un volumen final de 6.5µl (concentración total de al menos 5ng/µl) fue mezclada con 5µl del cebador del promotor T7. A continuación, se llevó a cabo la desnaturalización, incubando la reacción a 65°C durante 10 minutos, seguido de 5 minutos en hielo. Seguidamente, se añadieron 8.5µl de ADNc Master Mix (4µl de 5X First strand buffer + 2µl de 0.1M DTT + 1µl de 10mM dNTP mix + 1µl de MMLV-RT + 0.5µl de RNase OUT) y las muestras se incubaron a 40°C en un baño de agua circulante durante 2 horas, y a 65°C durante 15 minutos en un termobloque para inactivar la transcriptasa inversa del virus

de la leucemia murina de Moloney (MMLV-RT). Finalmente, las muestras fueron incubadas en hielo durante 5 minutos.

3.5.2. Síntesis de ARNc fluorescente: transcripción in vitro e incorporación de fluorocromos

En cada tubo se añadieron 2.4µl de 10mM Cyanine 3-CTP (muestra) o 2.4µl de 10mM Cyanine 5-CTP (referencia, Stratagene Universal Human Reference RNA). Seguidamente, a cada muestra se añadieron 57.6µl de Transcription Master Mix (15.3µl de agua libre de nucleasas + 20µl de 4X Transcription buffer + 6µl de 0.1M DTT + 8µl de NTP mix + 6.4µl de 50% PEG + 0.5µl de RNase OUT + 0.6µ de pirofosfatasa + 0.8µl de ARN polimerasa T7) y se incubaron en un baño de agua circulante a 40°C durante 2 horas. Después de la amplificación, cada muestra se evaluó en el NanoDrop ND-2000 para medir el rendimiento.

3.5.3. Hibridación

El ARNc fue preparado de la siguiente manera: 0.75µg del ARNc amplificado marcado con Cy-3 fue mezclado con 0.75µg del ARNc amplificado de referencia marcado con Cy-5, 50µl de los controles 10X y agua libre de nucleasas hasta un volumen final de 240µl. La solución de hibridación fue preparada añadiendo 240µl de 2X target solution y 10µl de buffer de fragmentación 25X. La mezcla fue incubada a 60°C durante 30 minutos en un termobloque. A continuación, se añadieron 250µl de buffer de hibridación 2X (procedente del kit In situ Hybridization). Se añadieron 490µl de esta solución de hibridación a la micromatriz Whole Human Genome y se ensambló en una cámara de hibridación de micromatrices (G2534A). Posteriormente, las cámaras fueron cargadas en los racks del rotor de hibridación y se pusieron a girar a 4 rpm. La hibridación se realizó en un horno rotatorio (10 rpm) a 60°C durante 17 horas.

Las etapas de lavado se realizaron a temperatura ambiente y en oscuridad. En primer lugar, los ensamblajes se sumergieron en la solución de lavado 1, durante 1 minuto con agitación magnética. Los portaobjetos fueron transferidos a la solución de lavado 2 y se lavaron durante 1 minuto. Seguidamente, se sumergieron en acetonitrilo durante 30 segundos. Los portaobjetos secos fueron escaneados con el sistema G2565BA Microarray Scanner System (Agilent Technologies).

3.5.4. Análisis de datos

Una vez que se tiene la señal de expresión bruta de todas las sondas de una micromatriz, es necesario procesarlas y normalizarlas, para eliminar la variabilidad ligada al proceso de hibridación y escaneo de las matrices. La normalización permite corregir las diferencias de distribución de los valores de intensidad en las distintas matrices. Además, es necesario procesar los datos antes de su análisis, para ello es muy habitual utilizar una transformación logarítmica de escala, habitualmente en base 2 (\log_2) de los datos de expresión relativa, que los traslada al rango $(-\infty, +\infty)$, con los valores positivos indicando sobreexpresión y los valores negativos indicando subexpresión²⁵⁷. Es importante tener en cuenta que la cantidad de ARNm transcrito no tiene porque corresponder exactamente con el nivel de expresión del gen asociado, ni con la cantidad de proteína que codifica dicho gen. La tecnología de las micromatrices de expresión, aunque es válida en términos globales, tiene que ser interpretada con cuidado y los datos obtenidos deben ser validados con información procedente de otras fuentes de datos. Los datos se procesaron y analizaron con el programa Feature Extraction (versión 10.7.3.1.) (Agilent Technologies). La normalización, procesamiento y análisis de los datos fue realizada por el grupo de bioinformática del CNIO (<http://combine.bioinfo.cnio.es/>).

3.5.4.1. Análisis de enriquecimiento en grupos de genes (Gene Set Enrichment Analysis (GSEA))

Gene Set Enrichment Analysis (GSEA) (<http://www.broad.mit.edu/gsea>) es un método de cálculo que determina si, a priori, un conjunto predefinido de vías de señalización muestra diferencias estadísticamente significativas entre dos estados biológicos. En esta Tesis Doctoral, el estudio de expresión génica se utilizó para identificar conjuntos de genes relacionados con LTP en comparación con hiperplasias linfoides reactivas ganglionares. Para generar la base de datos de genes se utilizaron Biocarta (<http://www.biocarta.com>) y otras fuentes públicas disponibles a través de la base de datos de firma molecular (MSigDB: <http://www.broad.mit.edu/gsea/msigdb/index.jsp>), incluyendo aquellos más relevantes en la patogénesis de los linfomas y la respuesta inmune. El análisis se realizó con 1000 permutaciones. Se excluyeron los genes con más del 30% de los valores perdidos, y sólo se analizaron los conjuntos de genes que satisfacían los criterios de tamaño

(mínimo=5, máximo=500 genes). Se consideraron significativas las vías de señalización con $p < 0.05$ y $FDR < 0.250$ ²⁵⁸.

3.6. Detección de mutaciones en *KRAS* y *NRAS*

El análisis del estatus mutacional de los exones 2, 3 y 4 de los genes *KRAS* y *NRAS* fue realizado en los casos con expresión de p-ERK. Esto se hizo por amplificación mediante PCR y pirosecuenciación del ADNg.

3.6.1. Detección de mutaciones en *KRAS* mediante PCR en tiempo real (RT-PCR)

Se utilizó el kit cobas® *KRAS* Mutation, que consiste en una amplificación mediante PCR en tiempo real (RT-PCR) del ADN utilizando parejas de cebadores complementarios y dos sondas oligonucleotídicas marcadas con fluorescencia. Los cebadores utilizados definen una secuencia de 85 pares de bases (pb) del exón 2 que contiene los codones 12 y 13 y una secuencia de 75 pb del exón 3 que contiene el codón 61 del gen *KRAS*. La amplificación tiene lugar únicamente en las regiones del gen situadas entre los cebadores. No se amplifica el gen entero. Por otro lado, una de las sondas utilizadas está diseñada para detectar la secuencia de los codones 12/13 del exón 2, y la otra sonda está diseñada para detectar la secuencia del codón 61 en el exón 3 del gen *KRAS*. Las reacciones se corrieron en placas de 96 pocillos con un volumen final de 25µl, utilizando 100ng de ADNg, 10µl de MasterMix, 10µl del cebador *KRAS* 12/13 o *KRAS* 61 y 6µl de acetato de magnesio (MGAC). Todos los análisis se realizaron en el sistema cobas® 4800 RT-PCR system (Roche Applied Science), de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Cada placa contiene un control de mutación, un control negativo y un calibrador para confirmar la validez del análisis. Los casos no mutados se analizaron por pirosecuenciación.

3.6.2. Detección de mutaciones en *KRAS* y *NRAS* mediante RT-PCR y pirosecuenciación

Se utilizó el kit thetascreen *KRAS/NRAS* Pyro (Qiagen). Las reacciones se corrieron en placas de 24 pocillos con un volumen final de 25µl, utilizando 10ng de ADNg, 12.5µl de MasterMix 2X PyroMark, 1µl del cebador 12/13 o del cebador 61, 2.5µl de CoralLoad concentrado 10X y 4µl de agua. Las reacciones se incubaron en un termociclador a 95°C durante 10 minutos, seguido de 42 ciclos de amplificación (95°C

durante 20 segundos, 53°C durante 30 segundos y 72°C durante 20 segundos) y finalmente durante 5 minutos a 72°C. Después de la amplificación, se añadieron 70µl de la MasterMix para inmovilizar el ADN (2µl de estreptavidina sefarosa, 40µl del buffer de unión PyroMark y 28µl de agua) a 10µl del producto de PCR biotinilado, se agitó la placa durante 15 minutos a 1400 rpm y a temperatura ambiente. Los productos de PCR fueron procesados de acuerdo con las instrucciones del fabricante en un ensayo de pirosecuenciación en un sistema PyroMark Q24 (Qiagen). Los casos no mutados se analizaron utilizando un ensayo de pirosecuenciación usando RAS Extension Pyro Primers (Qiagen).

3.6.3. Detección de mutaciones en *KRAS* y *NRAS* mediante RT-PCR y pirosecuenciación con el ensayo RAS Extension Pyro

Se utilizó el kit RAS Extension Pyro Primers (Qiagen) para el estudio de mutaciones en los exones 3 y 4 de los genes *KRAS* y *NRAS*. Las seis regiones (codones 58/59, 117 y 146) fueron amplificadas separadamente por PCR y secuenciadas a través de una región definida. Las reacciones se corrieron en placas de 24 pocillos con un volumen final de 25µl, utilizando 10ng de ADNg, 12.5µl de MasterMix 2X PyroMark PCR, 1µl del cebador 58/59 o del cebador 117 o del cebador 146 de *KRAS* o *NRAS*, 2.5µl de CoralLoad concentrado 10X y 4µl de agua. Las reacciones se incubaron en un termociclador a 95°C durante 15 minutos, seguido de 42 ciclos de amplificación (95°C durante 20 segundos, 53°C durante 30 segundos y 72°C durante 20 segundos) y finalmente durante 5 minutos a 72°C. Después de la amplificación, se añadieron 70µl de la MasterMix para inmovilizar el ADN (2µl de estreptavidina sefarosa, 40µl del buffer de unión PyroMark y 28µl de agua) a 10µl del producto de PCR biotinilado, se agitó la placa durante 15 minutos a 1400 rpm y a temperatura ambiente. Los productos de PCR fueron procesados de acuerdo con las instrucciones del fabricante en un ensayo de pirosecuenciación en un sistema PyroMark Q24 (Qiagen).

3.7. Detección de mutaciones en los genes *RHOA* y *PLCG1* por PCR cuantitativa (qPCR)

3.7.1. Detección de las mutaciones por discriminación alélica mediante qPCR

Para identificar la presencia de las mutaciones se utilizaron ensayos qBiomarker Somatic Mutation PCR Assay, que fueron diseñados y validados por SABioscience-Qiagen para nuestro grupo. Se trata de un método semi-cuantitativo que tiene una sensibilidad suficiente para detectar la presencia de mutaciones por debajo del 10% en muestras FFIP. Todos los análisis se realizaron en el termociclador 7500 Fast RT-PCR system, utilizando el programa 7500 program (versión 2.0.6.) (Applied Technologies). Las reacciones se corrieron por duplicado en placas de 96 pocillos con un volumen final de 10 μ l, usando 20ng de ADNg, 5 μ l de qBiomarker Probe Master Mix y 0.4 μ l de qBiomarker somatic Mutation PCR Assay (conteniendo o no la mutación), utilizando el programa: 95°C durante 10 minutos, seguido de 40 ciclos de amplificación de 95°C durante 15 segundos y 60°C durante 60 segundos. En todos los ensayos se incluyeron controles positivos y negativos. El umbral de detección se fijó en 0.05. Los valores Ct se calcularon para todos los ensayos de los alelos mutados. Esto representa la cantidad de alelo mutado específico que se detecta en cada muestra. Las muestras se consideraron positivas para la mutación cuando Δ Ct (Ct mutado – Ct referencia) < 5. Los casos con valores Ct de la referencia mayores de 35 no se consideraron valorables.

3.7.2. Detección de la mutación S345F en el gen *PLCG1* por PCR a tiempo real combinada con LNA (locked-nucleic-acid)

Todos los análisis se realizaron en el termociclador LightCycler 480 system, (Roche Ciencias Aplicadas, Indianapolis, IN). Las reacciones se prepararon en un volumen final de 20 μ l conteniendo: tampón de reacción 1X, 0.5 unidades de LightCycler® FastStart Taq polimerasa 10X (Roche Applied Science, Indianapolis, IN), 50ng de ADN, 0,4mM de cada cebador de PCR (Fw: 5'-TGACCATACCTACCTGCCTCT-3'; Rv: 5'-CACTGGGGAGCAACATCA-3'), MgCl₂ 2,5mM, 0,2 μ M *sensor* (5'-LCRed640- GGACTCACTGAAGAACTGGTCCC -PH), 0,2 μ M *anchor* (5'-GCAGCGAGCATAGGCTTCCAAGG-FL), y 2 μ M del oligonucleótido que contiene LNA-nativo-específico (5'-TCACTGGAGAACTG-NH₂). Las sondas fueron diseñadas por TIB- Molbiol (Berlín, Alemania)²³. Las reacciones se incubaron en el LightCycler II (Roche Applied Science) a 95°C durante 10 minutos para activar la Taq polimerasa, seguido de 45 ciclos de amplificación a 95°C durante 10 segundos, 60°C durante 10 segundos, y 72°C durante 15 segundos. Tanto el sensor

como el anchor de LNA están fosforilados en el extremo 3' de modo que no pueden funcionar como cebadores.

Inmediatamente después de los ciclos de amplificación, los productos de la PCR fueron desnaturalizados a 95°C y después a 40°C para permitir la hibridación con las sondas marcadas con fluorescencia. La temperatura se aumentó luego a 75°C a una velocidad de 0,11°C/s. La sonda de sensor nativo se disocia de la mutante después (a una temperatura más alta). La disociación de la sonda de sensor termina la transferencia de energía de resonancia de fluorescencia entre el sensor y el anchor, que se registra de forma automática por el instrumento. Los resultados fueron analizados utilizando el software LightCycler™ 3.5 (Roche Ciencias Aplicadas, Indianapolis, IN).

3.7.3. Detección de las mutaciones por secuenciación de Sanger

Para confirmar los resultados mutacionales obtenidos, se analizaron los casos para detectar las mutaciones mediante amplificación de la región genómica y secuenciación capilar. Para ello, se diseñaron cebadores, para cada tipo de mutación, con el programa Primer3 (<http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/primer3>). Posteriormente se chequearon con el programa UCSC Genome Browser PCR *in silico*. Los datos se analizaron utilizando el programa bioinformático Chromas (versión 2.4.1.). En la Tabla 4, se muestran las secuencias 5`-3` de los cebadores forward y reverse, respectivamente, para las mutaciones estudiadas en los genes *RHOA* y *PLCG1*.

Tabla 4. Primers diseñados (programa Primer3) para la validación, mediante secuenciación de Sanger, de las mutaciones estudiadas (aa=aminoácido; nt=nucleótido).

Gen	Cambio nt	Cambio aa	Forward	Reverse
<i>RHOA</i>	c.50G>T	p.G17V	CCAAAGCATGTGTCATCCTG	GGAAGTGGTCCTTGCTGAAG
<i>PLCG1</i>	c.1034T>C	p.S345F	GGCCATCTGACCATACCTA	GGGGAGCAACATCACCAT

3.8. Secuenciación de última generación (NGS) mediante Ion Torrent

3.8.1. Diseño del panel de genes a estudiar

Para el diseño del panel, se utilizaron las bases de datos KEGG (<http://www.genome.jp/kegg/>) y BioCarta, y datos previamente publicados en linfomas

T. Se incluyeron 48 genes involucrados en la vía de señalización de TCR, así como vías relacionadas como NF- κ B, JAK/STAT, PI3K y MAPK, entre otras (Tabla 5). Las secuencias exónicas de los genes seleccionados se extrajeron mediante el programa UCSC Genome Browser (<http://genome.ucsc.edu/>). Las coordenadas de las secuencias genómicas se basaron en el NCBI Build 37 (UCSC hg19). Se utilizó la herramienta de diseño Ion AmpliSeq™ Custom panel Designer (Life Technologies) (<https://www.ampliseq.com/browse.action>) para diseñar los cebadores para el kit Ion AmpliSeq™ Library (Life Technologies). El resultado del diseño consistió en dos grupos de cebadores, con un total de 1591 amplicones. El tamaño medio de amplicón fue de 175 pb.

Tabla 5. Genes analizados mediante la herramienta AmpliSeq y el secuenciador Ion Proton.

<i>AKT2</i>	<i>IDH2*</i>	<i>PAK7</i>	<i>RHOA*</i>
<i>BANK1</i>	<i>IL6ST</i>	<i>PASK</i>	<i>SOCS5</i>
<i>BCOR</i>	<i>ITGAM</i>	<i>PDCD1</i>	<i>SPI1</i>
<i>CARD11</i>	<i>JAK1*</i>	<i>PIK3C2B</i>	<i>STAT1</i>
<i>CCR4</i>	<i>JAK3*</i>	<i>PIK3CA</i>	<i>STAT3*</i>
<i>CD36</i>	<i>KRAS</i>	<i>PIK3R1</i>	<i>STAT5A</i>
<i>CD79A</i>	<i>LPL*</i>	<i>PLCG1</i>	<i>TBK1</i>
<i>CSF2RB</i>	<i>MAP3K14</i>	<i>PTEN</i>	<i>TET2</i>
<i>CYLD</i>	<i>MAP3K5</i>	<i>RASA1</i>	<i>TNFRSF21</i>
<i>DNMT3A*</i>	<i>MAPK14</i>	<i>RB1</i>	<i>TP53*</i>
<i>FAS</i>	<i>NLRP2</i>	<i>RC3H1</i>	<i>TRAF3</i>
<i>GLI3</i>	<i>NRAS</i>	<i>RELB</i>	<i>TRAF6</i>
* Regiones específicas			

3.8.2. Cualificación y cuantificación del ADNg mediante RT-PCR

Para realizar secuenciación NGS es necesario que el ADN tenga buena calidad. Debido a que los métodos de cuantificación de ADN, incluyendo espectrometría y fluorimetría, no diferencian entre ADN amplificable o no amplificable, la cualificación y cuantificación del ADNg fue realizada utilizando el kit KAPA Human Genomic DNA Quantification and QC (KAPA Biosystems), que determina la fracción amplificable del ADN presente en una muestra. Este sistema utiliza tres ensayos de qPCR, generando tamaños de amplicón de 41 pb, 129 pb y 305 pb. En primer lugar, las muestras fueron diluidas en una solución con Tris-HCl 10mM pH8 y 0.05% Tween 20, hasta estar en el

rango dinámico de 0.1-1ng/μl. A continuación, se llevó a cabo la PCR en tiempo real utilizando 2μl de muestra diluída o de los estándares, 6μl de la mix KAPA (KAPA SYBR® FAST qPCR máster mix 2X + cebador premix (41, 129 o 305 pb)), 0.2μl ROX low 50X y 1.8μl agua libre de nucleasas. Las reacciones fueron incubadas por triplicado en placas de 96 pocillos, a 95°C durante 3 minutos, seguido de 40 ciclos de 10 segundos a 95°C y 30 segundos a 62°C. Para llevar a cabo esta técnica, se utilizó el sistema 7500 Real Time System (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Los datos fueron analizados utilizando el archivo disponible en la web (<http://www.kapabiosystems.com/product-applications/products/next-generation-sequencing-2/hgdn-quantification/>), en el que se calcula el valor ΔC_t para cada muestra (C_t muestra – C_t referencia).

3.8.3. Construcción de librerías de ADN

Una vez testada la calidad del ADN de las muestras, se construyeron las librerías, utilizando 30ng de ADNg, dos grupos de cebadores AmpliSeq para cada muestra y el kit Ion AmpliSeq™ Library (Life Technologies). En primer lugar, se llevó a cabo una amplificación por PCR: 2μl Ion AmpliSeq HiFi mix 5X, 5μl Ion AmpliSeq Primer (grupo 1 o 2) y 3μl ADNg. Las reacciones fueron incubadas a 99°C durante 2 minutos, seguido de 20 ciclos de 15 segundos a 99°C y 4 minutos a 60°C. De esta manera, se hibridaron los cebadores de los genes a estudio con el ADNg. A continuación, se añadió a cada muestra amplificada 0.9μl de FuPa para la digestión de los cebadores. Las reacciones fueron incubadas a 55°C durante 10 minutos, seguido de 10 minutos a 55°C, 20 minutos a 60°C y 60 minutos a 10°C. Posteriormente, se llevó a cabo la preparación de las librerías de los adaptadores, los cuales proporcionan las secuencias de hibridación necesarias para la posterior amplificación y secuenciación de los fragmentos de la librería, para ello se añadieron 2μl Ion P1 Adapter, 2μl del correspondiente Ion Xpress™ Barcode (1-32) y 4μl de agua libre de nucleasas. Una vez hecho esto, se llevó a cabo la ligación de las secuencias adaptadoras a los amplicones: a los productos de PCR anteriores se les añadió 1μl de la librería de los adaptadores, 2μl de la solución Switch y 1μl de DNA Ligase. Las reacciones fueron incubadas durante 60 minutos a 22°C, seguido de 10 minutos a 72°C y 60 minutos a 10°C. A continuación, se purificó la librería creada con bolas magnéticas, para ello se añadieron 22.5μl de Agencourt AMPure XP y se incubó a temperatura ambiente durante 5 minutos para que las bolas capturasen el ADN; se pusieron en una placa magnética durante 2 minutos y se

hicieron dos lavados con 150µl de etanol al 70% para limpiar las bolas. Se retiró el etanol y se dejaron secar durante 5 minutos a temperatura ambiente. Finalmente se añadieron 25µl de TE-low, se incubaron 2 minutos en la placa magnética y se recuperó el sobrenadante conteniendo la librería en tubos limpios.

3.8.3.1 Cuantificación de las librerías por qPCR

Una vez obtenidas las librerías, se cuantificaron mediante qPCR para poder normalizarlas y obtener librerías con la misma concentración para que haya equimolaridad entre muestras, utilizando el kit Library Quantitation kit (Life Technologies). Para ello, se realizaron diluciones seriadas (1/5, 1/10, 1/100) de las librerías. Las muestras se analizaron por triplicado en un volumen final de 20µl. En todos los ensayos se incluyeron controles negativos y estándares. Para cada muestra, control y estándar se mezclaron 10µl de la MasterMix TaqMan 2X, 1µl del ensayo Ion TaqMan 20X y 15µl de agua libre de nucleasas. Se dispensaron 15µl por pocillo en una placa de 96 pocillos. A continuación, se añadieron 5µl de cada librería diluida, control o estándar a cada pocillo. Las reacciones fueron incubadas a 50°C durante 2 minutos, seguido de 20 segundos a 95°C, y 40 ciclos de 1 segundo a 95°C y 20 segundos a 60°C. Para llevar a cabo esta técnica, se utilizó el sistema StepOne™ System (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). De acuerdo a la cuantificación de cada librería, el cálculo del factor de dilución fue realizado para que cada librería estuviera en 50pM para realizar la PCR en emulsión. La cuantificación de las librerías fue realizada por la empresa NIMGenetics.

3.8.4. PCR en emulsión (ePCR) y enriquecimiento

Una vez que se han cuantificado las librerías, aquellas con un rendimiento óptimo fueron utilizadas en la secuenciación. Las librerías diluidas fueron combinadas para poder secuenciar en un mismo chip hasta 32 muestras. Esto se puede realizar ya que en la construcción de las librerías se utilizó un Ion Xpress™ Barcode diferente por muestra. Para llevar a cabo esta combinación, se dispensaron 25µl de la combinación de librerías en un tubo Ion Chef™. Para llevar a cabo la ePCR y el enriquecimiento se utilizó el kit Ion PI™ Hi-Q™ Chef y el sistema Ion Chef™ system (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), siguiendo las instrucciones del fabricante. Las librerías se incluyen en una emulsión óleo-acuosa, la cuál contiene microesferas (Ion

Sphere Particles, ISPs) con oligonucleótidos complementarios que unen de forma selectiva las secuencias adaptadoras hibridadas a los extremos de los amplicones. Tiene además todos los reactivos necesarios para llevar a cabo una PCR. Se crean las condiciones para que en cada microesfera hibride idealmente una única molécula de librería. Tras el proceso de ePCR, el resultado son microesferas conteniendo los fragmentos amplificados de las librerías. Aquellas microesferas vacías fueron eliminadas tras sucesivos lavados, durante el proceso de enriquecimiento, basado en la captura de bolas magnéticas recubiertas de estreptavidina de las microesferas con librerías, gracias al extremo 5' biotinilado que éstas presentan. Finalmente, todas las microesferas unidas a los fragmentos de ADN se depositaron en los micropocillos de un chip semiconductor donde se realizará la secuenciación. Esta técnica fue realizada por la empresa NIMGenetics.

3.8.5. Secuenciación

Durante la secuenciación, el equipo añade los nucleótidos de forma secuencial. Si un nucleótido es complementario a la cadena molde, la polimerasa extiende la hebra existente de ADN mediante la adición de nucleótido(s) y se libera una molécula de pirofosfato y un protón de hidrógeno. Este protón cambia el pH de la solución, siendo este cambio proporcional al número de nucleótidos que se han unido (0.02 unidades de pH por nucleótido añadido). Este cambio lo detecta un sensor colocado bajo cada pocillo, que lo convierte a voltaje y lo digitaliza. Después de cada adición de nucleótidos, se hace un lavado antes de añadir otro. La uniformidad en la cobertura es elevada, con más del 90% de las bases cubiertas con una profundidad de 500X. La secuenciación fue realizada por la empresa NIMGenetics.

3.8.6. Análisis de datos

Las lecturas obtenidas con el secuenciador se procesaron y analizaron con diferentes plataformas, las cuales llevan a cabo los análisis primario (conversión de la señal detectada a bases), secundario (transformación de las bases a alineamientos) y terciario (anotación de las variantes). En primer lugar, utilizando el programa Torrent SuiteTM, se eliminaron de las secuencias los adaptadores usados durante la fase de preparación de las librerías, así como los índices que identifican las distintas muestras. A continuación, se alinearon las secuencias leídas con el genoma de referencia NCBI

Build 37 (UCSC hg19), mediante el programa *TMAP-Ion-Alignment*, y se identificaron las variantes somáticas mediante el algoritmo Variant Caller. Utilizando el programa Ion Reporter (Life Technologies), el cual proporciona información sobre cada muestra analizada, se anotaron las variantes. Los archivos BAM (Binary Alignment Map) fueron visualizados utilizando el programa Integrated Genome Viewer (IGV v.2.3; Broad Institute). Las mutaciones somáticas fueron filtradas, excluyendo: 1, variantes nucleótídicas únicas (SNV) sinónimas; 2, SNV que ocurren en regiones intrónicas; 3, variantes presentes en sólo una lectura unidireccional; 4, variantes que ocurren en regiones genómicas repetitivas; 5, variantes con menos de 5 lecturas de secuenciación; 6, variantes con una frecuencia alélica en el alelo mutado (MAF) menor a 0.05; 7, variantes con una profundidad de cobertura menor a 30X; 8, variantes conocidas presentes en la base de datos de polimorfismos de nucleótido simple (dsSNP). Las variantes detectadas fueron revisadas manualmente. Además, fueron chequeadas con la base de datos COSMIC (Catálogo de mutaciones somáticas en cáncer) para identificar posibles cambios patogénicos. Finalmente, la interpretación clínica de las variantes fue analizada con tres programas predictores *in silico* de patogeneidad mutacional (SIFT, PolyPhen-2 e InterVar).

3.8.7. Validación de las mutaciones

Las variantes encontradas fueron validadas de forma independiente mediante una nueva carrera de secuenciación, debido a la baja carga mutacional de alguna de ellas (<10%).

3.9. Análisis estadístico

La asociación entre las variables categóricas se realizó utilizando la prueba de contingencia de chi-cuadrado con corrección de Yates o la prueba exacta de Fisher, según correspondía. La supervivencia asociada a enfermedad se define como el período comprendido entre la fecha del diagnóstico hasta la muerte por el tumor. La supervivencia total, desde la fecha de diagnóstico hasta la fecha de muerte, independientemente de la causa de la misma. La supervivencia libre de enfermedad se define como el tiempo transcurrido desde la fecha de remisión completa tras tratamiento hasta la recidiva. Los análisis de supervivencia de Kaplan-Meier se llevaron a cabo para la supervivencia específica del linfoma, utilizando la prueba de largo rango para

examinar las diferencias entre los grupos. También se realizó un modelo de regresión de Cox multivariante. Las estimaciones se consideraron estadísticamente significativas cuando el $p < 0.05$. Todos los análisis se realizaron con el programa SPSS 20.0 (SPSS, Inc., Chicago, IL).

RESULTADOS I

Identificación de una firma molecular de expresión génica revelando rutas de señalización importantes en la patogenia de los LTP.

4.1. Firma molecular de expresión génica en LTP

Como se comenta en la Introducción, diferentes estudios de expresión génica han puesto de manifiesto la existencia de diferentes perfiles moleculares en los diferentes subtipos de LTP. Decidimos analizar un perfil de expresión génica comparando muestras de los subtipos de LTP más comunes en nuestro entorno (LTAI y LTPNE) y muestras procedentes de tejido linfoide reactivo. Los datos de expresión mediante micromatrices, mostraron una expresión estadísticamente significativa ($p < 0.005$ y $FDR < 0.250$) de 24 vías de señalización en las muestras de LTP (Tabla 6), incluyendo las vías de ERK ($p = 0.014$ y $FDR = 0.033$), ciclo celular ($p < 0.001$ y $FDR = 0.051$) y C-MYC ($p = 0.016$ y $FDR = 0.046$), entre otras.

En este estudio, la correlación de Pearson nos permitió identificar que en el grupo de casos diagnosticados de LTP con expresión alta de Ki-67, se encontraba sobreexpresada la vía de señalización de C-MYC ($p < 0.001$ y $FDR < 0.001$) (Tabla 7). Por otro lado, los pacientes con expresión de C-MYC, pero no alta expresión de Ki-67, mostraron asociación con la vía de ERK ($p = 0.053$ y $FDR = 0.274$) (Tabla 8). Las muestras con expresión nuclear de ERK se correlacionaron significativamente con las vías de señalización de TCR ($p < 0.001$ y $FDR < 0.001$), linfocitos Th del centro germinal ($p < 0.001$ y $FDR = 0.014$), BCL-6 ($p = 0.023$ y $FDR = 0.062$) y C-MYC ($p = 0.035$ y $FDR = 0.111$), entre otras (Tabla 9).

Tabla 6. Perfil de expresión génica, comparando 37 muestras LTP y 6 muestras procedentes de tejido linfoide reactivo, analizado con el programa GSEA. En muestras de LTP, 58 de 80 vías de señalización estaban sobre-expresadas. Veinticuatro de 58 vías de señalización fueron significativas con un FDR<0.250 y 13/58 fueron significativas con un p-valor<0.05. Por otro lado, en hiperplasias linfoides reactivas ganglionares, 22/80 vías de señalización fueron significativas. Cinco de 22 tuvieron p<0.05 y 3/5 fueron significativas con un FDR<0.250.

Perfil de expresión de casos LTP			
	Vías de señalización	p-valor	FDR
1	CDK5	0.000	0.000
2	Dianas de XBP1	0.000	0.006
3	ERK	0.014	0.033
4	RAC y CDC	0.000	0.028
5	Ciclo celular	0.000	0.051
6	Dianas de C-MYC	0.016	0.046
7	Proteasoma	0.015	0.049
8	Glicolisis	0.020	0.057
9	PI3K	0.025	0.117
10	RAC1	0.029	0.108
11	Fosfatidilinositol	0.000	0.106
12	STAT3	0.089	0.149
13	KRAS2	0.000	0.152
14	Células estromales del centro germinal	0.088	0.196
15	G2	0.063	0.187
16	CXCR4	0.033	0.179
17	IGF1	0.103	0.170
18	AKT	0.063	0.172
19	PLC	0.091	0.224
20	FAS	0.058	0.216
21	MET	0.068	0.211
22	P53 Hipoxia	0.091	0.222
23	VEGF	0.103	0.246
24	Genes sobre-regulados por MYC	0.078	0.246
25	mTOR	0.092	0.258
26	Homeobox	0.118	0.266
Perfil de expresión de tejido linfoide reactivo			
	Vías de señalización	p-valor	FDR
1	Células T colaboradoras del centro germinal	0.000	0.147
2	Células B del centro germinal	0.000	0.101
3	Complejo de Histocompatibilidad II	0.000	0.141
4	Resto de células dendríticas	0.000	0.336
5	Señalización por calcio células T y B	0.036	0.404
6	Células dendríticas foliculares	0.125	0.269
7	Células madre linfoides	0.205	0.483

Tabla 7. Perfil de expresión génica de los casos LTP con expresión alta de Ki-67. En las muestras de LTP, 35 de 79 vías de señalización estaban sobre-reguladas en los casos Ki-67 positivos. Doce de 35 vías de señalización fueron significativas con un FDR<0.250 y 10/35 fueron significativas con un p-valor<0.05. Por otro lado, 44/79 vías de señalización fueron sobre-expresadas en los casos Ki-67 negativos. Veintidós de 44 vías de señalización fueron significativas con un FDR<0.250 y 19/44 fueron significativas con un p-valor<0.05. Los datos del perfil de expresión fueron analizados con el programa GSEA utilizando la correlación de Pearson.

Perfil de expresión de casos LTP Ki-67 positivo			
	Vías de señalización	p-valor	FDR
1	Dianas de C-MYC	0.000	0.000
2	Genes sobre-regulados por MYC	0.000	0.000
3	Proteasoma	0.000	0.000
4	G2	0.015	0.002
5	G1	0.000	0.007
6	CDC25	0.000	0.006
7	Dianas de Blimp-1	0.000	0.007
8	Ciclo celular	0.000	0.007
9	Polycomb	0.000	0.010
10	Apoptosis	0.014	0.089
11	RAC y CDC	0.081	0.166
12	Glicolisis	0.089	0.243
13	Caspasas	0.085	0.262
Perfil de expresión de casos LTP Ki-67 negativo			
	Vías de señalización	p-valor	FDR
1	Células madre linfoides	0.000	0.000
2	Resto de células dendríticas	0.000	0.000
3	KRAS2	0.000	0.000
4	Estromal	0.000	0.000
5	Dianas de IRF3	0.000	0.000
6	Complejo de Histocompatibilidad II	0.000	0.006
7	Homeobox	0.000	0.023
8	Células madre	0.000	0.031
9	Células dendríticas foliculares	0.026	0.040
10	Dianas de BCL-6	0.000	0.048
11	CD40	0.000	0.053
12	Hipermutación somática (SHM)	0.000	0.057
13	Células T reguladoras	0.000	0.074
14	P53 hipoxia	0.026	0.079
15	Notch	0.044	0.100
16	GSK3	0.000	0.130
17	Matriz extracelular (ECM)	0.121	0.162
18	Diferenciación células T CD8	0.059	0.163
19	Señalización por calcio células T y B	0.000	0.241
20	CCR5	0.111	0.243
21	CXCR4	0.095	0.249
22	MET	0.094	0.250
23	IFN	0.146	0.260

Tabla 8. Perfil de expresión génica de los casos diagnosticados de LTP con expresión de C-MYC. En las muestras de LTP, 54 de 79 vías de señalización estaban sobre-expresadas en los casos C-MYC positivos. Doce de 54 vías de señalización fueron significativas con un FDR<0.250 y 13/54 fueron significativas con un p-valor<0.05. Por otro lado, 25/79 vías de señalización fueron sobre-expresadas en los casos C-MYC negativos. Quince de 25 vías de señalización fueron significativas con un FDR<0.250 y 12/25 fueron significativas con un p-valor<0.05. Los datos del perfil de expresión fueron analizados con el programa GSEA utilizando la correlación de Pearson.

Perfil de expresión de casos LTP C-MYC positivo			
	Vías de señalización	p-valor	FDR
1	Dianas de C-MYC	0.000	0.000
2	Genes sobre-regulados por MYC	0.000	0.000
3	Proteasoma	0.000	0.000
4	Dianas de Blimp-1	0.015	0.002
5	G2	0.000	0.037
6	CDC25	0.015	0.092
7	CREB	0.013	0.079
8	Ciclo celular	0.014	0.073
9	RAC y CDC	0.029	0.083
10	Glicolisis	0.014	0.131
11	G1	0.015	0.127
12	TNFR2	0.014	0.162
13	Polycomb	0.012	0.282
14	ERK	0.053	0.274
Perfil de expresión de casos LTP C-MYC negativo			
	Vías de señalización	p-valor	FDR
1	Células madre linfoides	0.000	0.000
2	Estromal	0.000	0.026
3	Dianas de IRF3	0.000	0.017
4	Resto de células dendríticas	0.000	0.025
5	Células T reguladoras	0.000	0.026
6	KRAS2	0.000	0.036
7	Células madre	0.000	0.149
8	Homeobox	0.000	0.023
9	CD40	0.000	0.179
10	Células T colaboradoras del centro germinal	0.000	0.211
11	Citoquinas	0.000	0.338
12	Células B del centro germinal	0.000	0.449
13	Complejo de Histocompatibilidad II	0.056	0.165
14	Células dendríticas foliculares	0.067	0.156
15	Dianas de BCL-6	0.073	0.171
16	Matriz extracelular (ECM)	0.083	0.162
17	Hipermutación somática (SHM)	0.111	0.167
18	Fosfatidilinositol	0.167	0.421

Tabla 9. Perfil de expresión génica de los casos LTP con expresión de p-ERK. En las muestras de LTP, 69 de 79 vías de señalización estaban sobre-expresadas en los casos ERK positivos. Treinta y dos de 69 vías de señalización fueron significativas con un FDR<0.250 y 20/32 fueron significativas con un p-valor<0.05. Por otro lado, 10/79 vías de señalización fueron sobre-expresadas en los casos ERK negativos. Una de 10 vías de señalización fueron significativas con un FDR<0.250 y 2/10 fueron significativas con un p-valor<0.05. Los datos del perfil de expresión fueron analizados con el programa GSEA utilizando la correlación de Pearson.

Perfil de expresión de casos LTP ERK positivo			
	Vías de señalización	p-valor	FDR
1	TCR	0.000	0.000
2	Señalización por calcio células T y B	0.000	0.000
3	Proteasoma	0.000	0.000
4	Citoquinas	0.000	0.001
5	CDC42/RAC	0.000	0.003
6	Dianas de Blimp-1	0.000	0.002
7	Células T colaboradoras del centro germinal	0.000	0.014
8	TNFR2	0.010	0.039
9	NF-κB alternativa	0.004	0.041
10	CD40	0.000	0.045
11	AKT	0.017	0.048
12	Muerte	0.012	0.049
13	RelA	0.013	0.060
14	Dianas de BCL-6	0.023	0.062
15	Caspasas	0.025	0.069
16	Tall1	0.035	0.077
17	Diferenciación células T CD8	0.001	0.087
18	PLC	0.052	0.111
19	Células B del centro germinal	0.001	0.111
20	Dianas de C-MYC	0.035	0.111
21	Notch	0.051	0.107
22	Toll	0.024	0.102
23	IFN	0.074	0.136
24	Complejo de Histocompatibilidad II	0.064	0.146
25	NF-κB clásica	0.075	0.160
26	CCR5	0.099	0.179
27	TGFβ	0.094	0.186
28	RHO	0.089	0.226
29	GSK3	0.096	0.220
30	Apoptosis	0.108	0.219
31	BCR	0.095	0.214
32	mTOR	0.113	0.209
33	PTEN	0.170	0.271
Perfil de expresión de casos LTP ERK negativo			
	Vías de señalización	p-valor	FDR
1	Homeobox	0.002	0.083
2	KRAS2	0.012	0.377
3	Células madre	0.103	0.593
4	Resto de células dendríticas	0.274	0.790

4.2. Expresión de p-ERK, Ki-67 y C-MYC en LTP

Para validar los resultados encontrados en el perfil de expresión génica, decidimos caracterizar la expresión de p-ERK, Ki-67 y C-MYC en muestras de pacientes con LTP, para ello realizamos inmunohistoquímica en los TMA's construidos con 135 muestras FFIP. El punto de corte para determinar la positividad de expresión de estas proteínas se muestra en la Tabla 3. Los resultados fueron considerados valorables en 129/135 muestras (75 LTAI y 54 LTPNE), por lo que el análisis estadístico se llevó a cabo con ese número de muestras FFIP. La expresión nuclear de p-ERK fue encontrada en un 34.9% (45/129) de las células tumorales, C-MYC se encontró en un 13.2% (17/129) y un alto nivel de expresión de Ki-67 se encontró en un 24% (31/129) de los casos analizados (Figura 3). La naturaleza tumoral de las células se comprobó mediante una tinción doble p-ERK/PD-1 en todos los casos incluidos en los TMA's.

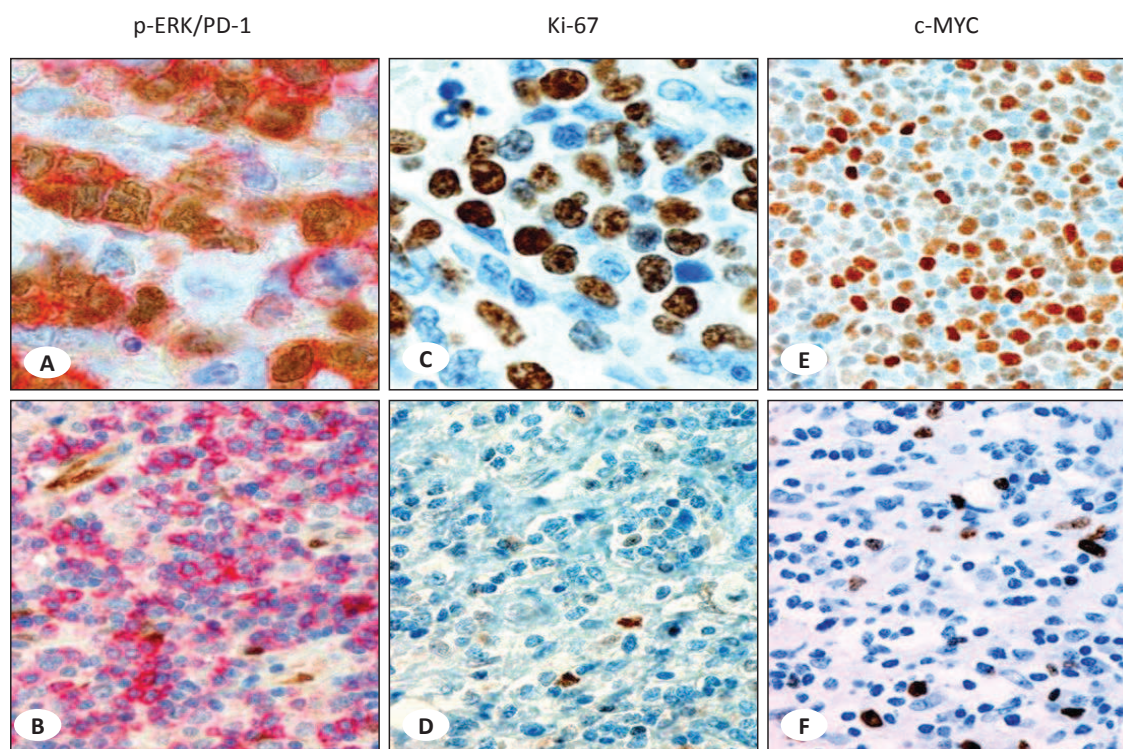


Figura 3. Figura representativa de la expresión de p-ERK, Ki-67 y C-MYC. **A)** Caso de LTAI expresando p-ERK (marrón) y PD-1 (rojo) en las células tumorales. **B)** Caso LTP negativo para p-ERK. **C)** Caso LTP mostrando alto nivel de expresión de Ki-67. **D)** Caso con bajo índice de proliferación Ki-67. **E)** Caso positivo para C-MYC. **F)** Caso negativo para C-MYC.

Se observó una correlación estadísticamente significativa entre la expresión de p-ERK en las células tumorales y Ki-67 (16/31 casos p-ERK positivos expresaron Ki-67, $p=0.027$) y C-MYC (14/17 casos p-ERK positivos expresaron C-MYC, $p<0.001$). Además, 11/31 casos con un alto índice de proliferación Ki-67 expresaron C-MYC ($p<0.001$). La expresión nuclear de p-ERK se observó más frecuentemente en los casos diagnosticados de LTAI (32/75, 42.7%) que en los LTPNE (13/54, 24.1%) ($p=0.029$) (Tabla 10). Estos datos fueron sugeridos por el estudio Pearson usando los resultados del perfil de expresión génica (Tabla 9).

Además, los tumores de los pacientes con alto PIT o ECOG mostraron un elevado porcentaje de expresión de C-MYC ($p=0.001$ y 0.008 , respectivamente) (Tabla 11). Sin embargo, no encontramos correlación significativa entre la expresión de p-ERK o Ki-67 y los parámetros clínicos estudiados (Tablas 10 y 12, respectivamente).

Cuando subdividimos los casos estudiados por subtipo histológico, encontramos en el grupo de pacientes LTPNE una correlación significativa entre la expresión nuclear de p-ERK en las células tumorales y la expresión de C-MYC (4/6 casos p-ERK positivos expresaron C-MYC, $p=0.010$) y Ki-67 (8/14 casos p-ERK positivos expresaron Ki-67, $p=0.001$). Por otro lado, en el subgrupo de pacientes LTAI, encontramos una correlación significativa entre la expresión de p-ERK en las células tumorales y C-MYC (10/11 casos p-ERK positivos expresaron C-MYC, $p=0.001$); sin embargo, no encontramos significancia estadística con Ki-67 ($p=0.677$). Además, 6/17 casos LTAI con un alto índice proliferativo Ki-67 expresaron C-MYC ($p=0.007$).

Tabla 10. Análisis univariante de los parámetros clínicos de 129 pacientes con LTP con respecto a la expresión de p-ERK.

	Casos totales	p-ERK negativo	p-ERK positivo	p-valor
Diagnóstico LTAI LTPNE	129/129	43/75 (57.3%) 41/54 (75.9%)	32/75 (42.7%) 13/54 (24.1%)	0.029
Sexo Hombre Mujer	129/129	46/75 (61.3%) 38/54 (70.4%)	29/75 (38.7%) 16/54 (29.6%)	0.288
Edad al diagnóstico <60 años ≥60 años	129/129	35/46 (76.1%) 49/83 (59%)	11/46 (23.9%) 34/83 (41%)	0.052
IPI Riesgo bajo Riesgo intermedio- bajo Riesgo intermedio-alto Riesgo alto	114/129	27/33 (81.8%) 18/31 (58.1%) 16/28 (57.1%) 11/22 (50%)	6/33 (18.2%) 13/31 (41.9%) 12/28 (42.9%) 11/22 (50%)	0.061
PIT Riesgo bajo Riesgo intermedio- bajo Riesgo intermedio-alto Riesgo alto	101/129	9/13 (69.2%) 29/40 (72.5%) 15/24 (62.5%) 10/24 (41.7%)	4/13 (30.8%) 11/40 (27.5%) 9/24 (37.5%) 14/24 (58.3%)	0.094
ECOG <1 ≥1	110/129	51/78 (65.4%) 19/32 (59.4%)	27/78 (34.6%) 13/32 (40.6%)	0.552
Tratamiento CHOP o CHOP-like Otros	110/129	59/85 (69.4%) 12/25 (48.0%)	26/85 (30.6%) 13/25 (52.0%)	0.049
Respuesta Completa Parcial No respuesta	103/129	42/61 (68.9%) 12/19 (63.2%) 15/23 (65.2%)	19/61 (31.1%) 7/19 (36.8%) 8/23 (34.8%)	0.880
Recurrencia No Si	99/129	47/70 (67.1%) 21/29 (72.4%)	23/70 (32.9%) 8/29 (27.6%)	0.607
Estatus del paciente Muerto Vivo	120/129	47/78 (60.3%) 31/42 (73.8%)	31/78 (39.7%) 11/42 (26.2%)	0.138

Tabla 11. Análisis univariante de los parámetros clínicos de 129 pacientes con LTP con respecto a la expresión de C-MYC.

	Casos totales	C-MYC negativo	C-MYC positivo	p-valor
Diagnóstico	128/129			0.537
LTAI		63/74 (85.1%)	11/74 (14.9%)	
LTPNE		48/54 (88.9%)	6/54 (11.1%)	
Sexo	128/129			0.611
Hombre		66/75 (88%)	9/75 (12%)	
Mujer		45/53 (84.9%)	8/53 (15.1%)	
Edad al diagnóstico	128/129			0.091
<60 años		43/46 (93.5%)	3/46 (6.5%)	
≥60 años		68/82 (82.9%)	14/82 (17.1%)	
IPI	113/129			0.053
Riesgo bajo		31/33 (93.9%)	2/33 (6.1%)	
Riesgo intermedio- bajo		27/31 (87.1%)	4/31 (12.9%)	
Riesgo intermedio-alto		24/28 (85.7%)	4/28 (14.3%)	
Riesgo alto		14/21 (66.7%)	7/21 (33.3%)	
PIT	101/129			0.001
Riesgo bajo		13/13 (100%)	0/13 (0%)	
Riesgo intermedio- bajo		34/40 (85%)	6/40 (15%)	
Riesgo intermedio-alto		23/24 (95.8%)	1/24 (4.2%)	
Riesgo alto		14/24 (58.3%)	10/24 (41.7%)	
ECOG	109/129			0.008
<1		71/78 (91%)	7/78 (9%)	
≥1		22/31 (71%)	9/31 (29%)	
Tratamiento	109/129			0.489
CHOP o CHOP-like		72/84 (85.7%)	12/84 (14.3%)	
Otros		20/25 (80.0%)	5/25 (20.0%)	
Respuesta	103/129			0.296
Completa		53/61 (86.9%)	8/61 (13.1%)	
Parcial		18/19 (94.7%)	1/19 (5.3%)	
No respuesta		18/23 (78.3%)	5/23 (21.7%)	
Recurrencia	98/129			0.928
No		59/69 (85.5%)	10/69 (14.5%)	
Si		25/29 (86.2%)	4/29 (13.8%)	
Estatus del paciente	119/129			0.100
Muerto		63/77 (81.8%)	14/77 (18.2%)	
Vivo		39/42 (92.9%)	3/42 (7.1%)	

Tabla 12. Análisis univariante de los parámetros clínicos de 129 pacientes con LTP con respecto a la expresión de Ki-67.

	Casos totales	Ki-67 negativo	Ki-67 positivo	p-valor
Diagnóstico LTAI LTPNE	128/129	58/75 (77.3%) 39/53 (73.6%)	17/75 (22.7%) 14/53 (26.4%)	0.626
Sexo Hombre Mujer	128/129	58/75 (77.3%) 39/53 (73.6%)	17/75 (22.7%) 14/53 (26.4%)	0.626
Edad al diagnóstico <60 años ≥60 años	128/129	38/46 (82.6%) 59/82 (72%)	8/46 (17.4%) 23/82 (28%)	0.177
IPI Riesgo bajo Riesgo intermedio- bajo Riesgo intermedio-alto Riesgo alto	113/129	25/33 (75.8%) 27/31 (87.1%) 23/27 (85.2%) 13/22 (59.1%)	8/33 (24.2%) 4/31 (12.9%) 4/27 (14.8%) 9/22 (40.9%)	0.073
PIT Riesgo bajo Riesgo intermedio- bajo Riesgo intermedio-alto Riesgo alto	101/129	10/13 (76.9%) 33/40 (82.5%) 20/24 (83.3%) 14/24 (58.3%)	3/13 (23.1%) 7/40 (17.5%) 4/24 (16.7%) 10/24 (41.7%)	0.123
ECOG <1 ≥1	109/129	63/77 (81.8%) 23/32 (71.9%)	14/77 (18.2%) 9/32 (28.1%)	0.247
Tratamiento CHOP o CHOP-like Otros	109/129	64/84 (76.2%) 19/25 (76.0%)	20/84 (23.8%) 6/25 (24.0%)	0.984
Respuesta Completa Parcial No respuesta	102/129	49/61 (80.3%) 14/19 (73.7%) 15/22 (68.2%)	12/61 (19.7%) 5/19 (26.3%) 7/22 (31.8%)	0.490
Recurrencia No Si	98/129	54/69 (78.3%) 21/29 (72.4%)	15/69 (21.7%) 8/29 (27.6%)	0.533
Estatus del paciente Muerto Vivo	119/129	56/77 (72.7%) 35/42 (83.3%)	21/77 (27.3%) 7/42 (16.7%)	0.192

4.3. Relación entre la expresión de p-ERK, Ki-67 y C-MYC y la supervivencia de los pacientes con LTP

Para estimar el impacto en la supervivencia de los LTPs, realizamos un análisis Kaplan-Meier para comparar la supervivencia global entre los casos positivos y negativos para los tres marcadores estudiados. Los índices pronósticos estándar para LTP (IPI y PIT) fueron factores pronósticos de supervivencia específicos de enfermedad ($p < 0.001$ para ambos). Encontramos que los casos positivos para p-ERK, Ki-67 y C-MYC mostraron una menor supervivencia ($p = 0.006$, 0.008 y 0.003 , respectivamente) (Figura 4). Por otro lado, en el análisis multivariante, en el que se incluyeron las variables biológicas (p-ERK, Ki-67 y C-MYC) y clínicas (IPI y PIT), el modelo de regresión de Cox identificó sólo a PIT ($p < 0.001$) como un factor pronóstico independiente de supervivencia específica de enfermedad.

En el subtipo histológico LTAI (Figura 5), la presencia de los tres marcadores se relacionó con un curso clínico agresivo (p-ERK $p = 0.002$, Ki-67 $p = 0.030$ y C-MYC $p = 0.008$). Además, en este grupo de pacientes, en el análisis multivariante, el modelo de regresión de Cox identificó a IPI y p-ERK como factores pronóstico independientes de supervivencia específica de enfermedad ($p = 0.001$ y 0.030 , respectivamente).

Por el contrario, como se muestra en la Figura 6, en el subtipo histológico LTPNE, la presencia de los tres marcadores no se relacionó con un curso clínico agresivo (p-ERK $p = 0.651$, Ki-67 $p = 0.119$ y C-MYC $p = 0.153$).

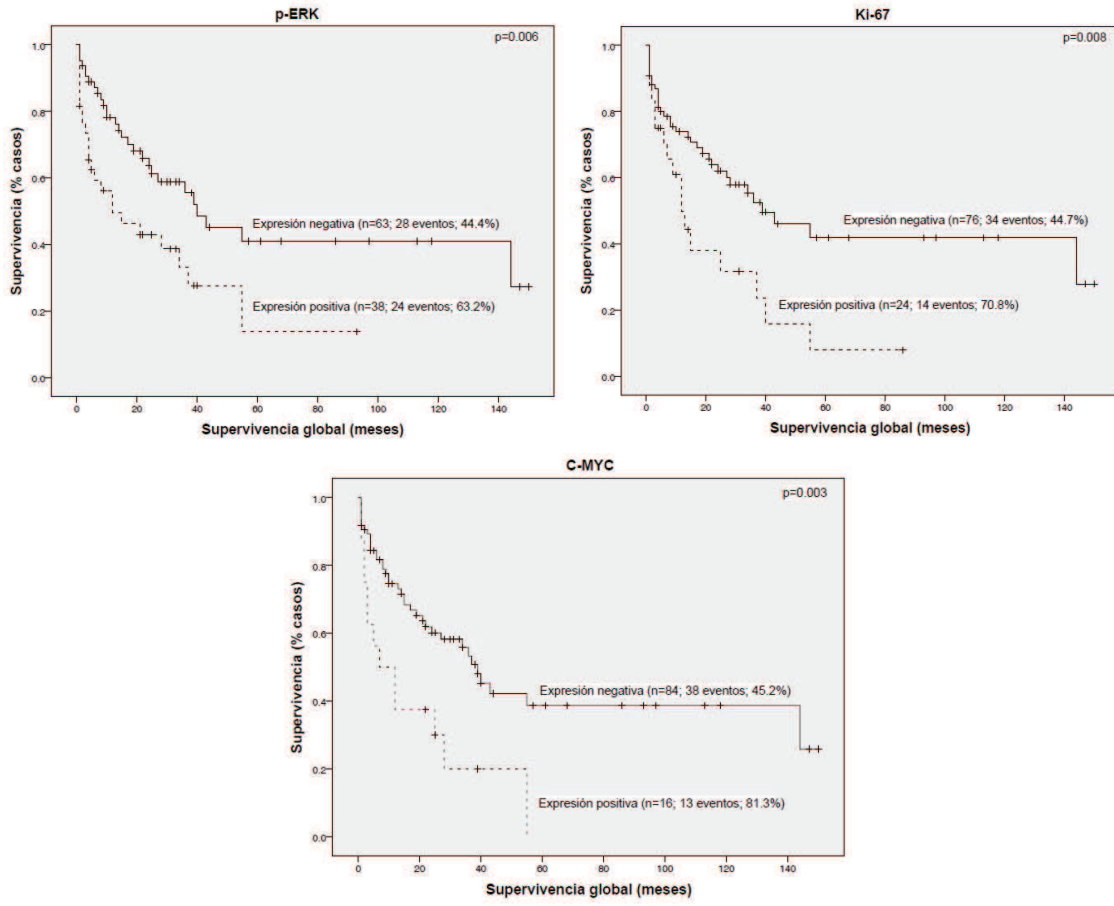


Figura 4. Análisis de la supervivencia global de acuerdo a la expresión de p-ERK, Ki-67 y C-MYC en la serie total de muestras. El análisis Kaplan-Meier comparando casos positivos y negativos para los tres marcadores estudiados, muestra una menor supervivencia en los casos positivos para p-ERK, Ki-67 y C-MYC.

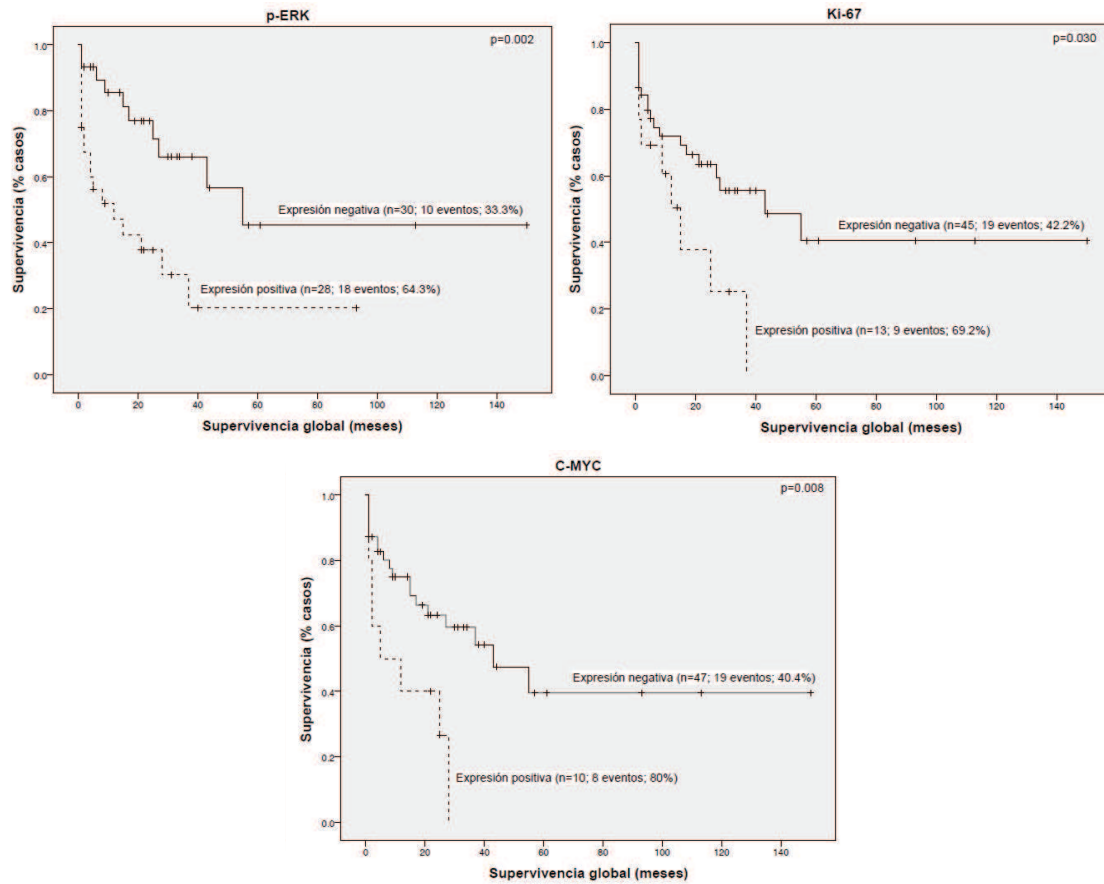


Figura 5. Análisis de la supervivencia global en relación a la expresión de p-ERK, Ki-67 y C-MYC en los pacientes con LTAI. El análisis Kaplan-Meier comparando casos positivos y negativos para los tres marcadores estudiados, muestra una menor supervivencia en los casos positivos para p-ERK, Ki-67 y C-MYC.

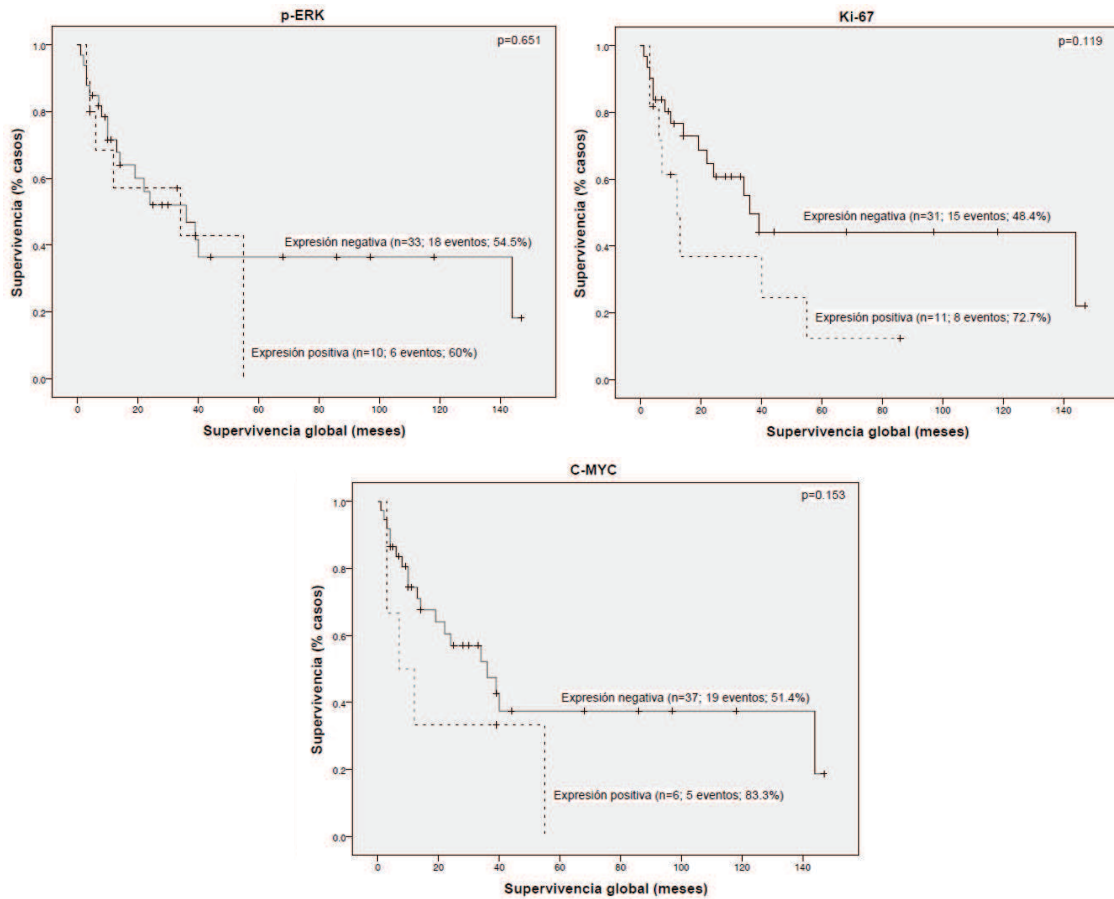


Figura 6. Análisis de la supervivencia global con respecto a la expresión de p-ERK, Ki-67 y C-MYC en los pacientes con LTPNE. El análisis Kaplan-Meier comparando casos positivos y negativos para los tres marcadores estudiados, muestra que la expresión de p-ERK, Ki-67 y C-MYC no se correlaciona con pronóstico en este subtipo histológico de pacientes.

4.4. Análisis de supervivencia en pacientes con LTP tratados con esquema terapéutico CHOP o CHOP-like

De los 129 casos utilizados en el estudio, sólo 110 tenían disponible el dato sobre el tratamiento recibido. Subdividimos los pacientes en dos grupos según el protocolo terapéutico utilizado: aquellos que recibieron CHOP o CHOP-like (85/110, 77.3%) y aquellos que recibieron otros regímenes terapéuticos (25/110, 22.7%).

Decidimos repetir el análisis en el grupo de pacientes tratados con CHOP o CHOP-like para llevar a cabo el estudio en un grupo de pacientes tratados de forma homogénea. La relevancia de la expresión nuclear de p-ERK se mantuvo en los casos diagnosticados de LTAI (19/47, 40.4%) con respecto a los pacientes con LTPNE (7/38, 18.4%) ($p=0.029$). La expresión de p-ERK no se correlacionó significativamente con ningún parámetro clínico ni con la expresión de Ki-67 ($p=0.654$); sin embargo, sí se correlacionó con la expresión de C-MYC ($p<0.001$). Por otro lado, la expresión de Ki-67 se correlacionó con la variable clínica IPI ($p=0.021$); y los pacientes con elevada expresión de C-MYC mantuvieron la correlación con las variables PIT y EGOG ($p=0.015$ y 0.010 , respectivamente).

Posteriormente, analizamos el impacto en la supervivencia de la expresión de los tres marcadores estudiados, en este grupo de pacientes con un tratamiento homogéneo. Nosotros encontramos, en comparación con la serie total, que la presencia de Ki-67 y C-MYC mantuvieron su significancia biológica ($p=0.014$ y 0.010 , respectivamente), pero en el caso de p-ERK dicha significancia se pierde ($p=0.176$) (Figura 7). En el análisis multivariante, en el que se incluyeron las variables biológicas (Ki-67 y C-MYC) y clínicas (IPI y PIT), el modelo de regresión de Cox identificó sólo a PIT ($p<0.001$) como un factor pronóstico independiente de supervivencia específica de enfermedad.

En el subtipo histológico LTAI, sólo la expresión de p-ERK mostró una tendencia a relacionarse con menor supervivencia ($p=0.053$) (Figura 8). En el análisis multivariante, se identificó sólo a IPI ($p<0.001$) como un factor pronóstico independiente de supervivencia específica de enfermedad. Por otro lado, sólo se encontró asociación entre la expresión de C-MYC con pronóstico cuando se analizó el grupo de pacientes LTPNE ($p=0.032$) (Figura 9).

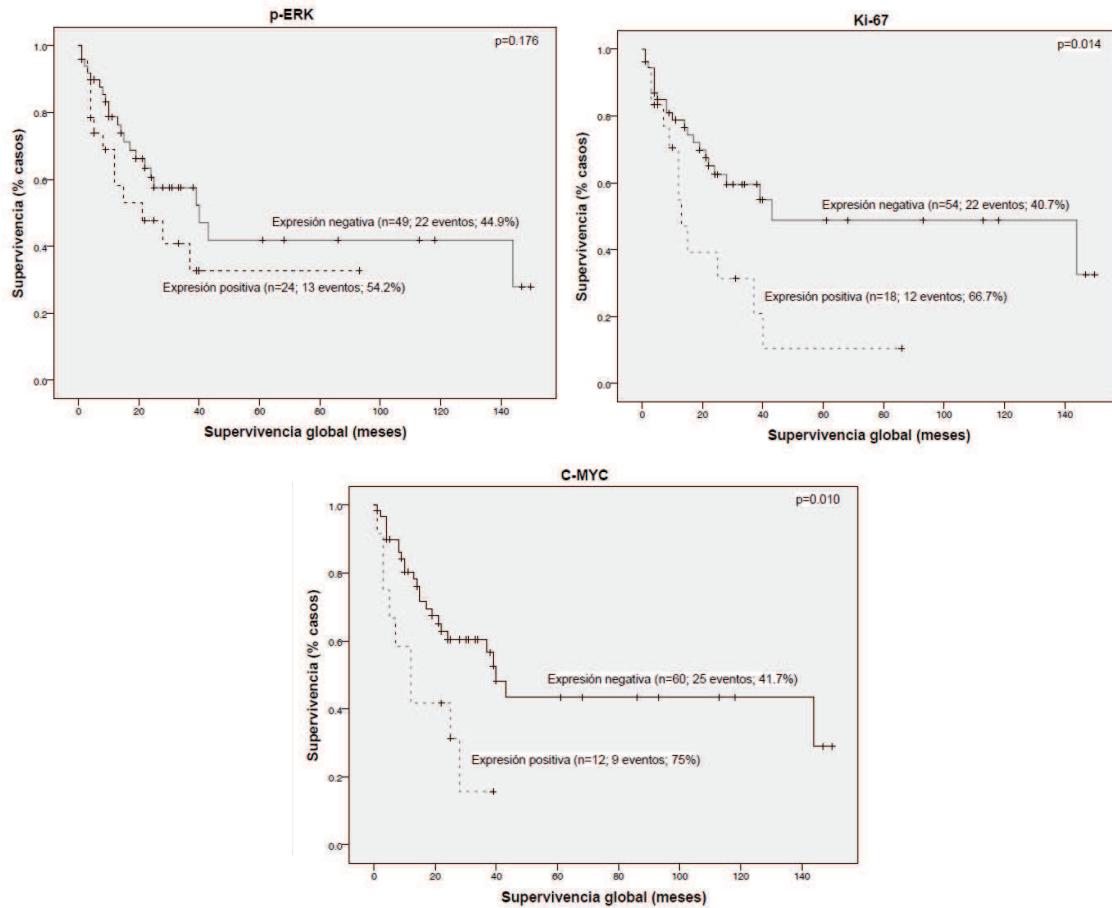


Figura 7. Análisis de la supervivencia global con respecto a la expresión de p-ERK, Ki-67 y C-MYC en los pacientes con LTP tratados con CHOP o CHOP-like. Curvas de supervivencia Kaplan-Meier comparando casos positivos y negativos para los tres marcadores estudiados destaca que la expresión de Ki-67 y C-MYC se correlacionan con pronóstico.

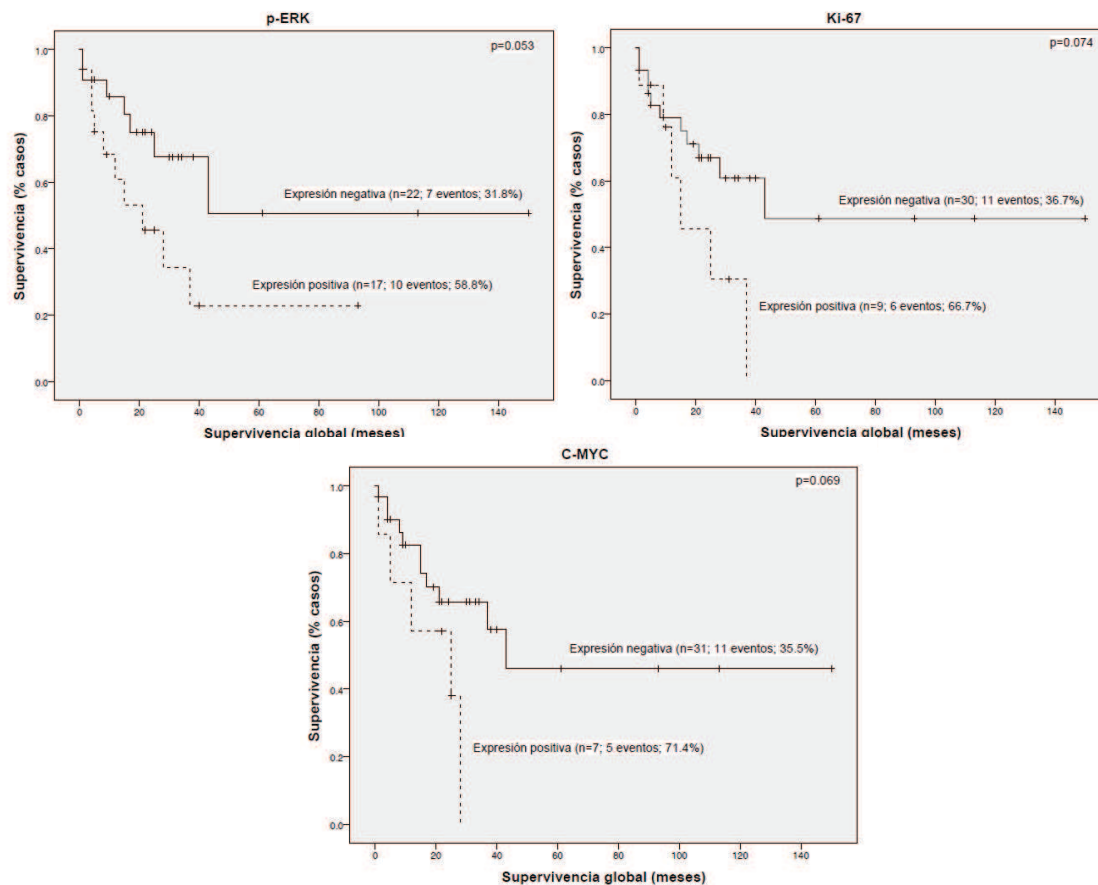


Figura 8. Análisis de la supervivencia global en relación a la expresión de p-ERK, Ki-67 y C-MYC en los pacientes con LTAI tratados con CHOP o CHOP-like. Curvas de supervivencia Kaplan-Meier comparando casos positivos y negativos para los tres marcadores estudiados. En este subtipo histológico, se observa que sólo la expresión de p-ERK se correlaciona con pronóstico.

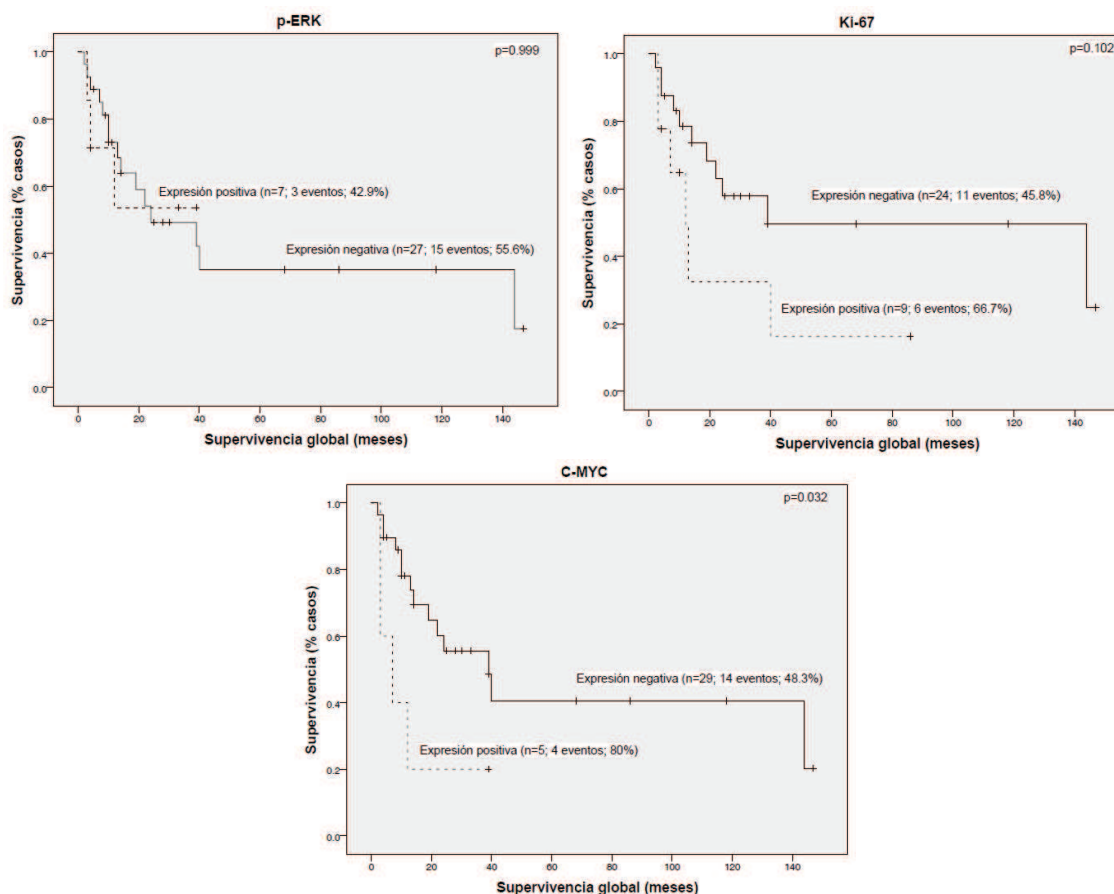


Figura 9. Análisis de la supervivencia global de acuerdo a la expresión de p-ERK, Ki-67 y C-MYC en los pacientes con LTPNE tratados con CHOP o CHOP-like. Curvas de supervivencia Kaplan-Meier comparando casos positivos y negativos para los tres marcadores estudiados. En este subtipo histológico, se observa que sólo la expresión de C-MYC se correlaciona con pronóstico.

En aquellos pacientes que recibieron otros regímenes terapéuticos, estos marcadores no se relacionaron con pronóstico, ni en la serie total ni al clasificar por subtipo histológico (datos no mostrados). Las variables clínicas (IPI y PIT) mantuvieron la correlación con pronóstico independientemente de las combinaciones usadas.

4.5. La expresión de C-MYC se relaciona con GATA3 y confiere peor pronóstico a pacientes con LTP

Como se comenta en la Introducción, estudios de expresión génica han determinado la existencia de diferentes subgrupos de LTPNE con implicación pronóstica, caracterizado uno de ellos por la sobreexpresión de GATA3 y su relación con firmas génicas de *MYC* y proliferación celular⁴⁴. Debido a que en nuestro estudio habíamos encontrado una implicación pronóstica de C-MYC y Ki-67, decidimos analizar en nuestra serie de muestras FFIP la expresión de GATA3 y su implicación pronóstica.

Encontramos positividad en 21.7% (28/129) de los casos analizados, con diferencias en cuanto a la intensidad de tinción. La mayoría de los casos (23/28, 82%) tuvieron más del 30% de células tumorales GATA3 positivas con una intensidad de tinción intensa o moderada, mientras que 2/28 casos (7.1%) tuvieron una intensidad de tinción baja. La expresión de GATA3 fue intensa y además presente en el 100% de las células tumorales en 5 casos de la serie (5/28, 17.9%). Sólo otros 5 casos mostraron positividad para GATA3 en menos del 40% de las células tumorales (Tabla 13 y Figura 10). Se observó una correlación estadísticamente significativa entre la expresión de GATA3 y C-MYC (8/16 casos GATA3 positivos expresaron C-MYC, $p < 0.001$). Sin embargo, no encontramos correlación estadística entre la expresión de GATA3 y Ki-67 ($p = 0.133$). Por otro lado, la correlación entre C-MYC y GATA3 se mantuvo en el grupo de pacientes LTPNE ($p = 0.004$).

Tabla 13. Casos LTP con positividad para GATA3. Veintitrés de 28 casos (82%) mostraron más del 30% de células tumorales GATA3 positivas con una intensidad de tinción intensa (I) o moderada (M), mientras que 2/28 casos (7.1%) tuvieron una intensidad de tinción baja (B). En 5/28 casos (17.9%) la expresión de GATA3 fue intensa y presente en el 100% de las células tumorales. Sólo otros 5 casos mostraron positividad para GATA3 en menos del 40% de las células tumorales.

Caso	Diagnóstico	GATA3 (%)	GATA3 (Intensidad de tinción)
1	LTPNE	80	I
2	LTPNE	100	I
3	LTAI	20	M
4	LTPNE	90	B
5	LTAI	40	I
6	LTAI	50	M
7	LTPNE	80	M
8	LTAI	20	L
9	LTAI	30	M
10	LTPNE	20	I
11	LTAI	100	I
12	LTAI	100	I
13	LTPNE	50	B
14	LTAI	80	M
15	LTPNE	100	I
16	LTPNE	100	I
17	LTAI	40	I
18	LTAI	65	M
19	LTAI	70	M
20	LTPNE	40	I
21	LTPNE	80	M
22	LTPNE	65	M
23	LTPNE	40	M
24	LTAI	70	M
25	LTAI	75	M
26	LTAI	60	I
27	LTPNE	80	M
28	LTAI	20	M

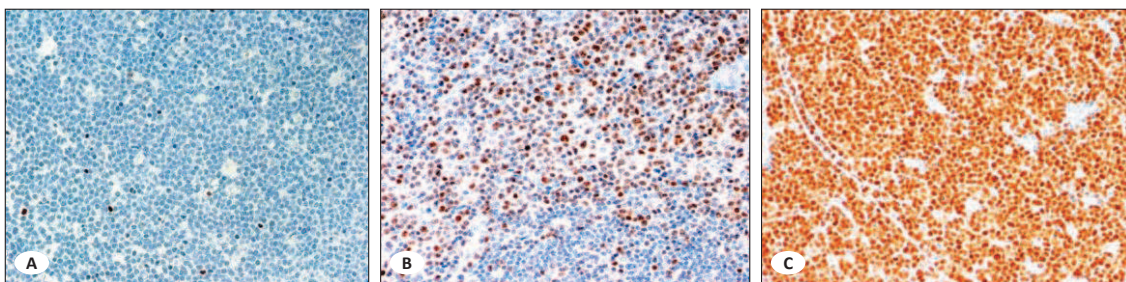


Figura 10. Figura representativa de la expresión de GATA3. A) Caso negativo para GATA3. B) Caso con positividad intermedia (10-80% de células positivas). C) Caso LTP mostrando alto nivel de expresión de GATA3 (>80% de células positivas).

Posteriormente, analizamos el impacto en la supervivencia de la expresión de GATA3, encontrando en el subtipo histológico LTPNE, cómo la expresión de GATA3 confiere pobre pronóstico a estos pacientes, como revela el análisis univariante ($p=0.046$) (Figura 11).

En nuestra serie, no encontramos una correlación significativa entre la expresión de GATA3 y los parámetros clínicos estudiados (Tabla 14). En el análisis multivariante incluyendo variables clínicas y biológicas, el modelo de regresión de Cox sólo identificó a PIT como un factor pronóstico independiente ($p<0.001$).

Para tener el estudio en un grupo homogéneo de pacientes, decidimos estudiar la implicación pronóstica de GATA3 en pacientes tratados con CHOP o CHOP-like. Encontramos que la significancia biológica de GATA3 se mantiene en el grupo de pacientes diagnosticados de LTPNE ($p=0.048$) (Figura 12). Además, se relaciona con la expresión de C-MYC en este subtipo histológico ($p=0.032$) (Figura 9).

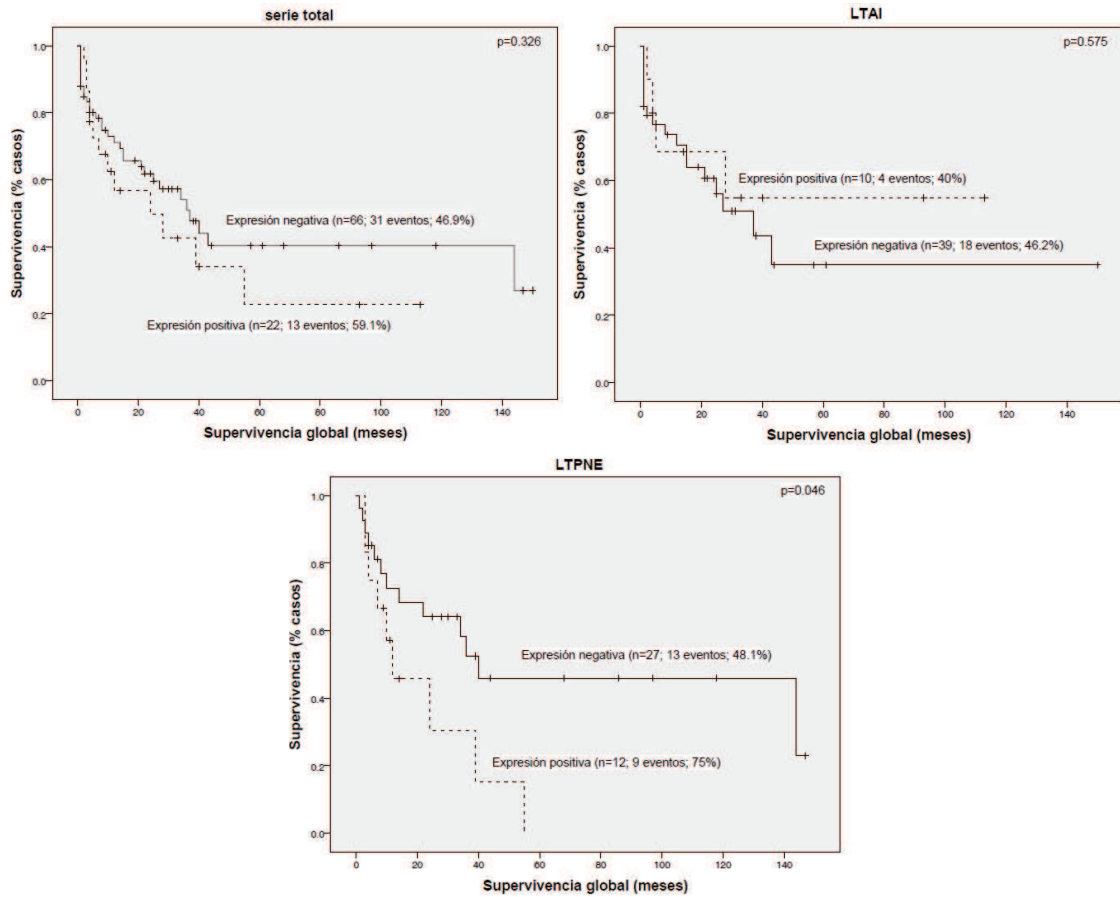


Figura 11. Análisis de la supervivencia global de acuerdo a la expresión de GATA3. Curvas de supervivencia Kaplan-Meier comparando casos positivos y negativos para la expresión de GATA3, en la serie total de LTP estudiada y tras subclasificar por subtipo histológico. Se observa que la expresión de GATA3 se correlaciona con pronóstico en el subtipo de pacientes con LTPNE (LTAI=Linfoma T Angioinmunoblástico; LTPNE=Linfoma T Periférico no especificado).

Tabla 14. Análisis univariante de los parámetros clínicos de 129 pacientes con LTP con respecto a la expresión de GATA3.

	Casos totales	GATA3 negativo	GATA3 positivo	p-valor
Diagnóstico LTAI LTPNE	115/129	50/65 (76.9%) 37/50 (74.0%)	15/65 (23.1%) 13/50 (26.0%)	0.717
Sexo Hombre Mujer	115/129	51/67 (76.1%) 36/48 (75.0%)	16/67 (23.9%) 12/48 (25.0%)	0.890
Edad al diagnóstico <60 años ≥60 años	115/129	32/41 (78.0%) 55/74 (25.7%)	9/41 (22.0%) 19/74 (25.7%)	0.656
IPI Riesgo bajo Riesgo intermedio- bajo Riesgo intermedio-alto Riesgo alto	100/129	22/29 (75.9%) 19/26 (73.1%) 20/26 (76.9%) 14/19 (73.7%)	7/29 (24.1%) 7/26 (26.9%) 6/26 (23.1%) 5/19 (26.3%)	0.988
PIT Riesgo bajo Riesgo intermedio- bajo Riesgo intermedio-alto Riesgo alto	89/129	8/11 (72.7%) 28/37 (75.7%) 14/19 (73.7%) 15/22 (68.2%)	3/11 (27.3%) 9/37 (24.3%) 5/19 (26.3%) 7/22 (31.8%)	0.941
ECOG <1 ≥1	96/129	54/68 (79.4%) 18/28 (64.3%)	14/68 (20.6%) 10/28 (35.7%)	0.120
Tratamiento CHOP o CHOP-like Otros	97/129	54/75 (72.0%) 17/22 (77.3%)	21/75 (28.0%) 5/22 (22.7%)	0.623
Respuesta Completa Parcial No respuesta	92/129	37/51 (72.5%) 12/18 (66.7%) 18/23 (78.3%)	14/51 (27.5%) 6/18 (33.3%) 5/23 (21.7%)	0.708
Recurrencia No Si	88/129	49/64 (76.6%) 15/24 (62.5%)	15/64 (23.4%) 9/24 (37.5%)	0.187
Estatus del paciente Muerto Vivo	106/129	49/68 (72.1%) 31/38 (81.6%)	19/68 (27.9%) 7/38 (18.4%)	0.275

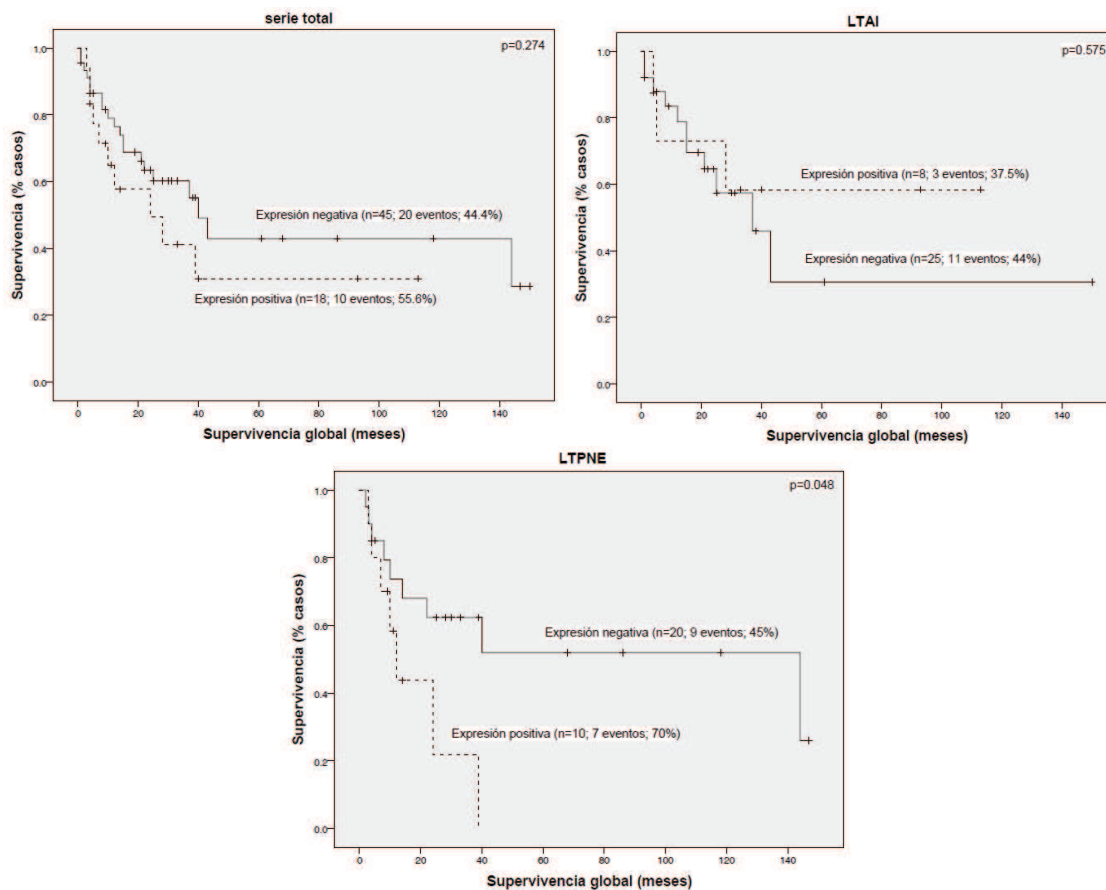


Figura 12. Análisis de la supervivencia global con respecto a la expresión de GATA3. Curvas de supervivencia Kaplan-Meier comparando casos positivos y negativos para la expresión de GATA3, en la serie total de LTP estudiada y tras subclasificar por subtipo histológico en pacientes tratados con CHOP o CHOP-like. Se observa que la expresión de GATA3 se correlaciona con pronóstico en el subtipo de pacientes con LTPNE tratados homogéneamente (LTAI=Linfoma T Angioinmunoblástico; LTPNE=Linfoma T Periférico no especificado).

RESULTADOS II

Estudios mutacionales en genes de vías de señalización implicadas en la patogenia de los LTP.

5.1. Mutación G17V en el gen *RHOA*

5.1.1. Frecuencia mutacional

Estudios recientes en LTP han identificado la mutación Gly17Val (G17V) en la GTPasa *RHOA*, la cual inhibe la señalización de la vía. Ya que esta vía juega un papel importante en muchas funciones celulares, nosotros quisimos establecer la relevancia biológica de dicha mutación en nuestra serie de pacientes.

En primer lugar, se analizó la mutación por discriminación alélica mediante qPCR en 26 de las 37 muestras de material fresco que fueron hibridadas en la micromatriz. Utilizando el programa GSEA se analizaron los datos obtenidos. Encontramos la mutación *RHOA*-G17V en un 34.6% de los casos incluyendo 6 LTAI y 3 LTPNE, de los cuales 1/3 mostró características de LTAI (LTAI-like), y observamos una correlación estadísticamente significativa con la expresión de 32 vías de señalización en este tipo de muestras (Tabla 15), incluyendo aquellas relacionadas con células T CD4 del centro germinal/folicular (T_{FH}) y un perfil LTAI. Además, de otras vías de gran relevancia en la patogénesis de los LTP (p38, PI3K, KRAS, RAC1 y la vía alternativa de NF- κ B).

Tabla 15. Perfil de expresión génica, comparando 26 muestras LTP con mutación en el gen *RHOA* o no, analizado con el programa GSEA. 64 de 79 vías de señalización estaban sobre-expresadas. Treinta y dos de 64 vías de señalización fueron significativas con un FDR<0.250 y 26/32 fueron significativas con un p-valor<0.05. Por otro lado, en casos no mutados en el gen *RHOA*, 15/79 vías de señalización estaban sobre-expresadas. Ninguna vía de señalización fue significativa (FDR<0.250) y 1/15 fue significativa con un p<0.05.

Perfil de expresión en casos mutados			
	Vías de señalización	p-valor	FDR
1	Células T colaboradoras del centro germinal	<0.001	<0.001
2	Dianas de XBP1	<0.001	<0.001
3	Dianas de IRF3	<0.001	<0.001
4	Señalización CD40 durante el desarrollo de células del centro germinal	<0.001	<0.001
5	Señalización de citoquinas	<0.001	<0.001
6	Células madre linfoides	<0.001	0.005
7	Señalización de calico en células T y B	<0.001	0.005
8	Células dendríticas foliculares	<0.001	0.012
9	IFN	<0.001	0.011
10	Complejo de Histocompatibilidad II	0.005	0.050
11	Dianas de BLIMP-1	<0.001	0.014
12	Dianas de BCL-6	<0.001	0.014
13	Estroma de células grandes	0.010	0.018
14	Células B del centro germinal	<0.001	0.020
15	NOTCH	0.020	0.048
16	BCR	0.015	0.059
17	NF-kB alternativa	0.045	0.078
18	Diferenciación de célula T CD8	<0.001	0.074
19	TALL1	0.037	0.088
20	Fosfatidilinositol	0.016	0.085
21	KRAS2	<0.001	0.088
22	P38MAPK	0.026	0.109
23	TOLL	0.045	0.119
24	RAC1	0.064	0.127
25	PI3K	0.006	0.129
26	NF-kB clásica	0.079	0.135
27	P53 hipoxia	0.068	0.148
28	Célula T reguladora	0.057	0.166
Perfil de expresión en casos no mutados			
	Vías de señalización	p-valor	FDR
1	Polycomb	0.010	0.454
2	CDC25	0.382	1.000
3	Glicolisis	0.481	1.000
4	C-Myc	0.515	1.000
5	Genes sobre-regulados por MYC	0.630	1.000
6	Ciclo celular	0.651	1.000

Posteriormente, la mutación fue analizada en nuestra serie de 135 muestras FFIP. Aquellos casos en los que el valor Ct de la referencia fue mayor de 35 se consideraron no valorables. Además, para confirmar los resultados mutacionales obtenidos, se analizaron los casos mediante amplificación de la región genómica y secuenciación capilar. La mutación en el gen *RHOA* fue valorable en 120 de los 135 casos que componen la serie. Nosotros encontramos un 26.7% (32/120) de casos mutados, siendo más frecuente en los casos LTAI (25/72; 34.7%) que en LTPNE (7/48; 14.6%), de los cuales 3/7 casos mostraron características de LTAI ($p=0.015$) (Tabla 16).

5.1.2. Significado clínico y pronóstico

Como se observa en la tabla 16, no existe correlación significativa entre la presencia de la mutación G17V en el gen *RHOA* y las variables clínicas estudiadas. Por otro lado, nosotros no encontramos una clara asociación entre la presencia de la mutación y el pronóstico, ni en la serie total ni al dividir por subtipo histológico (Figura 13).

Tabla 16. Análisis univariante de los parámetros clínicos y moleculares de 120 pacientes con LTP con respecto al estado mutacional del gen *RHOA*.

	Casos totales	<i>RHOA</i> no mutado	<i>RHOA</i> mutado	p-valor
Diagnóstico	120/120			0.015
LTAI		47/72 (65.3%)	25/72 (34.7%)	
LTPNE		41/48 (85.4%)	7/48 (14.6%)	
Sexo	120/120			0.133
Hombre		47/69 (68.1%)	22/69 (31.9%)	
Mujer		41/51 (80.4%)	10/51 (19.6%)	
Edad al diagnóstico	120/120			0.288
<60 años		34/43 (79.1%)	9/43 (20.9%)	
≥60 años		54/77 (70.1%)	23/77 (29.9%)	
IPI	105/120			0.522
Riesgo bajo		26/32 (81.2%)	6/32 (18.8%)	
Riesgo intermedio-bajo		18/27 (66.7%)	9/27 (33.3%)	
Riesgo intermedio-alto		19/26 (73.1%)	7/26 (26.9%)	
Riesgo alto		13/20 (65.0%)	7/20 (35.0%)	
PIT	93/120			0.950
Riesgo bajo		10/14 (71.4%)	4/14 (28.6%)	
Riesgo intermedio-bajo		26/35 (74.3%)	9/35 (25.7%)	
Riesgo intermedio-alto		15/22 (68.2%)	7/22 (31.8%)	
Riesgo alto		15/22 (68.2%)	7/22 (31.8%)	
ECOG	101/120			0.416
<1		53/72 (73.6%)	19/72 (26.4%)	
≥1		19/29 (65.5%)	10/29 (34.5%)	
Tratamiento	104/120			0.047
CHOP o CHOP-like		63/79 (79.7%)	16/79 (20.3%)	
Otros		15/25 (60.0%)	10/25 (40.0%)	
Respuesta	95/120			0.424
Completa		43/60 (71.7%)	17/60 (28.3%)	
Parcial		13/15 (86.7%)	2/15 (13.3%)	
No respuesta		16/20 (80%)	4/20 (20%)	
Recurrencia	93/120			0.689
No		49/65 (75.4%)	16/65 (24.6%)	
Si		20/28 (71.4%)	8/28 (28.6%)	
Estatus del paciente	111/120			0.665
Muerto		50/69 (72.5%)	19/69 (27.5%)	
Vivo		32/42 (76.2%)	10/42 (23.8%)	

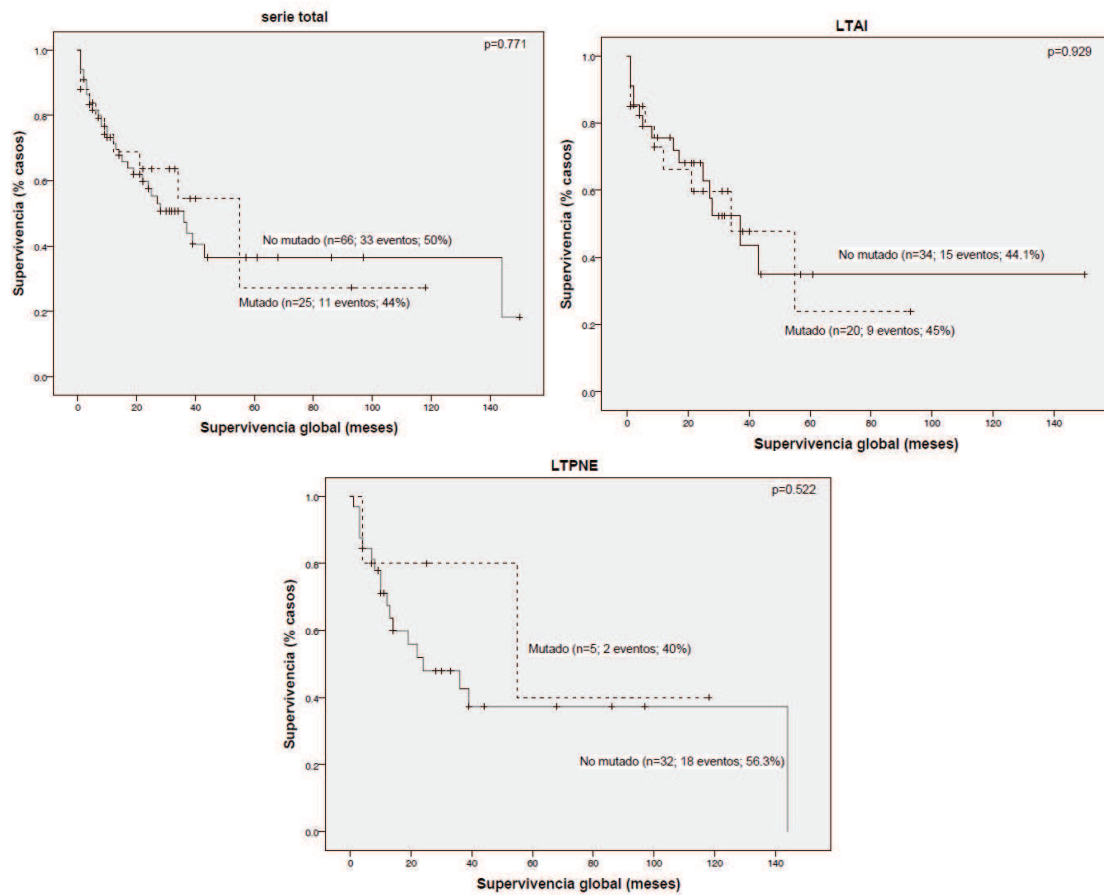


Figura 13. Análisis de la supervivencia global de acuerdo a la presencia de la mutación G17V en el gen *RHOA* en LTP. El análisis Kaplan-Meier comparando casos mutados y no mutados muestra que la presencia/ausencia de mutación no se correlaciona con pronóstico (LTAI=Linfoma T Angioinmunoblástico; LTPNE=Linfoma T Periférico no especificado).

5.1.3. Correlación entre la presencia de la mutación y la expresión de marcadores subrogados de vías de señalización implicadas en LTP

Quisimos validar los resultados obtenidos en la firma molecular de los casos mutados en el gen *RHOA*, y para ello realizamos inmunohistoquímica de los TMAs contruidos con los marcadores PD-1, BCL6, CXCL13, ICOS, CD10, p-ERK y las subunidades de NF- κ B (p50 y p52). El porcentaje de positividad de cada marcador utilizado en este estudio se muestra en la Tabla 3. Los estudios inmunohistoquímicos revelaron positividad para PD-1 en un 49.2% (59/120), BCL6 en un 63.3% (76/120), CXCL13 en un 67.5% (81/120), ICOS en un 48.3% (58/120), CD10 en un 5% (6/120), p-ERK en un 32.5% (39/120), p50 en un 73.3% (88/120) y p52 en un 64.2% (77/120) de los casos.

Encontramos una correlación significativa directa entre la presencia de la mutación *RHOA*-G17V y la expresión de p-ERK ($p < 0.001$), PD-1 ($p = 0.027$), CXCL13 ($p = 0.010$), CD10 ($p = 0.017$) y p52 ($p = 0.05$) (Figura 14), validando parte de los resultados encontrados en el perfil de expresión génica, donde en los casos mutados se destacó la sobre-expresión de las vías de señalización relacionadas con células T_{FH} (PD-1, CXCL13 y CD10), NF- κ B (p52) y KRAS (p-ERK). Como se comenta en el apartado anterior de Resultados, la expresión nuclear de p-ERK se analizó mediante una doble inmunohistoquímica, por lo tanto la relación significativa directa hallada entre p-ERK y la mutación en el gen *RHOA* tiene lugar en las células tumorales; así 20/32 (62.5%) de los casos mutados expresaron p-ERK en el núcleo de las células tumorales; mientras que 19/88 casos no mutados también fueron p-ERK positivos. Observamos que 20/32 (62.5%) de los casos mutados expresaron PD-1, mientras que 39/88 casos no mutados fueron PD-1 positivos. Además, 27/32 de casos mutados expresaron CXCL13 (84.3%) y 54/88 casos no mutados fueron CXCL13 positivos. Por otro lado, es destacable que 25/32 (78.1%) de los casos mutados expresaron p52 en el núcleo y 52/88 de los casos no mutados también expresaron p52. No encontramos una correlación significativa entre la presencia de la mutación *RHOA*-G17V y la expresión de ICOS, BCL6 y p50 ($p = 0.392$, 0.082 y 0.193, respectivamente). La presencia de mutación se correlacionó con la expresión de PD-1/BCL6 ($p = 0.048$), PD-1/CXCL13 ($p = 0.011$), PD-1/ICOS ($p = 0.019$), PD-1/CD10 ($p = 0.014$), BCL6/CD10 ($p = 0.028$), BCL6/CXCL13 ($p = 0.040$) y CD10/CXCL13 ($p = 0.006$), además existe una tendencia con ICOS/CXCL13 ($p = 0.058$).

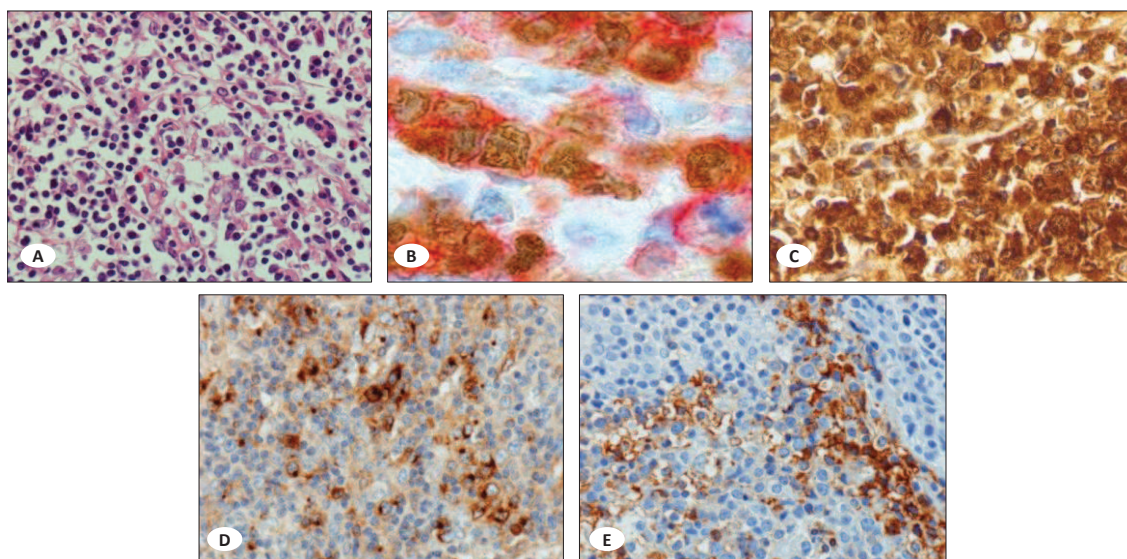


Figura 14. Imágenes representativas correspondientes a un caso con la mutación G17V en el gen *RHOA*. A) Hematoxilina-Eosina. B) Detección de p-ERK y PD-1 mostrando doble positividad en las células tumorales. C) Detección de p52. D) Detección de CXCL13. E) Detección de CD10.

Cuando analizamos la presencia de la mutación con respecto a la expresión de las proteínas según el tipo histológico diagnosticado, encontramos que sólo la relación estadística entre la mutación *RHOA*-G17V y la expresión de p-ERK se mantuvo en ambos grupos: LTAI ($p=0.002$) y LTPNE ($p=0.020$). Además, en el grupo de pacientes LTAI, se mantuvo la relación entre la presencia de mutación y la expresión de CXCL13 ($p=0.004$), así como las combinaciones PD-1/ICOS ($p=0.015$), CD10/CXCL13 ($p=0.014$) e ICOS/CXCL13 ($p=0.035$).

5.1.4. El papel del tratamiento en la mutación G17V en el gen *RHOA*

De los 120 casos utilizados en el estudio, sólo 104 tenían disponible el dato sobre el tratamiento recibido: aquellos que recibieron CHOP o CHOP-like (79/104, 76%) y aquellos que recibieron otros regímenes terapéuticos (25/104, 24%).

Decidimos repetir el análisis en el grupo de pacientes tratados con CHOP o CHOP-like, debido a que se trata de un grupo con un tratamiento más homogéneo. La presencia de la mutación *RHOA*-G17V se encontró en los casos diagnosticados de LTAI (13/45, 28.9%) con respecto a los pacientes con LTPNE (3/34, 8.8%) ($p=0.028$). No encontramos correlación significativa entre la presencia de la mutación y ningún parámetro clínico estudiado; sin embargo, mantuvo la significancia estadística con la

expresión de PD-1 ($p=0.018$), CXCL13 ($p=0.041$), CD10 ($p=0.022$) y p-ERK ($p=0.002$), así como las combinaciones PD-1/CXCL13 ($p=0.022$), PD-1/CD10 ($p=0.004$), BCL6/CD10 ($p=0.023$) y CD10/CXCL13 ($p=0.014$).

Posteriormente, analizamos el impacto en la supervivencia de la presencia de la mutación en este grupo de pacientes. Coincidiendo con lo expuesto anteriormente, no encontramos una correlación significativa con respecto al pronóstico, ni en la serie total ni por subtipo histológico (Figura 15).

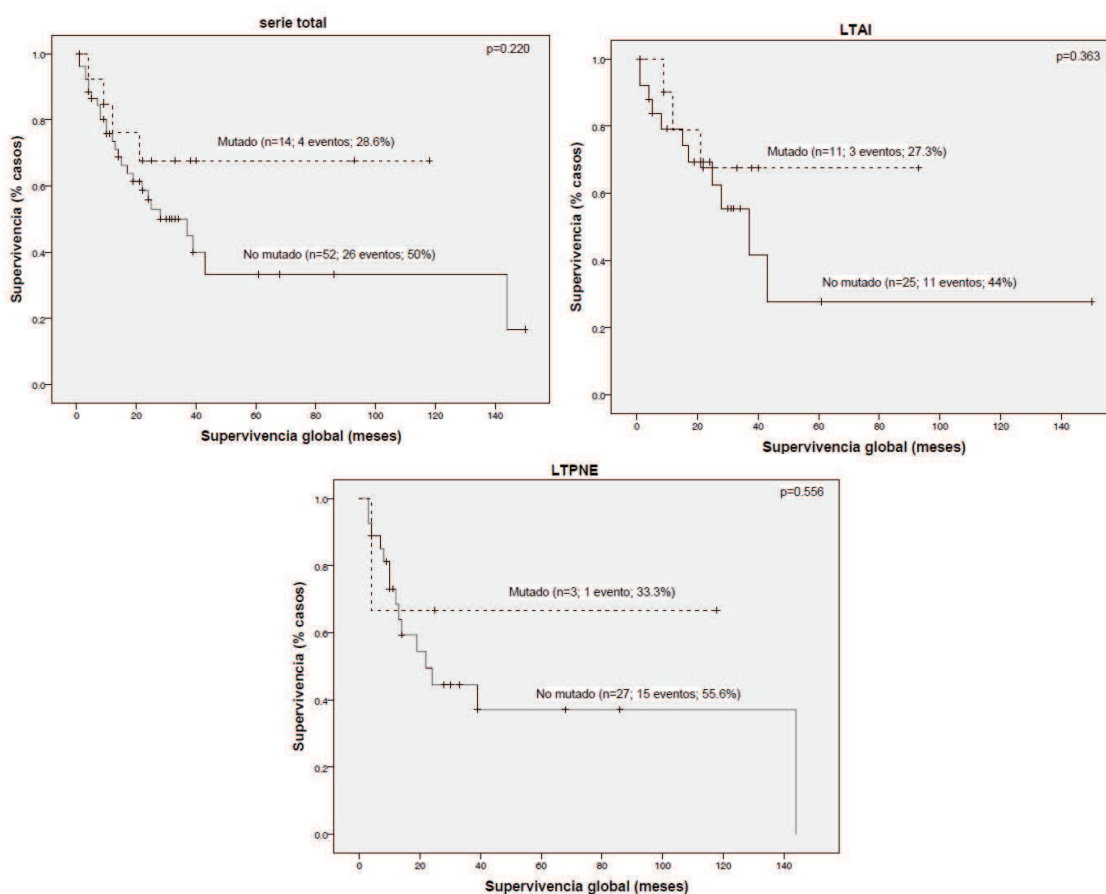


Figura 15. Análisis de la supervivencia global de acuerdo a la presencia de la mutación G17V en el gen *RHOA* en LTP tratados con CHOP o CHOP-like. El análisis Kaplan-Meier comparando casos mutados y no mutados muestra que la presencia/ausencia de mutación no se correlaciona con pronóstico (LTAI=Linfoma T Angioinmunoblástico; LTPNE=Linfoma T Periférico no especificado).

5.1.4.1. Significado pronóstico de la mutación RHOA-G17V y la expresión de p-ERK

Enlazando con los resultados mostrados en el apartado Resultados I, la correlación entre la presencia de la mutación RHOA-G17V y la expresión de p-ERK en las células tumorales se mantuvo en la serie total ($p=0.002$) y en el subtipo LTAI ($p=0.009$), en este grupo de pacientes tratados con CHOP o CHOP-like.

Tanto en la serie total como en el subtipo histológico LTAI, la mutación RHOA-G17V no se correlacionó con pronóstico; sin embargo, la expresión de p-ERK se correlacionó con pronóstico en el grupo de pacientes LTAI con un tratamiento homogéneo ($p=0.053$) como se mostró en la figura 8, pero esta relación se pierde en el análisis multivariante de regresión de Cox.

Cuando tenemos en cuenta el grupo de pacientes con LTAI de acuerdo al estatus de la mutación y presencia/ausencia de p-ERK, encontramos que el subtipo de pacientes con expresión de p-ERK y *RHOA* no mutado, en comparación con otras combinaciones, tienen un peor pronóstico ($p=0.022$) (Figura 16). Además, en el análisis multivariante, la regresión de Cox identificó el grupo p-ERK positivo/*RHOA* no mutado como un factor pronóstico independiente de la supervivencia específica de enfermedad ($p=0.004$).

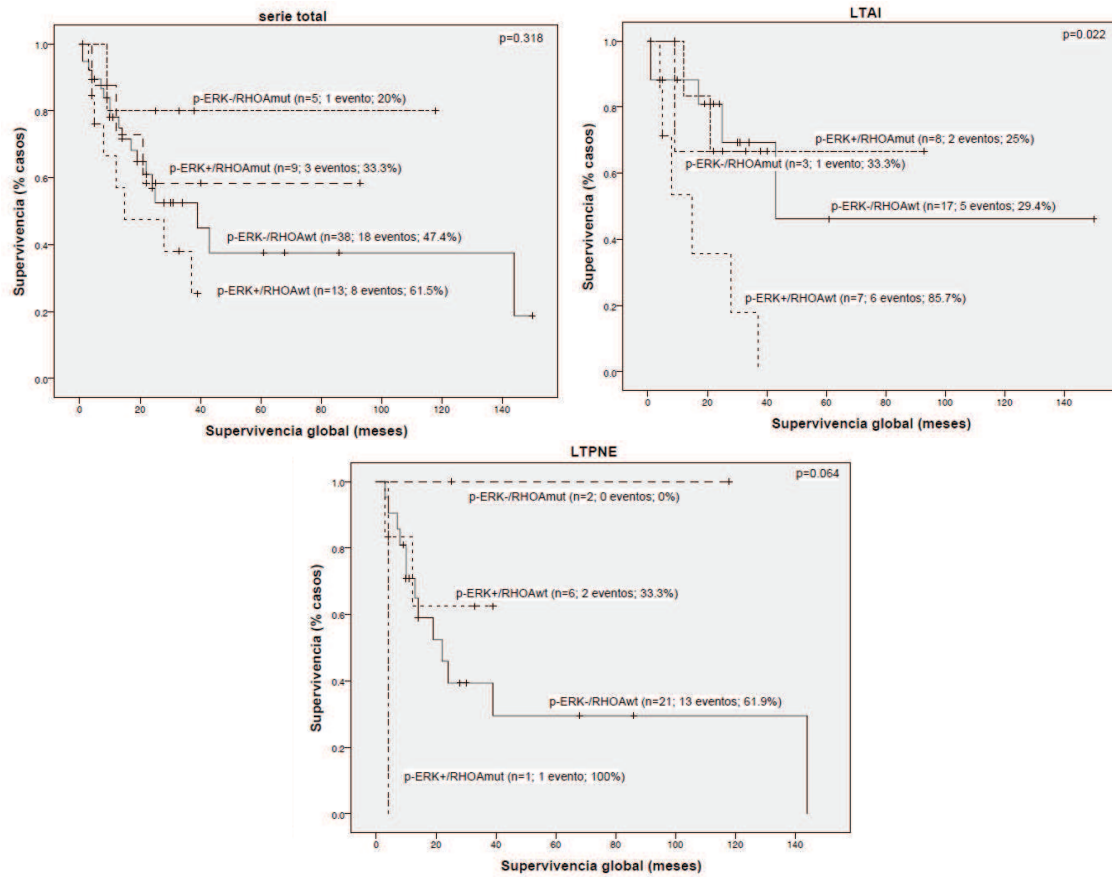


Figura 16. Análisis de la supervivencia global en relación al estatus de la mutación G17V en el gen *RHOA* y la presencia/ausencia de expresión de p-ERK en LTP tratados con CHOP o CHOP-like. El análisis Kaplan-Meier comparando muestra que la ausencia de mutación junto a expresión de p-ERK en células tumorales se correlaciona con pronóstico en el subtipo histológico LTAI (LTAI=Linfoma T Angioinmunoblástico; LTPNE=Linfoma T Periférico no especificado; mut=mutado; wt=no mutado).

No todos los casos que mostraron positividad para p-ERK tienen la mutación G17V en el gen *RHOA*, sugiriendo que existen otras vías de activación de p-ERK en LTP. Por lo tanto, decidimos estudiar mediante PCR y pirosecuenciación mutaciones en los exones 2, 3 y 4 de los genes *KRAS* y *NRAS*, mediante kits comerciales disponibles. Todos los casos p-ERK positivos estudiados fueron negativos para las mutaciones estudiadas en ambos genes. En la Figura 17, se muestra un ejemplo de pirosecuenciación del gen *KRAS* en los codones 12 y 13 del exón 2.

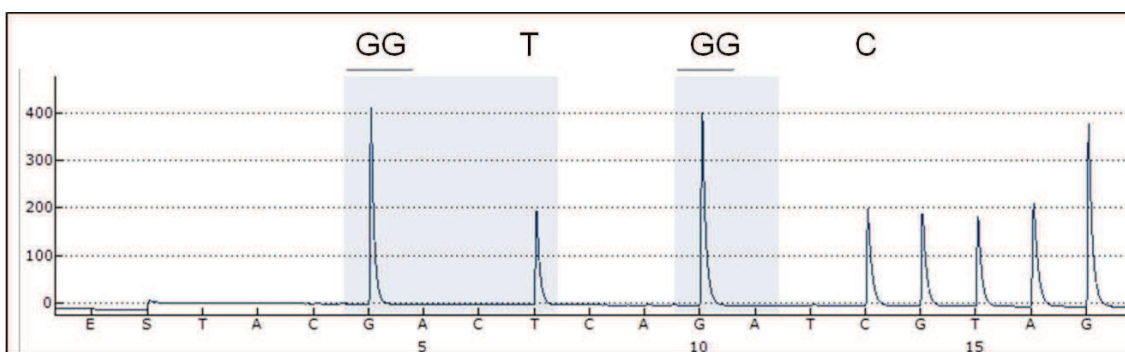


Figura 17. Ejemplo de un caso p-ERK positivo/*RHOA* no mutado analizando por pirosecuenciación mutaciones en los codones 12 y 13 del exón 2 del gen *KRAS*. El análisis revela ausencia de mutación en ambos codones, observándose la secuencia no mutada (codón 12: GGT; codón 13: GGC).

5.2. Mutación S345F en el gen *PLCG1*

5.2.1. Frecuencia mutacional

Debido a la importancia de la vía de señalización de TCR en LTP y ya que *PLCG1* juega un papel crítico en dicha vía como se revisa en la Introducción, decidimos explorar la frecuencia y relevancia biológica de la mutación Ser345Phe (S345F) en nuestra serie de 135 muestras FFIP.

Como se indica en el apartado de Material y Métodos, esta mutación fue estudiada mediante dos técnicas diferentes de qPCR. Sólo aquellos casos que se encontraron positivos por ambas técnicas se consideraron mutados; además, aquellos casos con un Ct de la referencia mayor de 35 se consideraron no valorables, por lo que en este estudio se tuvieron en cuenta 101/135 muestras analizadas. Además, igual que en el caso de la mutación RHOA-G17V, para confirmar los resultados obtenidos, los casos se analizaron mediante amplificación de la región genómica y secuenciación capilar. Encontramos la mutación en un 12.9% de los casos analizados (13/101), comprendiendo 11.7% (7/60) de los casos LTAI y 14.6% (6/41) de LTPNE, de los cuales 1 de los 6 casos mostró características de LTAI ($p=0.662$).

5.2.2. Significado clínico y pronóstico

Decidimos analizar el significado clínico de dicha mutación. Nosotros no encontramos una correlación significativa entre la presencia de la mutación en el gen *PLCG1* y las variables clínicas estudiadas en la serie total (Tabla 17). Al dividir por subtipo histológico, observamos en el grupo de LTPNE una asociación entre la presencia de la mutación *PLCG1*-S345F y la respuesta al tratamiento ($p=0.082$), que no alcanzó significancia estadística probablemente como consecuencia del pequeño número de muestras (6 casos mutados) (datos no mostrados).

Por otro lado, cuando analizamos la supervivencia de los pacientes mediante curvas de Kaplan-Meier, no encontramos una clara asociación entre la presencia de la mutación y el pronóstico; sin embargo, los pacientes diagnosticados de LTPNE que tienen la mutación muestran una menor supervivencia ($p=0.051$) (Figura 18).

Tabla 17. Análisis univariante de los parámetros clínicos y moleculares de 101 pacientes con LTP con respecto al estado mutacional del gen *PLCG1*.

	Casos totales	<i>PLCG1</i> no mutado	<i>PLCG</i> mutado	p-valor
Diagnóstico	101/101			0.662
LTAI		53/60 (88.3%)	7/60 (11.7%)	
LTPNE		35/41 (85.4%)	6/41 (14.6%)	
Sexo	101/101			0.440
Hombre		51/60 (85.0%)	9/60 (15.0%)	
Mujer		37/41 (90.2%)	4/41 (9.8%)	
Edad al diagnóstico	101/101			0.195
<60 años		25/31 (80.6%)	6/31 (19.4%)	
≥60 años		63/70 (90.0%)	7/70 (10.0%)	
IPI	87/101			0.829
Riesgo bajo		23/28 (82.1%)	5/28 (17.9%)	
Riesgo intermedio-bajo		19/22 (86.4%)	3/22 (13.6%)	
Riesgo intermedio-alto		19/21 (90.5%)	2/21 (9.5%)	
Riesgo alto		13/16 (81.2%)	3/16 (18.8%)	
PIT	76/101			0.504
Riesgo bajo		10/11 (90.9%)	1/11 (9.1%)	
Riesgo intermedio-bajo		25/28 (89.3%)	3/28 (10.7%)	
Riesgo intermedio-alto		18/22 (81.8%)	4/22 (18.2%)	
Riesgo alto		11/15 (73.3%)	4/15 (26.7%)	
ECOG	83/101			0.346
<1		52/60 (86.7%)	8/60 (13.3%)	
≥1		18/23 (78.3%)	5/23 (21.7%)	
Tratamiento	84/101			0.413
CHOP o CHOP-like		60/67 (89.6%)	7/67 (10.4%)	
Otros		14/17 (82.4%)	3/17 (17.6%)	
Respuesta	81/101			0.280
Completa		45/51 (88.2%)	6/51 (11.8%)	
Parcial		14/16 (87.5%)	2/16 (12.5%)	
No respuesta		10/14 (71.4%)	4/14 (28.6%)	
Recurrencia	75/101			0.644
No		42/50 (84.0%)	8/50 (16.0%)	
Si		22/25 (88.0%)	3/25 (12.0%)	
Estatus del paciente	193/101			0.212
Muerto		47/57 (82.5%)	10/57 (17.5%)	
Vivo		33/36 (91.7%)	3/36 (8.3%)	

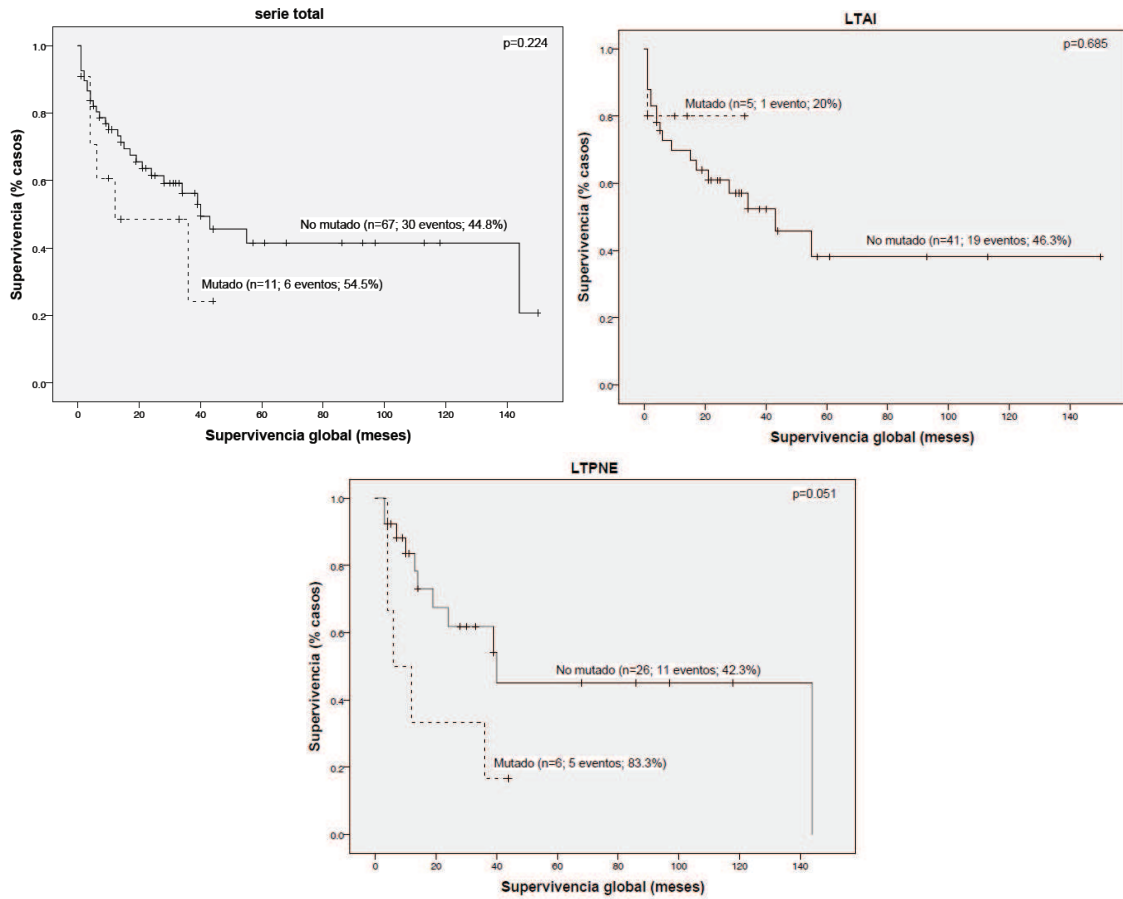


Figura 18. Análisis de la supervivencia global de acuerdo a la presencia de la mutación S345F en el gen *PLCG1* en LTP. El análisis Kaplan-Meier comparando casos mutados y no mutados muestra un peor pronóstico en los casos LTPNE mutados (LTAI=Linfoma T Angioinmunoblástico; LTPNE=Linfoma T Periférico no especificado).

5.2.3. Correlación entre la presencia de la mutación PLCG1-S345F y la expresión de marcadores subrogados de vías de señalización implicadas en LTP

Realizamos inmunohistoquímica de los TMAs construidos. El porcentaje de positividad de cada marcador utilizado en este estudio se muestra en la Tabla 3. Los estudios inmunohistoquímicos revelaron positividad para CD3 en un 87.1% (88/101), CD30 en un 16.8% (17/101) y Ki-67 en un 21.8% (22/101) de los casos. Además, se destacó la presencia nuclear de NFATc1 en un 66.3% (67/101), p-ERK en un 29.7% (30/101), p50 en un 73.3% (74/101), p52 en un 61.4% (62/101) y GATA3 en un 25.7% (26/101) de los casos.

Encontramos una correlación significativa directa entre la presencia de la mutación PLCG1-S345F y la expresión de CD30 ($p < 0.001$), p50 ($p = 0.027$) y GATA3 ($p = 0.044$) (Figura 19). Observamos que 7/13 casos mutados expresaron CD30, mientras que 10/88 casos no mutados también son positivos para CD30. Por su parte, el 100% de los casos mutados (13/13) expresaron p50 en el núcleo. Además, 7/13 casos mutados expresaron GATA3, mientras que 19/88 casos no mutados también fueron positivos para GATA3. No encontramos una correlación significativa entre la presencia de la mutación y la expresión de NFATc1 ($p = 0.754$), CD3 ($p = 0.368$), p-ERK ($p = 0.118$) y p52 ($p = 0.294$).

Cuando analizamos la presencia de la mutación con respecto a la expresión de los marcadores subrogados según el tipo histológico diagnosticado, nosotros encontramos que la relación estadística entre la mutación y la expresión de CD30 se mantuvo en ambos grupos histológicos LTAI ($p = 0.004$) y LTPNE ($p = 0.030$); mientras que la relación entre la mutación y la expresión de GATA3 sólo se mantuvo en el subtipo histológico LTAI ($p = 0.027$).

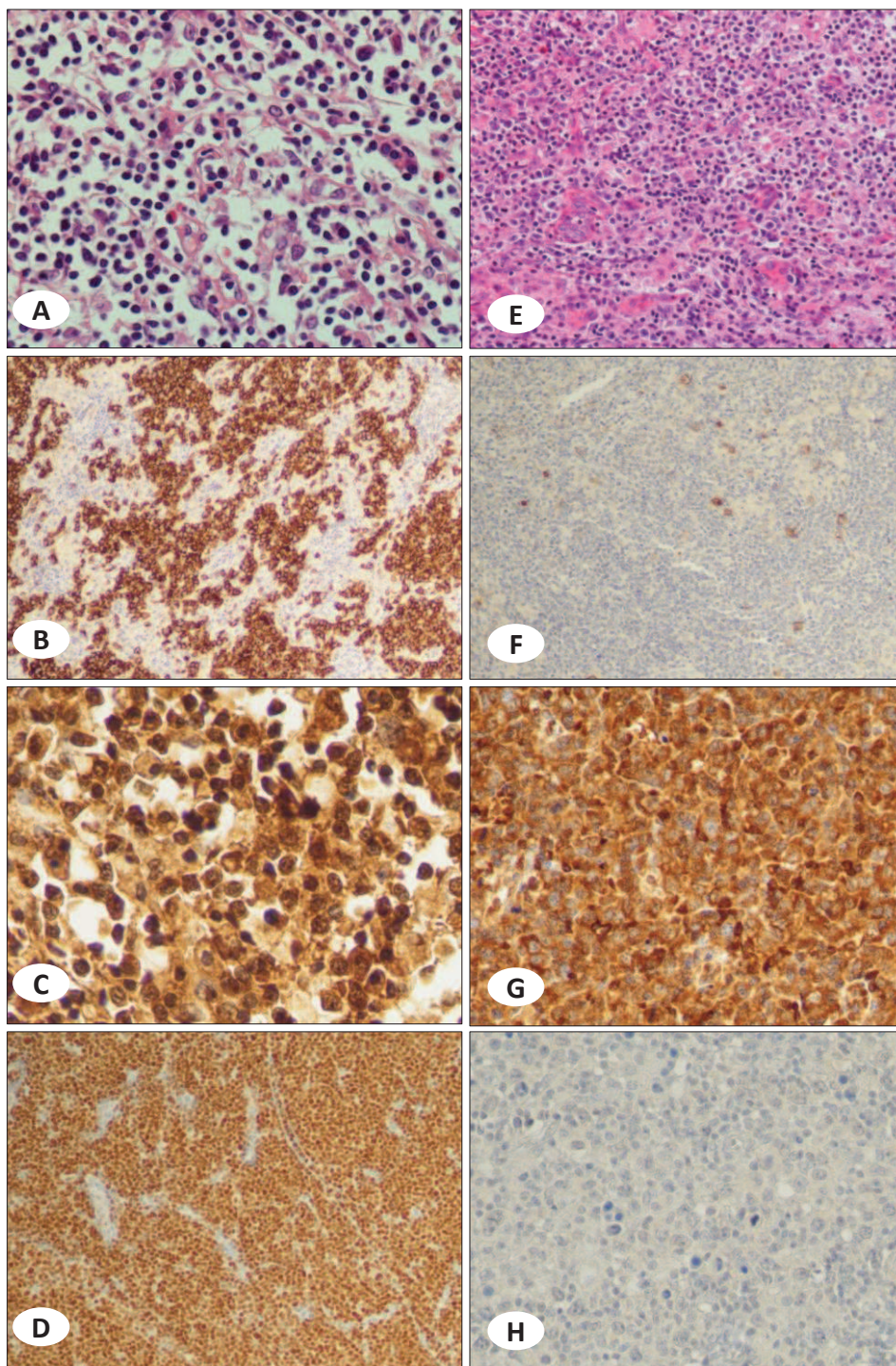


Figura 19. Imágenes representativas correspondientes a un caso con la mutación S345F en el gen *PLCG1* (A-D) y un caso no mutado (E-H) respectivamente. A y E) Hematoxilina-eosina. B y F) Detección de CD30 mostrando positividad en el caso mutado (B) y pérdida de expresión en las células tumorales en un caso no mutado (F). C y G) Detección de p50. Se muestra expresión nuclear de p50 en un caso mutado (C), mientras que dicha expresión se observa en el citoplasma en el caso no mutado (G). D y H) Detección de GATA3 mostrando positividad en el caso mutado (D) y no expresión en un caso no mutado (H).

5.3. Estudio de secuenciación de última generación (NGS)

Debido a los resultados obtenidos en los estudios de las mutaciones puntuales en los genes *RHOA* y *PLCG1* mediante discriminación alélica a través de qPCR y a lo descrito en la literatura, decidimos ampliar los genes a estudiar y para ello recurrimos a la tecnología de NGS, ya que permite estudiar la región codificante entera de un gen y diferentes genes en un número elevado de muestras.

Para este estudio se ha utilizado un panel diseñado para enriquecer el ADN en secuencias de interés, compuesto por 48 genes descritos previamente mutados en linfomas de célula T (Tabla 5). Se ha utilizado una serie compuesta por 166 muestras FFIP (97 LTAI y 69 LTPNE). Tras la cuantificación de la concentración del ADN_g mediante el Qubit y el estudio de su calidad mediante qPCR, fueron aptas para continuar con la técnica 120/166 muestras. Se prepararon las librerías según el sistema AmpliSeq y se testó la calidad de las mismas mediante qPCR; 22 de ellas no tuvieron la calidad suficiente para llevar a cabo la secuenciación, por lo que finalmente se secuenciaron 98 muestras (58 LTAI y 40 LTPNE). Para todas las muestras secuenciadas, nosotros analizamos la profundidad de cobertura de cada amplicón, que corresponde al número de veces que cada base del genoma está presente en cada lectura; esto es determinante para poder evaluar la fiabilidad del nucleótido asignado a una posición determinada. Basado en nuestros datos, definimos una profundidad media mayor o igual a 30X y una frecuencia mutacional mayor o igual al 5%. Estos límites fueron seleccionados basándonos en la ausencia de variantes falsos positivos o falsos negativos. Por otro lado, no se tuvieron en cuenta las variantes sinónimas ni aquellas presentes en las regiones intrónicas. Como se comenta en el apartado de Material y Métodos, las variantes fueron visualizadas con el programa IGV.

Como se comenta en la Introducción, en la revisión del año 2016 sobre la clasificación de las neoplasias de células T maduras y células NK, la OMS divide a los LTP ganglionares en LTAI, LTPNE y LTP con fenotipo T_{FH} (LTP-TFH)¹. En base a esta clasificación, nosotros decidimos agrupar la serie de muestras utilizadas en el estudio de NGS según este criterio: 58 LTAI, 22 LTPNE y 18 LTP-TFH. Para definir los casos tuvimos en cuenta el fenotipo T_{FH}, el cual viene definido por la expresión de al menos dos marcadores T_{FH}. En nuestra serie, se observó un 68.9% de casos LTAI con expresión en PD-1, 75.5% con expresión de BCL6, 67.4% con expresión de ICOS,

9.1% con expresión de CD10 y 64.5% con expresión de CXCL13. Por otro lado, observamos un 24.4% de casos LTP-TFH con expresión de PD-1, 24.5% casos BCL6 positivos, 32.5% casos ICOS positivos, 1.3% casos CD10 positivos y 24.2% con expresión de CXCL13. Finalmente, en el caso de los LTPNE, sólo observamos casos con expresión de PD-1 (6.7%) y CXCL13 (11.3%) (Tabla 18). El porcentaje de positividad de cada marcador se muestra en la Tabla 3.

Tabla 18. Comparación de la expresión inmunohistoquímica de los marcadores de fenotipo T_{FH} (LTAI=Linfoma T Angioinmunoblástico; LTPNE=Linfoma T Periférico no especificado; LTP-TFH=Linfoma T Periférico con fenotipo T_{FH}).

	LTAI	LTP-TFH	LTPNE
Cualquier positivo (>10%)			
PD-1	31/45 (68.9%)	11/45 (24.4%)	3/45 (6.7%)
BCL6	40/53 (75.5%)	13/53 (24.5%)	0/53 (0%)
ICOS	27/40 (67.5%)	13/40 (32.5%)	0/40 (0%)
CD10	7/77 (9.1%)	1/77 (1.3%)	0/77 (0%)
CXCL13	40/62 (64.5%)	15/62 (24.2%)	7/62 (11.3%)
Alta expresión (>50%)			
PD-1	21/31 (67.7%)	7/11 (63.6%)	3/3 (100%)
BCL6	24/41 (58.5%)	5/12 (41.7%)	0/0 (0%)
ICOS	15/27 (55.6%)	8/13 (61.5%)	0/0 (0%)
CD10	3/7 (42.8%)	0/1 (0%)	0/0 (0%)
CXCL13	23/40 (57.5%)	12/15 (80%)	6/7 (85.7%)

Además, encontramos que la expresión de dos marcadores de fenotipo T_{FH} se observó en los casos LTAI y LTP-TFH, pero no en los casos LTPNE (Tabla 19). Observamos un solapamiento en la expresión del fenotipo T_{FH} entre LTAI y LTP-TFH (Tablas 18 y 19).

Tabla 19. Comparación de la expresión inmunohistoquímica de la combinación de dos marcadores de fenotipo T_{FH} (LTAI=Linfoma T Angioinmunoblástico; LTPNE=Linfoma T Periférico no especificado; LTP-TFH=Linfoma T Periférico con fenotipo T_{FH}).

	LTAI (n=58)	LTP-TFH (n=18)	LTPNE (n=22)	p-valor
PD-1/BCL6	21 (36.2%)	9 (50%)	0 (0%)	<0.001
PD-1/ICOS	18 (31%)	8 (44.4%)	0 (0%)	0.097
PD-1/CXCL13	27 (46.6%)	8 (44.4%)	0 (0%)	0.091
PD-1/CD10	5 (8.6%)	1 (5.6%)	0 (0%)	0.502
BCL6/ICOS	20 (34.5%)	8 (44.4%)	0 (0%)	<0.001
BCL6/CD10	6 (10.3%)	1 (5.6%)	0 (0%)	<0.001
BCL6/CXCL13	29 (50%)	10 (55.6%)	0 (0%)	<0.001
ICOS/CD10	5 (8.6%)	1 (5.6%)	0 (0%)	0.005
CXCL13/CD10	7 (12.1%)	1 (5.6%)	0 (0%)	0.323
ICOS/CXCL13	25 (43.1%)	11 (61.1%)	0 (0%)	0.023

Teniendo en cuenta esta nueva clasificación, quisimos analizar la supervivencia de los pacientes mediante curvas de Kaplan-Meier en nuestra serie de estudio; este análisis no demostró diferencias significativas entre estas entidades (Figura 20).

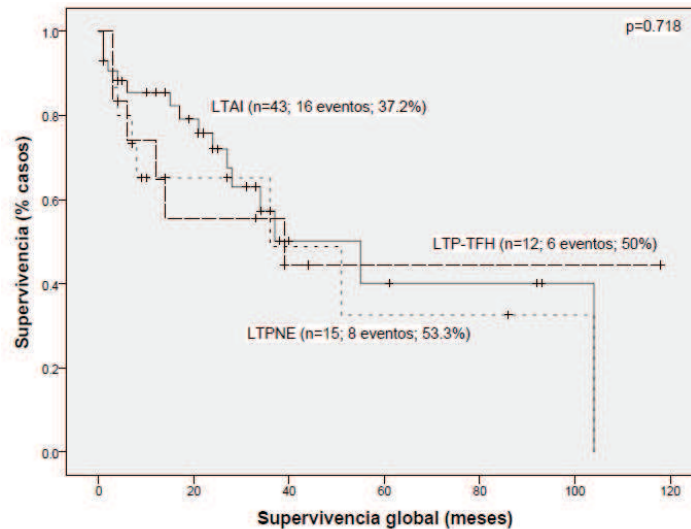


Figura 20. Impacto en la supervivencia global de los subtipos histológicos en los que se diferencian los LTP ganglionares, según la clasificación de la OMS del año 2016 ¹. El análisis Kaplan-Meier comparando casos con LTAI, LTPNE y LTP-TFH no mostró significancias estadísticas (LTAI=Linfoma T Angioinmunoblástico; LTPNE=Linfoma T Periférico no especificado; LTP-TFH=Linfoma T Periférico con fenotipo T_{FH}).

El estudio mutacional mediante la tecnología de AmpliSeq, reveló que un 56.1% (55/98) de las muestras mostraron mutaciones, mientras que el 43.9% restante (43/98) no mostraron mutaciones en ninguno de los genes presentes en el panel de estudio. En la Tabla 20 se muestran las mutaciones encontradas en cada una de las muestras. Curiosamente, hay genes del panel diseñado en los que no se encuentran mutaciones. Es importante resaltar que hay variantes con una carga mutacional $\leq 10\%$, por lo que no habrían sido detectadas mediante la secuenciación Sanger.

RESULTADOS II

Tabla 20. Características de las mutaciones encontradas en 59/98 muestras de LTP analizadas mediante NGS. Los pacientes sin mutaciones en genes del panel diseñado, se han omitido en esta tabla (aa=aminoácido; LTAI=Linfoma T Angioinmunoblástico; LTPNE=Linfoma T Periférico no especificado; LTP-TFH=Linfoma T Periférico con fenotipo T_{FH}).

	Diagnóstico	Vía de señalización	Gen	Locus	Cambio aa	Cambio ADN	Frecuencia alelo mutado (%)	Tipo de mutación	Predicción Funcional
1	LTPNE	PI3K	<i>LPL</i>	chr8:19822860	UTR 3'		36		UTR 3'
		JAK/STAT	<i>JAK1</i>	chr1:65305426	p.Thr901Arg	c.2702C>G	27	missense	Probablemente Perjudicial
2	LTPNE	EPIGENETICA	<i>TET2</i>	chr4:106182980	p.Leu1340Arg	c.4019T>G	17	missense	Probablemente Perjudicial
3	LTAI	RHO GTPASAS	<i>RHOA</i>	chr3:49412973	p.Gly17Val	c.50G>T	7	missense	Probablemente Perjudicial
		EPIGENETICA	<i>IDH2</i>	chr15:90631838	p.Arg172Lys	c.515G>A	5	missense	Probablemente Perjudicial
4	LTAI	RHO GTPASAS	<i>RHOA</i>	chr3:49412973	p.Gly17Val	c.50G>T	6	missense	Probablemente Perjudicial
		EPIGENETICA	<i>IDH2</i>	chr15:90631839	p.Arg172Gly	c.514A>G	5	missense	Probablemente Perjudicial
5	LTPNE	CALCINEURINA	<i>PLCG1</i>	chr20:39794105	p.Tyr509His	c.1525T>C	9	missense	Probablemente Perjudicial
		RHO GTPASAS	<i>RHOA</i>	chr3:49412973	p.Gly17Val	c.50G>T	9	missense	Probablemente Perjudicial
		EPIGENETICA	<i>IDH2</i>	chr15:90631838	p.Arg172Lys	c.515G>A	9	missense	Probablemente Perjudicial
6	LTPNE	RHO GTPASAS	<i>RHOA</i>	chr3:49412973	p.Gly17Val	c.50G>T	8	missense	Probablemente Perjudicial
		EPIGENETICA	<i>TET2</i>	chr4:106180777	p.Arg1269Ter	c.3805A>T	21	nonsense	Significado incierto
		NF-KB	<i>CARD11</i>	chr7:2962903	p.Thr669Ala	c.2005A>G	6	missense	Neutral
		EPIGENETICA	<i>IDH2</i>	chr15:90631837	p.Arg172Ser	c.516G>T	10	missense	Probablemente Perjudicial
		CALCINEURINA	<i>PLCG1</i>	chr20:39802861	p.Gly1248Ala	c.3743G>C	44	missense	Probablemente Perjudicial
7	LTAI	EPIGENETICA	<i>TET2</i>	chr4:106193940	p.Lys1468Ter	c.4402A>T	34	nonsense	Significado incierto
8	LTPNE	PI3K	<i>PTEN</i>	chr10:89720683	p.Phe278Leu	c.834C>G	28	missense	Probablemente Perjudicial
9	LTPNE	EPIGENETICA	<i>TET2</i>	chr4:106157290	p.Gln731Ter	c.2191C>T	24	nonsense	Probablemente Perjudicial
10	LTPNE	NF-KB	<i>CARD11</i>	chr7:2985521	p.Phe97Tyr	c.290T>A	15	missense	Probablemente Perjudicial
		PI3K	<i>CSF2RB</i>	chr22:37333891	p.Pro681Ser	c.2041C>T	5	missense	Probablemente Benigna
11	LTP-TFH	EPIGENETICA	<i>DNMT3A</i>	chr2:25464444	p.Val690Asp	c.2069T>A	5	missense	Probablemente Perjudicial
12	LTAI	RHO GTPASAS	<i>RHOA</i>	chr3:49412973	p.Gly17Val	c.50G>T	7	missense	Probablemente Perjudicial
		EPIGENETICA	<i>TET2</i>	chr4:106182980	p.Leu1340Arg	c.4019T>G	30	missense	Probablemente Perjudicial
		EPIGENETICA	<i>IDH2</i>	chr15:90631837	p.Arg172Ser	c.516G>T	7	missense	Probablemente Perjudicial

Tabla 20. (Continuación)

	Diagnóstico	Vía de señalización	Gen	Locus	Cambio aa	Cambio ADN	Frecuencia alelo mutado (%)	Tipo de mutación	Predicción Funcional
13	LTAI	EPIGENETICA	<i>TET2</i>	chr4:106157730	p.Asp877Glu	c.2631T>G	19	missense	Probablemente Benigna
14	LTAI	RHO GTPASAS	<i>PAK7</i>	chr20:9561424	p.Ala120Thr	c.358G>A	9	missense	Probablemente Benigna
		RHO GTPASAS	<i>RHOA</i>	chr3:49412973	p.Gly17Val	c.50G>T	5	missense	Probablemente Perjudicial
15	LTAI	RHO GTPASAS	<i>RHOA</i>	chr3:49412973	p.Gly17Val	c.50G>T	11	missense	Probablemente Perjudicial
16	LTAI	NF-KB	<i>TNFRSF21</i>	chr6:47277162	p.Ser29Phe	c.86C>T	5	missense	Desconocido
17	LTP-TFH	NF-KB	<i>FAS</i>	chr10:90773098	splicesite_5		7		Aceptor de empalme (splice)
18	LTAI	EPIGENETICA	<i>DNMT3A</i>	chr2:25463248	p.Arg749Gly	c.2245C>G	16	missense	Probablemente Perjudicial
19	LTAI	EPIGENETICA	<i>TET2</i>	chr4:106194028	p.Ser1497Ter	c.4490C>A	19	nonsense	Ninguna
		EPIGENETICA	<i>DNMT3A</i>	chr2:25463300	p.Phe731Leu	c.2193C>G	30	missense	Probablemente Perjudicial
		RHO GTPASAS	<i>RHOA</i>	chr3:49412973	p.Gly17Val	c.50G>T	18	missense	Probablemente Perjudicial
		EPIGENETICA	<i>IDH2</i>	chr15:90631837	p.Arg172Ser	c.516G>T	5	missense	Probablemente Perjudicial
20	LTAI	EPIGENETICA	<i>TET2</i>	chr4:106156729	p.Arg544Ter	c.1630C>T	23	nonsense	Neutral
		PI3K	<i>PTEN</i>	chr10:89720683	p.Phe278Leu	c.834C>G	30	missense	Probablemente Perjudicial
21	LTPNE	PI3K	<i>LPL</i>	chr8:19816849	p.Leu366Pro	c.1097T>C	50	missense	Probablemente Perjudicial
		CICLO CELULAR	<i>TP53</i>	chr17:7577517	p.Ile255Ser	c.764T>G	67	missense	Probablemente Perjudicial
22	LTPNE	EPIGENETICA	<i>TET2</i>	chr4:106196886	p.Leu1740Ter	c.5219T>G	13	nonsense	Neutral
23	LTAI	EPIGENETICA	<i>TET2</i>	chr4:106180864	p.Cys1298Ser	c.3892T>A	22	missense	Probablemente Perjudicial
		RHO GTPASAS	<i>CD36</i>	chr7:80301307	p.Gly359Ala	c.1076G>C	32	missense	Probablemente Perjudicial
		RHO GTPASAS	<i>RHOA</i>	chr3:49412973	p.Gly17Val	c.50G>T	21	missense	Probablemente Perjudicial
		EPIGENETICA	<i>IDH2</i>	chr15:90631837	p.Arg172Ser	c.516G>T	20	missense	Probablemente Perjudicial
24	LTAI	EPIGENETICA	<i>TET2</i>	chr4:106156343	p.Val415Glu	c.1244_1245delTTinsAA	10	missense	Significado incierto
		CALCINEURINA	<i>PLCG1</i>	chr20:39794433	p.Glu589Val	c.1766A>T	6	missense	Probablemente Perjudicial
		JAK/STAT	<i>STAT1</i>	chr2:191844538	p.Glu563Lys	c.1687G>A	6	missense	Probablemente Perjudicial
25	LTAI	NF-KB	<i>NLRP2</i>	chr19:55495098	splicesite_3		50		Donador de empalme (splice)

Tabla 20. (Continuación)

	Diagnóstico	Vía de señalización	Gen	Locus	Cambio aa	Cambio ADN	Frecuencia alelo mutado (%)	Tipo de mutación	Predicción Funcional
26	LTAI	EPIGENETICA	<i>DNMT3A</i>	chr2:25463287	p.Arg736Cys	c.2206C>T	10	missense	Probablemente Perjudicial
		RHO GTPASAS	<i>RHOA</i>	chr3:49412973	p.Gly17Val	c.50G>T	7	missense	Probablemente Perjudicial
		EPIGENETICA	<i>IDH2</i>	chr15:90631839	p.Arg172Gly	c.514A>G	7	missense	Probablemente Perjudicial
27	LTAI	EPIGENETICA	<i>TET2</i>	chr4:106193995	p.Ser1486Ter	c.4457C>G	33	nonsense	Ninguna
		RHO GTPASAS	<i>RHOA</i>	chr3:49412973	p.Gly17Val	c.50G>T	6	missense	Probablemente Perjudicial
28	LTAI	JAK/STAT	<i>CCR4</i>	chr3:32995907	p.Tyr331Ter	c.993C>G	6	nonsense	Ninguna
29	LTAI	EPIGENETICA	<i>TET2</i>	chr4:106193931	p.Arg1465Ter	c.4393C>T	5	nonsense	Probablemente Perjudicial
30	LTAI	NF-KB	<i>CARD11</i>	chr7:2998160	UTR 5'		51		UTR 5'
31	LTAI	EPIGENETICA	<i>DNMT3A</i>	chr2:25463320	spliceite_5		53		Aceptor de empalme (splice)
		EPIGENETICA	<i>TET2</i>	chr4:106180893	p.Arg1307Ser	c.3921G>T	38	missense	Probablemente Perjudicial
		TCR	<i>PDCD1</i>	chr2:242793408	p.Tyr223Ter	c.669T>A	9	nonsense	Significado incierto
		EPIGENETICA	<i>TET2</i>	chr4:106180926	p.Glu1318Asp	c.3954G>C	24	missense	Probablemente Perjudicial
32	LTAI	EPIGENETICA	<i>TET2</i>	chr4:106190828	p.Ser1369Ter	c.4106C>G	19	nonsense	Probablemente Perjudicial
		RHO GTPASAS	<i>RHOA</i>	chr3:49412973	p.Gly17Val	c.50G>T	18	missense	Probablemente Perjudicial
33	LTAI	EPIGENETICA	<i>TET2</i>	chr4:106180791	p.Cys1273Trp	c.3819T>G	64	missense	Probablemente Perjudicial
		RHO GTPASAS	<i>RHOA</i>	chr3:49412973	p.Gly17Val	c.50G>T	34	missense	Probablemente Perjudicial
		CICLO CELULAR	<i>RB1</i>	chr13:48941688	p.Ala333Glu	c.998C>A	32	missense	Probablemente Perjudicial
		MAPK	<i>MAP3K5</i>	chr6:137113178	p.Glu40Lys	c.118G>A	8	missense	Probablemente Benigna
34	LTAI	RHO GTPASAS	<i>RHOA</i>	chr3:49412973	p.Gly17Val	c.50G>T	14	missense	Probablemente Perjudicial
35	LTPNE	EPIGENETICA	<i>TET2</i>	chr4:106197276	p.Ser1870Leu	c.5609C>T	18	missense	Probablemente Perjudicial
36	LTAI	NF-KB	<i>CARD11</i>	chr:2946262	UTR 3'		5		UTR 3'
37	LTAI	EPIGENETICA	<i>TET2</i>	chr4:106190765	spliceite_5		8		Aceptor de empalme (splice)
		RHO GTPASAS	<i>RHOA</i>	chr3:49412973	p.Gly17Val	c.50G>T	6	missense	Probablemente Perjudicial
38	LTAI	RHO GTPASAS	<i>RHOA</i>	chr3:49412973	p.Gly17Val	c.50G>T	17	missense	Probablemente Perjudicial
39	LTAI	EPIGENETICA	<i>TET2</i>	chr4:106180868	p.Lys1299Thr	c.3896A>C	39	missense	Probablemente Perjudicial
		EPIGENETICA	<i>TET2</i>	chr4:106190791	p.Glu1357Ter	c.4069G>T	46	nonsense	Significado incierto
		PI3K	<i>PTEN</i>	chr10:89720683	p.Phe278Leu	c.834C>G	23	missense	Probablemente Perjudicial

Tabla 20. (Continuación)

	Diagnóstico	Vía de señalización	Gen	Locus	Cambio aa	Cambio ADN	Frecuencia alelo mutado (%)	Tipo de mutación	Predicción Funcional
40	LTAI	JAK/STAT	<i>JAK1</i>	chr1:65301158	p.Gly1097Val	c.3290G>T	16	missense	Probablemente Perjudicial
		EPIGENETICA	<i>TET2</i>	chr4:106163989	spliceite_5		14		Aceptor de empalme (splice)
41	LTP-TFH	RHO GTPASAS	<i>CD36</i>	chr7:80285916	p.Val61Phe	c.181G>T	6	missense	Probablemente Perjudicial
42	LTAI	CALCINEURINA	<i>PLCG1</i>	chr20:39803193	UTR 3'		48		UTR 3'
43	LTP-TFH	MAPK	<i>RASA1</i>	chr5:86658459	p.Ile475Thr	c.1424T>C	9	missense	Probablemente Perjudicial
44	LTP-TFH	TCR	<i>PDCD1</i>	chr2:242794124	p.Ala202Thr	c.604G>A	5	missense	Probablemente Benigna
45	LTP-TFH	RHO GTPASAS	<i>RHOA</i>	chr3:49412973	p.Gly17Val	c.50G>T	17	missense	Probablemente Perjudicial
		EPIGENETICA	<i>IDH2</i>	chr15:90631838	p.Arg172Lys	c.515G>A	18	missense	Probablemente Perjudicial
46	LTAI	EPIGENETICA	<i>TET2</i>	chr4:106158419	p.Ser1107Ter	c.3320C>G	6	nonsense	Significado incierto
47	LTP-TFH	NF-KB	<i>RC3H1</i>	chr1:173915737	p.Ile946Met	c.2838A>G	47	missense	Probablemente Benigna
48	LTAI	RHO GTPASAS	<i>RHOA</i>	chr3:49412973	p.Gly17Val	c.50G>T	16	missense	Probablemente Perjudicial
		HEDGEHOG	<i>GLI3</i>	chr7:42065902	p.Leu380Val	c.1138C>G	52	missense	Probablemente Perjudicial
		EPIGENETICA	<i>IDH2</i>	chr15:90631839	p.Arg172Gly	c.514A>G	10	missense	Probablemente Perjudicial
49	LTAI	RHO GTPASAS	<i>RHOA</i>	chr3:49412973	p.Gly17Val	c.50G>T	8	missense	Probablemente Perjudicial
50	LTAI	RHO GTPASAS	<i>RHOA</i>	chr3:49412973	p.Gly17Val	c.50G>T	21	missense	Probablemente Perjudicial
51	LTAI	EPIGENETICA	<i>DNMT3A</i>	chr2:25457161	p.Phe909Ser	c.2726T>C	22	missense	Probablemente Perjudicial
		RHO GTPASAS	<i>RHOA</i>	chr3:49412973	p.Gly17Val	c.50G>T	22	missense	Probablemente Perjudicial
52	LTAI	EPIGENETICA	<i>DNMT3A</i>	chr2:25458607	p.Glu856Ter	c.2566G>T	19	nonsense	Probablemente Perjudicial
		RHO GTPASAS	<i>RHOA</i>	chr3:49412973	p.Gly17Val	c.50G>T	5	missense	Probablemente Perjudicial
		EPIGENETICA	<i>TET2</i>	chr4:106197363	p.Leu1899Pro	c.5696T>C	6	missense	Probablemente Perjudicial
		PI3K	<i>PTEN</i>	chr10:89720683	p.Phe278Leu	c.834C>G	24	missense	Probablemente Perjudicial
53	LTPNE	JAK/STAT	<i>JAK1</i>	chr1:65311225	p.Lys696Glu	c.2086A>G	9	missense	Probablemente Perjudicial
		PI3K	<i>PIK3C2B</i>	chr1:204438203	p.Thr243Ser	c.728C>G	37	missense	Probablemente Benigna
		PI3K	<i>PTEN</i>	chr10:89690806	p.Cys71Ter	c.213T>A	6	nonsense	Probablemente Perjudicial
		CICLO CELULAR	<i>TP53</i>	chr17:7578455	p.Ala159Pro	c.475G>C	57	missense	Probablemente Perjudicial

Tabla 20. (Continuación)

	Diagnóstico	Vía de señalización	Gen	Locus	Cambio aa	Cambio ADN	Frecuencia alelo mutado (%)	Tipo de mutación	Predicción Funcional
54	LTP-TFH	EPIGENETICA	<i>TET2</i>	chr4:106162586	p.Arg1167Met	c.3500G>T	28	missense	Probablemente Perjudicial
		JAK/STAT	<i>STAT3</i>	chr17:40475330	p.Asp566Asn	c.1696G>A	7	missense	Probablemente Perjudicial
55	LTAI	RHO GTPASAS	<i>RHOA</i>	chr3:49412973	p.Gly17Val	c.50G>T	8	missense	Probablemente Perjudicial
		EPIGENETICA	<i>IDH2</i>	chr15:90631839	p.Arg172Gly	c.514A>G	8	missense	Probablemente Perjudicial

Observamos que la frecuencia de mutaciones en los casos LTAI fue mayor que en los otros dos subtipos histológicos (Tabla 21). En la Figura 21, se observa un grupo de casos con alta carga mutacional y fenotipo T_{FH}.

Tabla 21. Comparación del estatus mutacional en los diferentes subtipos histológicos de LTP (LTAI=Linfoma T Angioinmunoblástico; LTPNE=Linfoma T Periférico no especificado; LTP-TFH=Linfoma T Periférico con fenotipo T_{FH}).

	LTAI (n=58)	LTP-TFH (n=18)	LTPNE (n=22)	p-valor
RHOA-G17V	20 (34.5%)	1 (5.6%)	2 (9.1%)	0.008
IDH2	8 (13.8%)	1 (5.6%)	2 (9.1%)	0.587
TET2	17 (29.3%)	2 (11.1%)	4 (18.2%)	0.226
DNMT3A	6 (10.3%)	1 (5.6%)	0 (0%)	0.265
TCR	1 (1.7%)	1 (5.6%)	0 (0%)	0.471
Calcineurina	2 (3.4%)	0 (0%)	2 (9.1%)	0.477
RHO GTPasas	2 (3.4%)	1 (5.6%)	0 (0%)	0.590
PI3K	3 (5.2%)	0 (0%)	5 (22.7%)	0.012
NF-κB	4 (6.9%)	2 (11.1%)	2 (9.1%)	0.839
JAK/STAT	3 (5.2%)	2 (11.1%)	2 (9.1%)	0.568
MAPK	1 (1.7%)	1 (5.6%)	0 (0%)	0.463
Ciclo celular	2 (3.4%)	0 (0%)	1 (4.5%)	0.672

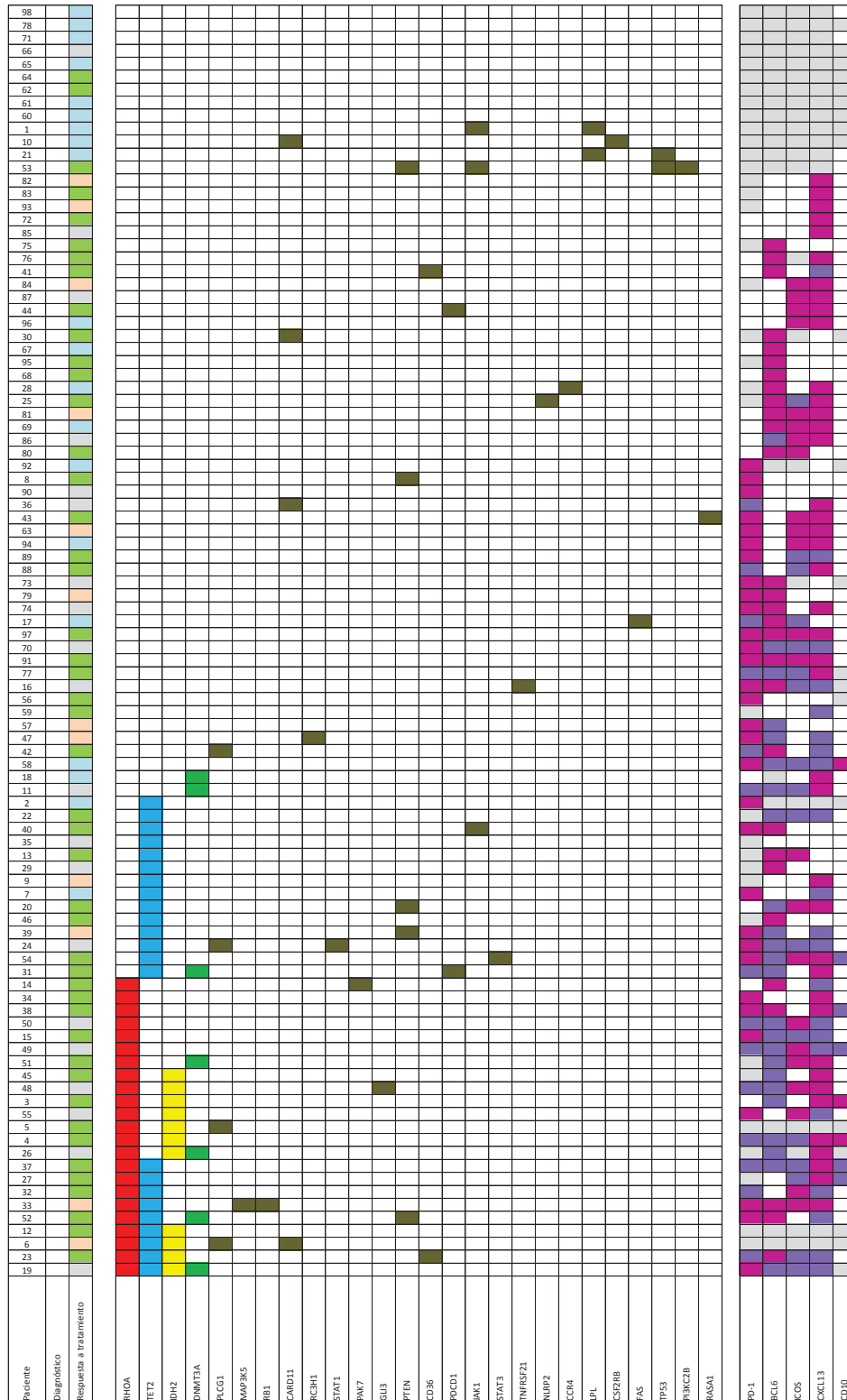


Figura 21. Representación del estatus mutacional y la expresión de marcadores de fenotipo T_{FH} . Se muestran los resultados de la secuenciación de 58 LTAI (gris oscuro), 23 LTPNE (gris claro con rayas horizontales) y 18 LTP-TFH (blanco con rayas). Los genes *RHOA*, *TET2*, *IDH2* y *DNMT3A* están indicados por los colores rojo, azul, amarillo y verde, respectivamente. Otros genes recurrentemente mutados se representan de marrón. Los pacientes (columnas) se organizan basándose en su estado mutacional según la clasificación del gen y marcadores IHQ. Positividad para los marcadores T_{FH} :

Morado: >10%; Rosa: >50% de células tumorales positivas. La ausencia mutacional e IHQ se representa en blanco. La ausencia de dato se representa en gris claro. Además, se representa el dato de respuesta al tratamiento recibido (Verde: respuesta completa; Azul claro: respuesta parcial; Blanco: no respuesta; Gris claro: no dato).

Las mutaciones encontradas fueron analizadas de acuerdo a la vía de señalización de la que forme parte el gen mutado. Estudiando en cada caso la frecuencia mutacional y el significado pronóstico, así como la correlación con la expresión de marcadores subrogados de vías de señalización implicadas en LTP.

Vía de señalización de las RHO GTPasas y reguladores epigenéticos.

Encontramos un 23.5% (23/98) de casos con mutaciones en el gen *RHOA*, siendo exclusivamente el cambio G17V. Dicha mutación fue más frecuente en los casos diagnosticados de LTAI (20/59; 33.9%) que en LTPNE (2/22; 9.1%) y en los LTP-TFH (1/17; 5.9%) ($p=0.011$). Curiosamente, encontramos un subgrupo de pacientes sólo con la mutación *RHOA*-G17V (Figura 21).

Por otro lado, encontramos un 23.5% (23/98) de casos con mutaciones en el gen *TET2* (17 LTAI, 4 LTPNE y 2 LTP-TFH); entre ellos también encontramos otro subgrupo de pacientes sólo con mutaciones en *TET2* (Figura 21). Además, 12/23 casos con mutaciones en *TET2* generan un codón de parada prematuro, lo que sugiere la formación de una proteína trunca.

Encontramos un 11.2% (11/98) de casos (8 LTAI, 2 LTPNE y 1 LTP-TFH) con mutaciones que afectan al mismo codón en el gen *IDH2*, aunque da lugar a distintas sustituciones (4 R172S, 4 R172G y 3 R172K) y un 7.1% (7/98) de casos con mutaciones en el gen *DNMT3A* (6 LTAI y 1 LTP-TFH) (Tablas 20 y 21).

La presencia de la mutación *RHOA*-G17V se asoció de forma significativa con la presencia de mutaciones en los genes *IDH2*, *TET2* y *DNMT3A* ($p<0.001$, 0.043, 0.029 respectivamente). Todas las muestras con mutación en *IDH2* también mostraron mutación en *RHOA*. Por su parte, los reguladores epigenéticos no se asociaron entre sí: *IDH2/DNMT3A* ($p=0.131$), *IDH2/TET2* ($p=0.284$) y *TET2/DNMT3A* ($p=0.209$). La presencia de ambas mutaciones *RHOA/IDH2* ($p=0.028$) fue más frecuente en el subtipo histológico LTAI con respecto a los otros dos subtipos de LTP estudiados. Cuando

analizamos en estos 4 genes la supervivencia de los pacientes mediante curvas de Kaplan-Meier, no encontramos una asociación entre la presencia de mutaciones en estos genes y el pronóstico (Figura 22).

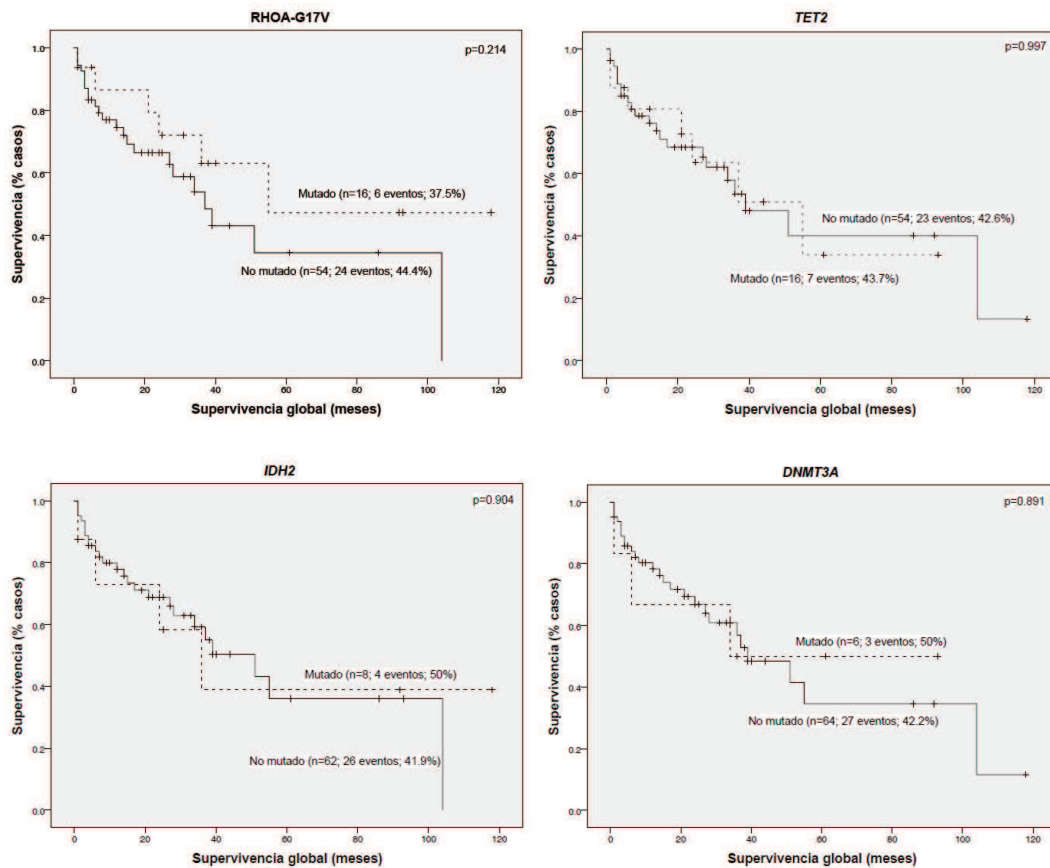


Figura 22. Análisis de la supervivencia global en relación con la presencia de mutaciones en el gen *RHOA* y reguladores epigenéticos en LTP. El análisis Kaplan-Meier comparando casos mutados y no mutados muestra que la presencia/ausencia de mutaciones en estos genes no se correlaciona con pronóstico en la cohorte de 98 pacientes con LTP.

A continuación, decidimos llevar a cabo el estudio correlacionando la presencia de mutaciones en los cuatro genes y la expresión de marcadores subrogados. Encontramos una correlación directa entre la mutación RHOA-G17V y la expresión de CXCL13 ($p=0.002$) y CD10 ($p<0.001$). Observamos que 20 casos (19 LTAI y 1 LTP-TFH) con la mutación RHOA-G17V mostraron expresión de CXCL13 y 6 casos LTAI fueron CD10 positivos. La presencia de la mutación RHOA-G17V también se correlacionó con la expresión de CXCL13 en combinación con otros marcadores de

fenotipo T_{FH}: CXCL13/BCL6 (p=0.004), CXCL13/PD-1 (p=0.027), CXCL13/CD10 (p<0.001) y CXCL13/ICOS (p=0.022); así como con la expresión de CD10 en combinación con otros marcadores de fenotipo T_{FH}: CD10/BCL6 (p=0.003), CD10/PD-1 (p=0.010) y CD10/ICOS (p=0.001). Fue observada una correlación directa entre mutaciones en *TET2* y expresión de PD-1 (p=0.044). Observamos que 13 casos (11 LTAI, 1 LTP-TFH y 1 LTPNE) con mutaciones en *TET2* mostraron positividad para PD-1. Además, observamos una tendencia entre la presencia de mutaciones en *IDH2* y expresión de CD10 (p=0.055). Observamos que 2 casos LTAI con mutaciones en *IDH2* mostraron positividad para CD10 (Figura 21).

La mutación RHOA-G17V, junto con mutaciones en reguladores epigenéticos (14 LTAI, 1 LTP-TFH y 2 LTPNE), se asoció con la expresión de CXCL13 sólo o en combinación con BCL6 y CD10 (p=0.009, 0.028 y 0.006, respectivamente); así como CD10 sólo o en combinación con BCL6 (p=0.008 y 0.023, respectivamente). Este grupo de pacientes mostró también mayor probabilidad de respuesta completa a tratamiento (p=0.021) (Figura 21).

Cuando analizamos este grupo de pacientes de acuerdo al estatus mutacional de estos cuatro genes y presencia/ausencia de marcadores de fenotipo T_{FH}, encontramos que el diagnóstico de LTAI se asoció con la presencia de mutaciones y fenotipo T_{FH} (29/58, 50%). Por su parte, la ausencia de mutaciones en los genes escogidos y la presencia de fenotipo T_{FH} se asoció con LTP-TFH (14/18, 77.8%), hallazgo condicionado por los criterios diagnósticos de estos pacientes (Tabla 22 y Figura 23).

Tabla 22. Comparación del estatus mutacional y la presencia/ausencia de marcadores de fenotipo T_{FH} en los diferentes subtipos histológicos de LTP (LTAI=Linfoma T Angioinmunoblástico; LTPNE=Linfoma T Periférico no especificado; LTP-TFH=Linfoma T Periférico con fenotipo T_{FH}; Mut=mutado; No mut=no mutado; TFH=fenotipo T_{FH}; No TFH=no fenotipo T_{FH}).

	LTAI (n=58)	LTP-TFH (n=18)	LTPNE (n=22)	p-value
Mut/TFH	29 (50%)	4 (22.2%)	2 (9.1%)	<0.001
Mut/no TFH	1 (1.7%)	0 (0%)	3 (13.6%)	
No mut/TFH	24 (41.3%)	14 (77.8%)	8 (36.4%)	
No mut/no TFH	4 (6.9%)	0 (0%)	9 (41%)	

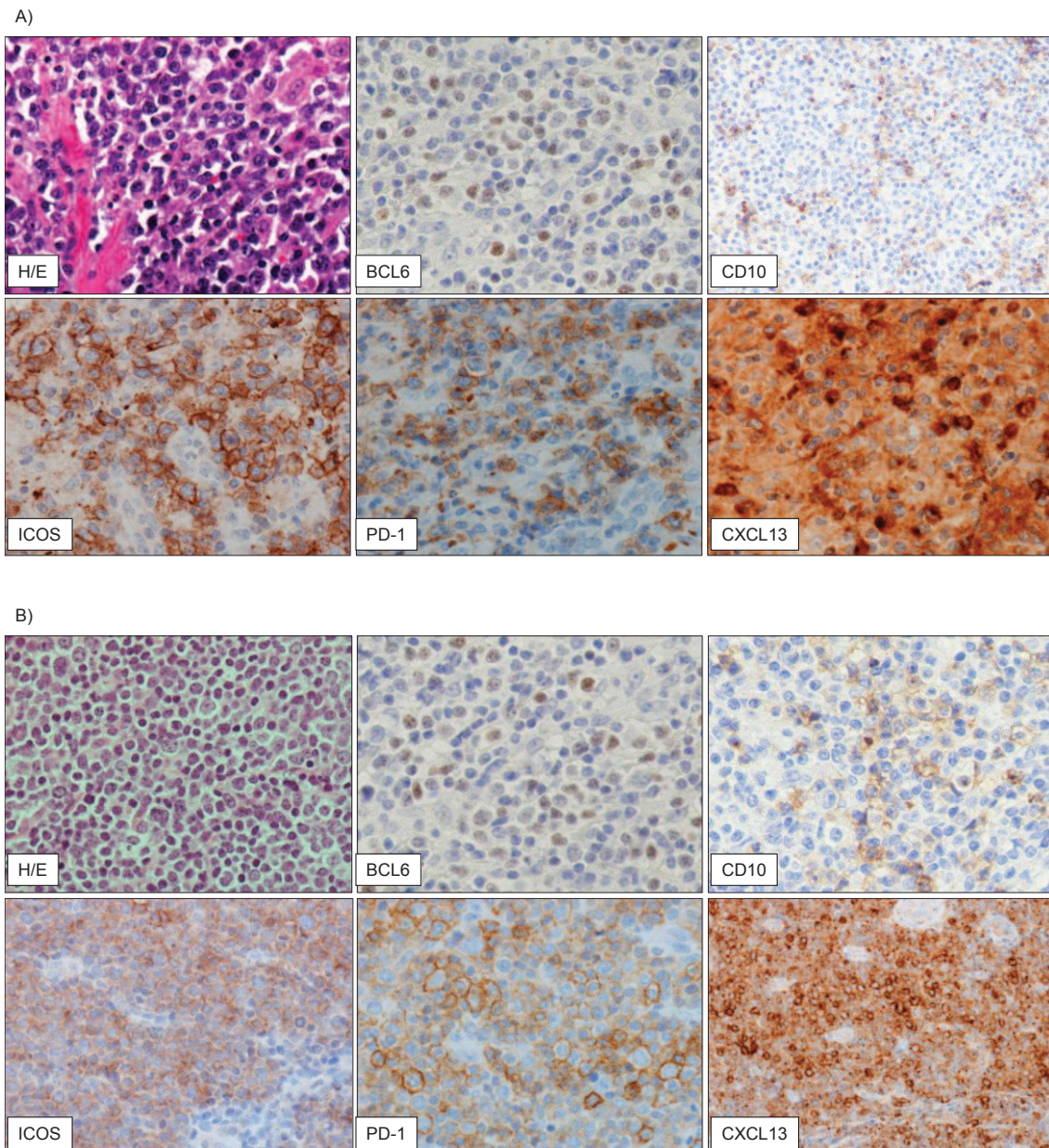


Figura 23. Imágenes representativas correspondientes a dos casos con expresión de marcadores de fenotipo T_{FH} y presencia/ausencia de mutaciones. **A)** Caso con expresión de los marcadores estudiados y presencia de mutaciones. **B)** Caso con expresión de marcadores de fenotipo T_{FH} y ausencia de mutaciones.

El análisis de supervivencia de estos cuatro grupos no mostró una correlación significativa con respecto al pronóstico ($p=0.414$) (Figura 24).

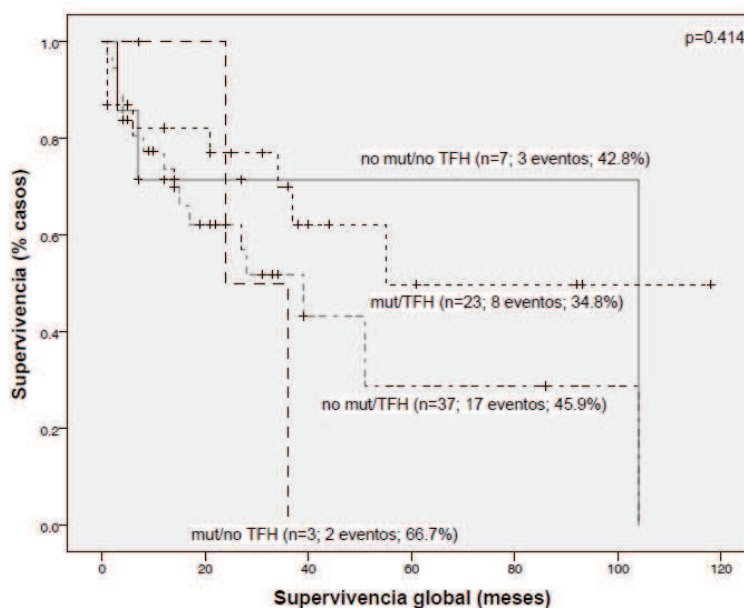


Figura 24. Análisis de supervivencia global en relación con el estado mutacional de *RHOA*, *TET2*, *IDH2* y *DNMT3A* y la presencia/ausencia de expresión de marcadores de fenotipo T_{FH} . El análisis Kaplan-Meier comparando los cuatro grupos no mostró significancias estadísticas (mut=presencia de mutación; no mut=ausencia de mutación; TFH=expresión; no TFH=no expresión).

Aparte de la mutación G17V en el gen *RHOA*, otros genes involucrados en la vía de señalización de las *RHO* GTPasas se han encontrado mutados en pacientes de nuestra serie. Un paciente LTAI mostró la mutación A120T en el gen *PAK7* y dos pacientes (1 LTAI y 1 LTP-TFH) mostraron mutaciones en el gen *CD36* (G359A y V61F, respectivamente) (Tablas 20 y 21). Encontramos una tendencia entre la presencia de estas mutaciones y la mutación *RHOA*-G17V ($p=0.064$), debido a que los 2 pacientes LTAI tienen también mutación en este gen. La presencia de mutaciones en estos genes, no se correlacionaron con pronóstico ($p=0.351$) (Figura 25).

Vía de señalización de TCR.

Encontramos 2 pacientes (1 LTAI y 1 LTP-TFH) con mutaciones en el gen *PDCDI* (Y223* y A202T, respectivamente) (Tablas 20 y 21). La mutación Y223*, genera un codón de parada prematuro. Señalar que el caso LTAI mostró positividad para PD-1. Al analizar la supervivencia de los pacientes con mutaciones en esta vía, no encontramos correlación significativa con respecto al pronóstico ($p=0.271$) (Figura 25).

Vía de señalización de Calcineurina.

En las Tablas 20 y 21 se puede observar la presencia de 4 pacientes (2 LTAI y 2 LTPNE) con mutaciones en el gen *PLCG1*. Desafortunadamente, el diseño del panel no incluye la región del gen *PLCG1* que engloba la mutación S345F. No encontramos correlación entre la presencia de mutaciones en esta vía y los datos inmunohistoquímicos estudiados. Sin embargo, los 2 pacientes LTAI mostraron positividad para NFATc1 y las subunidades de NF- κ B (p50 y p52). Cuando analizamos la supervivencia de los pacientes con mutaciones en esta vía de señalización, no encontramos correlación significativa con respecto al pronóstico ($p=0.634$) (Figura 25).

Vía de señalización de NF- κ B.

Como se muestra en las Tablas 20 y 21, identificamos mutaciones en diferentes genes de la vía de señalización de NF- κ B en un 8.2% de los casos estudiados. Encontramos de forma más frecuente mutaciones en el gen *CARD11* en 4 pacientes (2 LTAI y 2 LTPNE), localizada una de ellas (F97Y) en el dominio CARD, a través del cual interactúa con BCL10. Por otro lado, encontramos pacientes con mutaciones en los genes *FAS* (n=1, LTP-TFH), *TNFRSF21* (n=1, LTAI), *NLRP2* (n=1, LTAI) y *RC3H1* (n=1, LTP-TFH). No encontramos correlación entre la presencia de mutaciones en esta vía y los datos inmunohistoquímicos estudiados. Sin embargo, los pacientes con mutaciones en los genes *TNFRSF21*, *NLRP2* y *RC3H1* mostraron expresión nuclear de p50 y p52; además el paciente con mutación en el gen *FAS* mostró positividad para p50. Mutaciones en esta vía de señalización, no se correlacionaron con pronóstico ($p=0.765$) (Figura 25).

Vía de señalización de PI3K.

Nueve pacientes (9.2%) mostraron mutaciones en genes implicados en la vía de señalización de PI3K. Como se muestra en las Tablas 20 y 21, cinco pacientes mostraron mutaciones en el gen *PTEN*, destacando que 4/5 (3 LTAI y 1 LTPNE) presentaron la misma mutación (F278L). Mientras que el quinto paciente (LTPNE) mostró una mutación diferente (C71*), la cual genera un codón de parada prematuro, prediciendo una proteína truncada. Este paciente también tenía mutación en el gen *PIK3C2B*. Además, identificamos 2 pacientes LTPNE con mutaciones en el gen *LPL* y otro paciente LTPNE con mutación en el gen *CSF2RB*. Encontramos una correlación significativa directa entre la presencia de mutaciones en la vía de señalización de PI3K y la expresión de CXCL13 junto con la expresión de BCL6 ($p=0.001$). No encontramos correlación entre la presencia de mutaciones en esta vía y el pronóstico ($p=0.263$) (Figura 25).

Vía de señalización de JAK/STAT.

Como se observa en los datos mostrados en las Tablas 20 y 21, encontramos un 6.1% (6/98) de pacientes (3 LTAI, 1 LTP-TFH y 2 LTPNE) con mutaciones en genes que forman parte de la vía de señalización de JAK/STAT. Tres pacientes (1 LTAI y 2 LTPNE) mostraron mutaciones en *JAK1* (G1097V, T901R y K696E), localizadas los dominios quinasa y pseudoquinasa. Además, encontramos 1 paciente diagnosticado de LTAI con mutación en el dominio de unión al ADN en el gen *STAT1* (E563K), el cual mostró expresión de p-STAT6 (Figura 26). Encontramos también un paciente LTP-TFH con mutación en el dominio de unión al ADN en el gen *STAT3* (D566N). Este tumor mostró asimismo expresión nuclear de p-STAT3 y positividad para CD30 (Figura 27). Por otro lado, encontramos 1 paciente diagnosticado de LTAI que mostró la mutación Y331* en el gen *CCR4*, la cual genera un codón de parada prematuro. Los casos con diagnóstico de LTAI expresaron marcadores de fenotipo T_{FH}: el paciente con la mutación JAK1-G1097V expresó PD-1 y BCL6; el paciente con la mutación en el gen *CCR4* expresó PD-1, BCL6 y CXCL13. El paciente con mutación en el gen *STAT1* mostró expresión de PD-1, BCL6, CXCL13 e ICOS; y el paciente con mutación en *STAT3* mostró expresión de los cinco marcadores estudiados (PD-1, BCL6, CXCL13, CD10 e ICOS). Encontramos una correlación entre la presencia de mutaciones en la vía JAK/STAT y en las vías de PI3K y TCR ($p=0.009$ y 0.004 , respectivamente). La

presencia de mutaciones en esta vía se relacionó con una menor supervivencia ($p=0.016$), aunque hay que tener en cuenta el bajo número de casos (Figura 25).

Vía de señalización de MAPK.

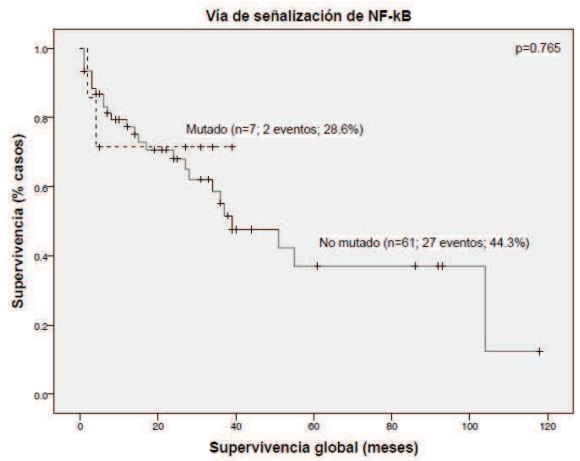
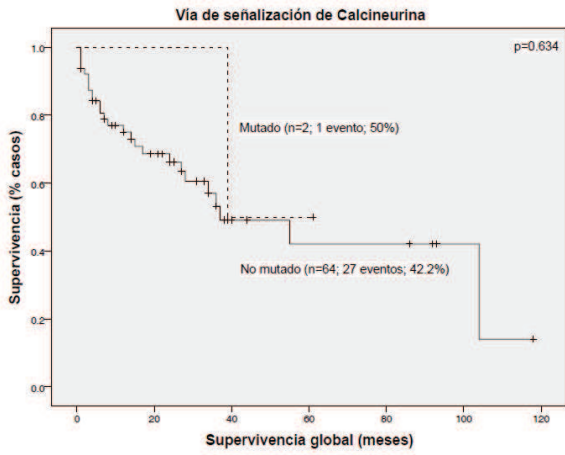
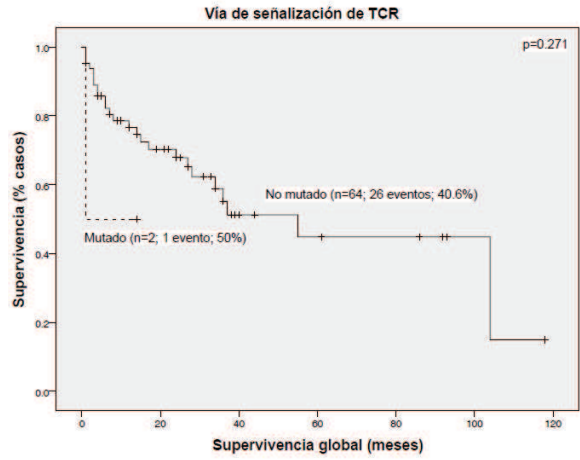
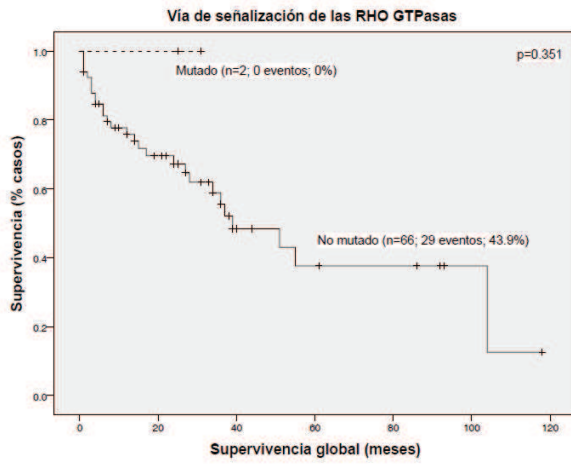
Encontramos un paciente LTP-TFH con la mutación I475T en el gen *RASA1*, una proteína activadora de *RAS*. Dicho paciente tiene una alta expresión nuclear de p-ERK. Por otra parte, un paciente LTAI mostró la mutación E40K en el gen *MAP3K5* (Tablas 20 y 21). Encontramos una correlación significativa directa entre la presencia de mutaciones en esta vía y la expresión de p-ERK ($p=0.039$). Sin embargo, no encontramos correlación entre la presencia de mutaciones en esta vía y el pronóstico ($p=0.494$) (Figura 25)

Vía de señalización de Hedgehog.

Un paciente LTAI mostró la mutación L380V en el gen *GLI3* (Tabla 20). Se trata de un paciente del que no tenemos datos clínicos.

Ciclo celular.

En la Tabla 20, se muestran 2 pacientes diagnosticados de LTPNE con mutaciones en el gen *TP53* (I255S y A159P) y un paciente LTAI con la mutación A333E en el gen *RBI*. No encontramos correlación entre la presencia de mutaciones en esta vía y los datos inmunohistoquímicos estudiados. Sin embargo, los pacientes con las mutaciones TP53-I255S y RB1-A333E mostraron una alta expresión del índice de proliferación Ki-67. Encontramos que la presencia de mutaciones en esta vía no se relacionó con pronóstico ($p=0.134$) (Figura 25). Además, encontramos una correlación entre la presencia de mutaciones en genes implicados en el ciclo celular y en las vías de señalización de PI3K, JAK/STAT y MAPK ($p<0.001$, 0.026 y <0.001 , respectivamente).



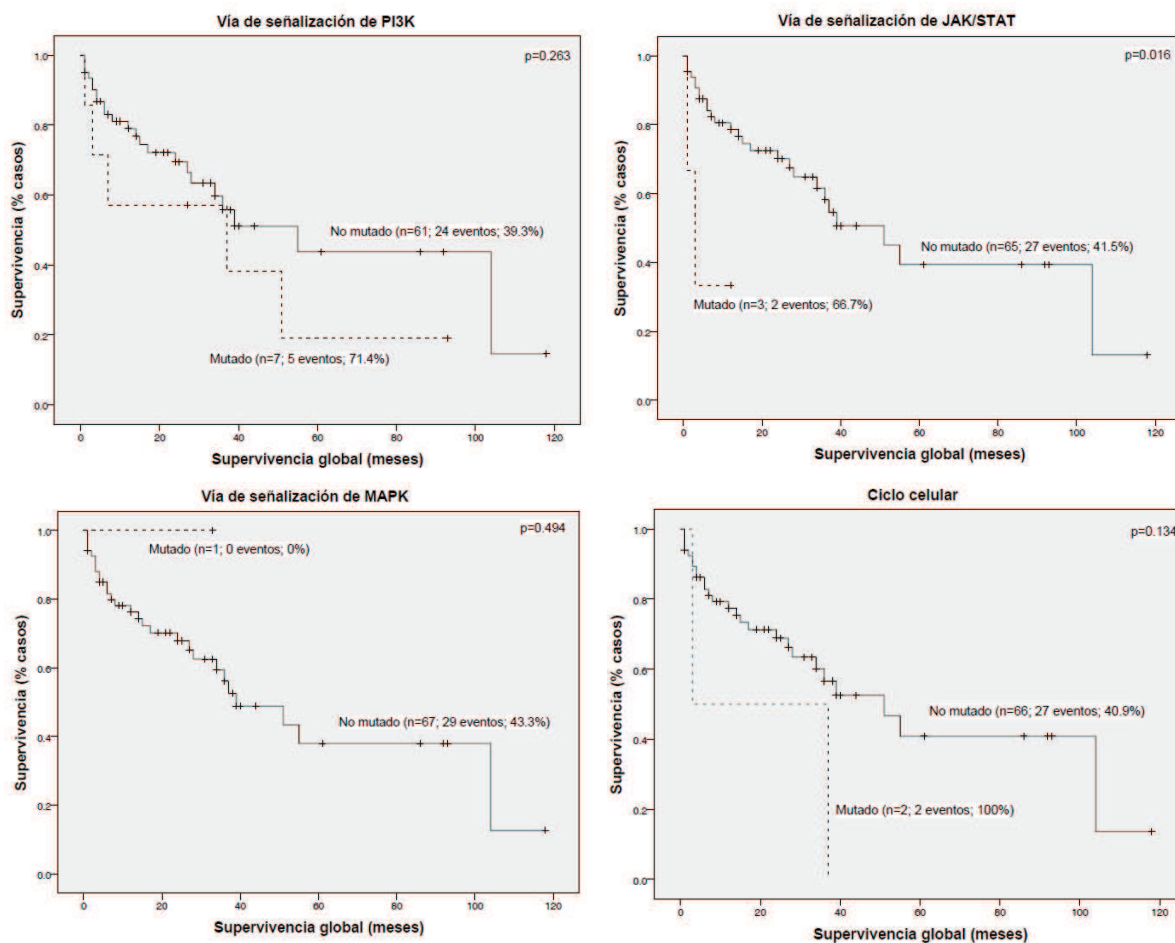


Figura 25. Análisis de supervivencia global de acuerdo a la presencia de mutaciones en las vías de señalización de RHO GTPasas, TCR, Calcineurina, NF- κ B, PI3K, JAK/STAT, MAPK y ciclo celular en LTP. El análisis Kaplan-Meier comparando casos mutados y no mutados muestra que sólo la presencia de mutaciones en genes de la vía de señalización de JAK/STAT se correlaciona con un peor pronóstico en la serie de pacientes con LTP.

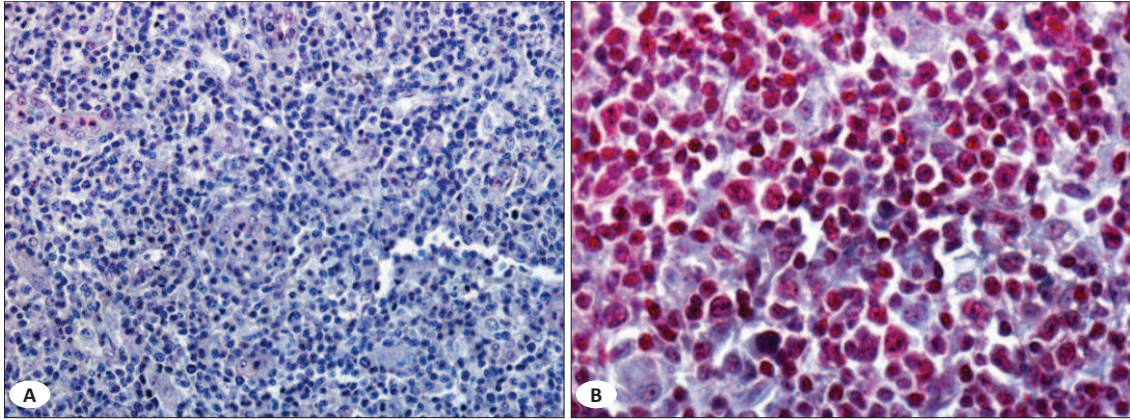


Figura 26. Figura representativa de la expresión de p-STAT6. A) Caso LTAI negativo para p-STAT6. **B)** Caso de LTAI con la mutación STAT1-E563K expresando p-STAT6 en el núcleo de las células tumorales.

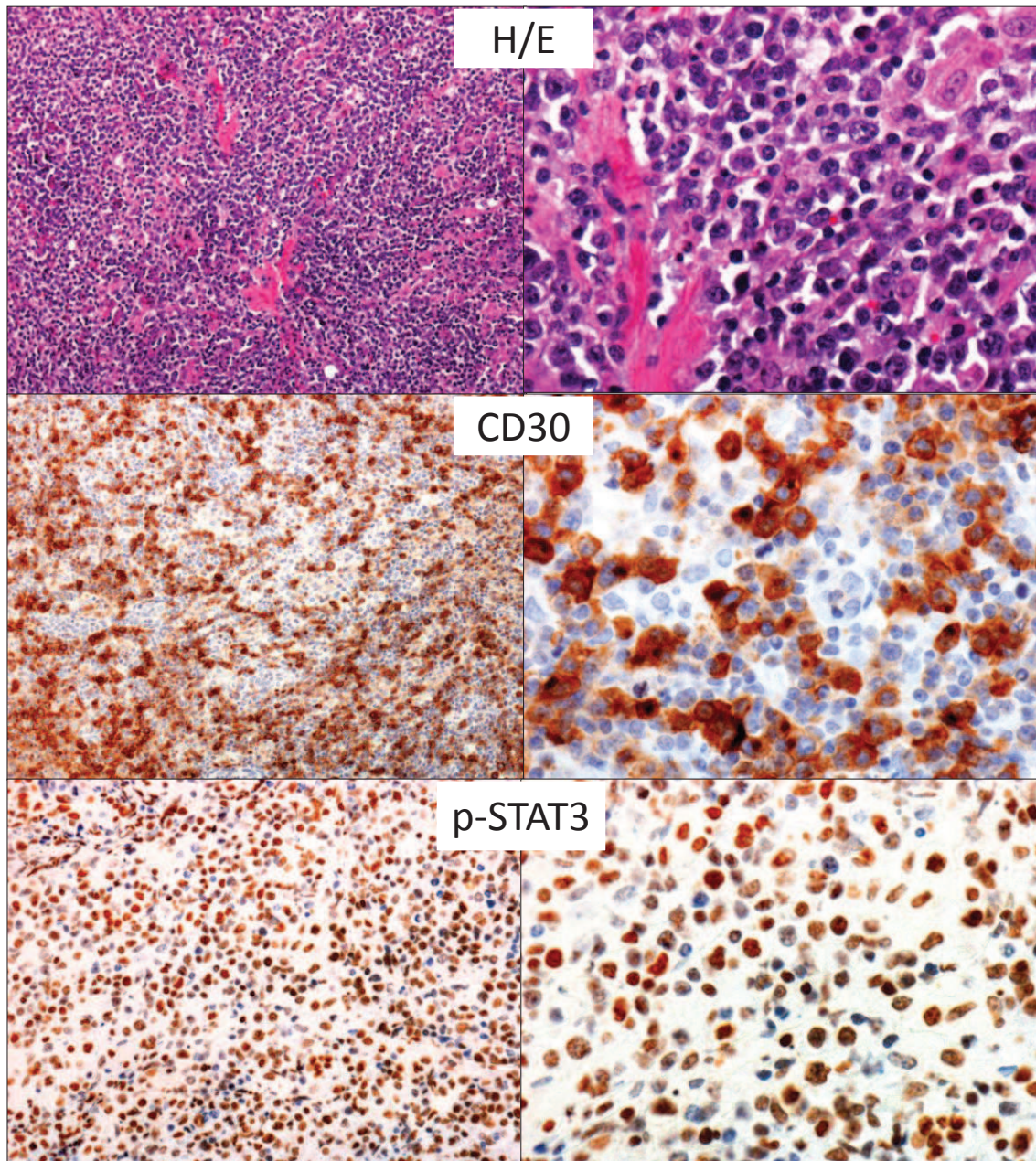


Figura 27. Figura representativa de un paciente con la mutación STAT3-D566N. Caso LTP-TFH con expresión nuclear de p-STAT3 y positividad para CD30.

DISCUSIÓN

En neoplasias hematopoyéticas, los estudios moleculares integrados de alta profundidad pueden facilitar el reconocimiento de rutas y genes esenciales para la supervivencia de las células neoplásicas, haciendo posible la identificación de marcadores que orienten la terapia. Los LTP constituyen un grupo muy heterogéneo de LNH, los cuales presentan un pobre pronóstico con los tratamientos actuales de quimioterapia ⁶⁸, con una supervivencia global de 5.5 meses en pacientes refractarios o en recaída y tasas de respuesta del 39-84% en pacientes recién diagnosticados ⁷⁰. En el presente trabajo, analizamos perfiles de expresión génica y mutacionales, evaluando la especificidad de subtipo histológico y el impacto clínico. Hemos intentado identificar nuevas dianas moleculares involucradas en la patogénesis del LTP, que puedan contribuir a una más precisa subclasificación de este tipo de neoplasia hematológica y a la identificación potencial de nuevas dianas terapéuticas.

6.1. Identificación de una firma molecular de expresión génica revelando rutas de señalización importantes en la patogenia de los LTP

6.1.1. Firma molecular de expresión génica

Los datos de expresión génica en una serie de pacientes compuesta por 17 LTAI, 20 LTPNE y 6 tejidos linfoides reactivos, mostraron sobre-expresión de las vías de señalización de *ERK*, *MYC* y ciclo celular en pacientes con LTP. Estos datos fueron confirmados mediante estudio inmunohistoquímico en una serie de muestras FFIP (129 casos que comprendían 75 LTAI y 54 LTPNE), demostrando sobre-expresión de p-ERK (34.9%), C-MYC (13.2%) e incremento en Ki-67 (24%). El análisis de los datos de expresión génica e inmunohistoquímica reveló correlaciones estadísticas directas, por un lado entre las vías de *ERK* y *MYC*, y entre la expresión nuclear de p-ERK y la presencia de la proteína C-MYC en células tumorales; y por otro lado, entre las vías de *MYC* y ciclo celular, y entre la expresión de C-MYC y Ki-67.

Varios estudios han mostrado que la proteína RAS actúa como un transductor de la vía de señalización mediada por el receptor del factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) ²⁵⁹, el cuál ha sido encontrado mutado en leucemias linfoblásticas T (LL-T) ²⁶⁰ y sobre-expresado en linfomas de células NK/T ²⁶¹ y LTPNE ²⁶². Sin embargo, en otros subgrupos de LTP, como LACG, está descrito que *ERK* podría ser activado por la tirosina quinasa COT (MAP3K8) o por NPM-ALK ²⁶³. Además, se ha

descrito una relación entre la sobre-expresión del microARN-187 y la expresión nuclear de p-ERK en LTPNE ²⁵⁵. Todos estos hallazgos son consistentes con un mecanismo multifactorial de la activación de la vía RAF/MEK/ERK en LTP.

ERK regula la fosforilación de *MYC* en el sitio S62 ^{97, 264}, alterando la estabilización de la proteína *MYC*. Estudios anteriores han demostrado que *MYC* está críticamente involucrado en el desarrollo de LTP ⁴⁵, ya que se activa por la pérdida de SNF5 (SMARCB1), favoreciendo de este modo la rápida aparición de esta neoplasia en ratones ²⁶⁵ y humanos ⁴⁵. Además, *MYC* se ha encontrado amplificado o translocado en diversos subtipos de linfoma de célula T, principalmente en LACG, LL-T, linfoma de célula T asociado a enteropatía tipo 2 (EATL) y LTPNE ⁵⁹. Está descrito que *C-MYC* está implicado en la proliferación celular ²⁶⁶, por lo que la relación significativa con la expresión de p-ERK y un alto índice de proliferación Ki-67 no es sorprendente.

6.1.2. Relevancia clínica y biológica de la expresión de p-ERK

El estudio inmunohistoquímico mostró que la expresión de p-ERK en células tumorales se relaciona con el subtipo histológico LTAI y el análisis de los datos del estudio GSEA indicó que esta expresión se asocia con fenotipo de célula T del centro germinal. Además, cuando se examinaron los casos tratados con CHOP o CHOP-like, la relevancia clínica de la expresión de p-ERK se mantuvo en los pacientes diagnosticados de LTAI.

En este trabajo, se muestra cómo la expresión de p-ERK por sí misma se asocia con mal pronóstico en la serie total de LTP y en el subtipo histológico LTAI; pero su significancia biológica no se mantuvo en el análisis multivariado cuando se incluyeron los parámetros clínicos. Sin embargo, resultó ser un marcador pronóstico independiente en el subtipo de pacientes LTAI; aunque esto no se mantuvo al analizar el grupo de pacientes tratados con CHOP o CHOP-like. Este hallazgo no ha sido descrito en linfomas de célula T; sin embargo, la presencia de altos niveles de *ERK* está inversamente correlacionada con la supervivencia en el glioma maligno ²⁶⁷ y el adenocarcinoma de pulmón ²⁶⁸.

Diversos inhibidores farmacológicos que modulan la activación de la mayoría de las proteínas en la vía RAS/RAF/MEK/ERK se han desarrollado y aplicado en la clínica, confirmando así la actividad de *ERK* como una diana terapéutica en múltiples

tumores malignos^{104, 105, 269-272}. También se ha descrito la utilidad de los inhibidores de la vía de *ERK* en el tratamiento de LTP, solos o en combinación con inhibidores de vías paralelas como la vía de PI3K/AKT³⁶.

6.1.3. Relevancia clínica y biológica de la expresión de C-MYC y Ki-67

En este trabajo, la presencia de C-MYC y un alto índice de proliferación Ki-67 fueron marcadores pronósticos independientes en el análisis univariado en la serie total de LTP y en el subtipo histológico LTAI. Sin embargo, su importancia no se mantuvo cuando se incluyeron variables clínicas clásicas en el análisis multivariado. Estudios previos han demostrado que la sobreexpresión de C-MYC se relaciona con un alto índice de proliferación y un peor pronóstico clínico en linfomas de células NK/T extranodal de tipo nasal, micosis fungoide, LL-T y LACG^{270, 273-275}.

El marcador que comúnmente se utiliza para estudiar proliferación en muestras FFIP es Ki-67, una proteína nuclear expresada por células en división^{276, 277}; su relevancia clínica en LTP ha sido demostrada. Inicialmente se identificó un perfil de pobre pronóstico relacionado con la proliferación usando micromatrices de expresión génica⁴¹. Además, se ha observado que la expresión de Ki-67 confiere mal pronóstico a pacientes con LTAI y LTPNE^{47, 55, 278, 279}.

6.1.4. Relevancia clínica y biológica de la expresión de GATA3

Los datos inmunohistoquímicos revelaron expresión de GATA3 en un 26% de los casos diagnosticados de LTPNE, mientras que en estudios previos mostraron expresión de GATA3 en un 33%⁴⁴ y un 45%²⁵⁶ de los pacientes con LTPNE. Las diferencias en la positividad podrían ser debidas al anticuerpo utilizado (ABCAM (este estudio) vs. Santa Cruz Biotechnology (estudios previos)) o a la serie de muestras analizadas.

En este trabajo se mostró una correlación entre la expresión de C-MYC y GATA3 en la serie total y en el grupo de pacientes LTPNE, coincidiendo con los datos publicados⁴⁴. La expresión de GATA3 confirió peor pronóstico a pacientes con LTPNE, pero no con LTAI; manteniéndose en el grupo de pacientes tratados con CHOP o CHOP-like. Nuestros resultados son consistentes con los estudios publicados por otros grupos, que muestran perfiles de expresión génica en un grupo de pacientes

diagnosticados de LTPNE que se caracteriza por una expresión alta de GATA3 y un pobre pronóstico^{44, 256}.

Varios estudios preclínicos han encontrado que la sobreexpresión de ERK y/o C-MYC se relaciona con la pérdida de sensibilidad a la quimioterapia convencional (especialmente a la doxorubicina, ciclofosfamida, cisplatino y gemcitabina), sensibilizando a las células de linfoma de célula T al bortezomib^{255, 280, 281}. El uso de bortezomib, solo o en combinación, ha surgido recientemente como una nueva opción terapéutica para recaída o LTP refractario²⁸²⁻²⁸⁶.

En resumen, este estudio sugiere que p-ERK, C-MYC y una alta expresión de Ki-67 podrían identificar un subgrupo de pacientes de pobre pronóstico que podrían ser candidatos para el tratamiento con inhibidores de la vía de señalización RAS/RAF/MEK/ERK o con otros regímenes terapéuticos. Además, la expresión de p-ERK podría identificar a pacientes con LTAI con una clínica agresiva, mientras que la expresión de GATA3 identificaría a pacientes con LTPNE con pobre pronóstico. Sin embargo, estos resultados requieren confirmación clínica y experimental en una serie de pacientes con LTP tratados homogéneamente.

6.2. Identificación de mutaciones en genes de vías de señalización implicadas en la patogenia de los LTP

6.2.1. Mutación G17V en el gen *RHOA*

6.2.1.1. Frecuencia mutacional

El estudio del perfil de expresión génica en una serie de pacientes compuesta por 17 LTAI y 20 LTPNE, mostró un 34.6% de muestras LTP (6 LTAI y 3 LTPNE) con la mutación G17V en el gen *RHOA* (*RHOA*-G17V). Estos datos fueron confirmados mediante técnicas de qPCR (discriminación alélica y secuenciación de Sanger) y secuenciación de última generación (next-generation sequencing, NGS) en una serie de muestras FFIP, demostrando que menos del 30% de casos LTP tuvieron la mutación, siendo más frecuente en pacientes diagnosticados de LTAI.

Nuestros resultados son consistentes con los datos publicados sobre secuenciación del exoma en muestras de linfoma que han demostrado la presencia de la mutación *RHOA*-G17V en pacientes con LTP^{7, 20-22, 26, 151}, siendo más frecuente en

pacientes con LTAI (60-70%) en comparación con LTPNE. Las diferencias en el porcentaje de casos mutados entre nuestro estudio y los publicados anteriormente, puede deberse a la serie de muestras utilizada. Está descrito ²⁸⁷ que las frecuencias alélicas de la mutación RHOA-G17V en estos linfomas son generalmente bajas, reflejando un bajo contenido tumoral. Con la técnica de NGS, hemos identificado un grupo de pacientes LTP que sólo poseen la mutación RHOA-G17V y no mutaciones en el resto de genes presentes en el panel de estudio u otras mutaciones en este gen, coincidiendo con estudios previos ^{20, 26}.

6.2.1.2. Relevancia clínica y biológica de la mutación RHOA-G17V

Los datos del perfil de expresión génica mostraron sobre-expresión de vías de señalización relacionadas con células T_{FH}, p38, PI3K, KRAS, RAC1 y la vía alternativa de NF-κB en los pacientes con la mutación RHOA-G17V. Estos datos fueron confirmados mediante estudio inmunohistoquímico en los que se mostró una relación significativa entre la presencia de la mutación RHOA-G17V y la expresión de marcadores de fenotipo T_{FH}, p-ERK y p52.

La relación recíproca entre *RHOA* y *RAC1* está descrita ²⁸⁸, sin embargo los efectos de la mutación RHOA-G17V sobre *RAC1* no lo están. La actividad de *RAC1* también activa múltiples efectores incluyendo las vías de señalización de NF-κB, *p38* y *ERK* ^{289, 290}. Estudios funcionales, así como datos derivados del análisis estructural, han descrito que esta mutación tiene un efecto negativo, por lo que causa la pérdida de la actividad GTPasa de *RHOA* ^{20-22, 152}, aumentando la proliferación y migración en células T ²⁰. Además, Yoo y cols. han mostrado que *RHOA* juega un importante papel regulador que conecta las vías de señalización de TCR y PI3K ²². Estos hallazgos coinciden con los datos aportados en este trabajo sobre el perfil de expresión génica. La relación entre la mutación y la expresión de marcadores de fenotipo T_{FH}, explicaría los datos obtenidos en el perfil de expresión y los publicados anteriormente ^{21, 26, 151}, que relacionan esta mutación con un fenotipo T_{FH}. En este trabajo, la expresión nuclear de p-ERK se ha observado en células tumorales a través de una doble inmunohistoquímica, por lo que la relación entre la mutación RHOA-G17V y la expresión de p-ERK que observamos ocurre en este tipo de células. Estos datos revelan que la mutación tiene lugar en las células tumorales, coincidiendo con estudios publicados por otros autores ²¹.

En este estudio mostramos que la presencia de la mutación *RHOA*-G17V no se asoció con pronóstico; dato que coincide con lo publicado anteriormente^{22, 151, 291}. Además, cuando analizamos el estado mutacional y la presencia/ausencia de p-ERK en pacientes tratados con CHOP o CHOP-like, identificamos que el subgrupo p-ERK-positivo/*RHOA*-no mutado tiene menor supervivencia, que se mantiene como factor independiente en el análisis multivariado. Está descrito que la señalización de *RHOA* converge en la vía de *ERK* a través del citoesqueleto de actina, influyendo en la regulación del ciclo celular y promoviendo la acumulación nuclear de ERK²⁹². Esta relación podría explicar una posible activación de *ERK* en ausencia de *RAS*²⁹³. La presencia de mutaciones en *NRAS* y *KRAS* se ha descrito en varios grupos de linfomas de célula T, como LCCT²⁹⁴, LL-T²⁹⁵, linfomas de células NK/T²⁹⁶ y LTP²⁶. Recientemente, Choi y cols.²⁹⁷ han descrito una nueva mutación en *BRAF* en un 2.5% de casos LCCT, así como la amplificación del gen en un 12.5% de los mismos. En este estudio hemos analizado mutaciones en los genes *NRAS* y *KRAS* en los casos con expresión de p-ERK y *RHOA*-no mutado, para determinar a que puede ser debido la expresión de ERK en este grupo de casos, pero no hemos obtenido resultados positivos. Por tanto, la sobre-expresión de ERK en las células tumorales puede ser debida a otros mecanismos biológicos²⁵⁵.

Otros investigadores han destacado anteriormente la utilidad de inhibidores de las vías de señalización de NF- κ B, PI3K/AKT y ERK para el tratamiento de pacientes con LTP^{34, 298}. Los resultados presentados en este estudio sugieren que la presencia de la mutación *RHOA*-G17V podría identificar a los pacientes que son sensibles a algunos de estos inhibidores. Además, nuevas investigaciones sobre los mecanismos moleculares de la mutación *RHOA*-G17V dará lugar al desarrollo de nuevas terapias similares a las propuestas para la lucha contra las modificaciones epigenéticas. Por supuesto, se necesitan estudios clínicos y biológicos para validar estos resultados.

6.2.2. Mutaciones en el gen *PLCG1*

6.2.2.1. Frecuencia mutacional

Nuestros hallazgos muestran que *PLCG1* está recurrentemente mutado en pacientes con LTP. La detección de la mutación S345F (*PLCG1*-S345F) mediante qPCR por discriminación alélica en una serie de pacientes compuesta por 60 LTAI y 41

LTPNE, mostró un 12.9% de muestras LTP (7 LTAI y 6 LTPNE) con la mutación. Estos datos fueron confirmados por otra técnica de qPCR y secuenciación de Sanger. Varios estudios han descrito la presencia de la mutación *PLCG1*-S345F en linfomas de célula T, incluyendo LCCT²³, ATL²⁴ y LTP^{22, 26, 27}. Por otro lado, en el estudio NGS, encontramos cuatro nuevas mutaciones en este gen, no descritas previamente.

6.2.2.2. Relevancia clínica y biológica de las mutaciones en *PLCG1*

Los datos inmunohistoquímicos mostraron una relación significativa entre la presencia de la mutación *PLCG1*-S345F y la expresión de CD30, p50 y GATA3 en pacientes con LTP. El aumento en la señalización de *PLCG* mutado asociado con un incremento en la actividad de NF- κ B ha sido previamente descrito por otros autores²⁶. La activación de NF- κ B y la expresión de CD30, podría reemplazar teóricamente las señales de supervivencia mediadas por TCR. Estos datos serían coherentes con los datos publicados en los que se muestra que las señalizaciones de CD30 y TCR son mutuamente excluyentes en LTP^{38, 47}. La sobre-expresión de GATA3, podría ser debida a la presencia de la mutación en *PLCG1*, además dicha sobre-expresión podría asociarse a resistencia a quimioterapia²⁹⁹.

Por otro lado, no encontramos una correlación significativa entre la presencia de la mutación *PLCG1*-S345F y la expresión nuclear de NFATc1, como sí se observa en pacientes con LCCT²³, aunque un 66.7% de los casos LTP mutados en *PLCG1* fueron positivos para NFATc1. Este porcentaje es bajo comparado con el publicado previamente por Vaqué y cols. en LCCT, que encuentran un 81.8% de casos mutados NFATc1 positivos²³. La sobre-expresión de NFATc1 en los casos LTP no mutados (71.1%) podría ser explicada por la presencia de activación de la vía TCR/CD3 en este tipo de tumores. Estudios *in vitro* realizados por Vaqué y cols.²³ muestran que la sobre-expresión de NFAT resultante de la presencia de la mutación en *PLCG1*, puede ser inhibida por el uso de inhibidores específicos de esta vía de señalización y de uso probado en clínica, como es el caso del Tacrólimus (FK-506), un inhibidor de la Calcineurina³⁰⁰, que disminuye la proliferación y viabilidad celular e induce apoptosis.

La presencia de la mutación *PLCG1*-S345F se asoció con menor supervivencia en el subgrupo de pacientes diagnosticados de LTPNE, dato no publicado

anteriormente. Sin embargo, la presencia de otras mutaciones en el gen *PLCG1* no se asoció con pronóstico.

La presencia de estas mutaciones en LTP es particularmente relevante, ya que *PLCG1* juega un papel importante en la actividad de la vía de TCR. *PLCG1* está activado en células T tras la activación de la vía TCR/CD3, desencadenando la activación de vías de señalización claves en la linfomagénesis, como RAS/RAF/ERK, PKC/NF- κ B a través de DAG, o CaM/CaN/NFAT por IP3/Ca²⁺. Los datos aportados en este trabajo son de una importancia terapéutica relevante, ya que la inhibición de *PLCG* con el uso de tratamientos anti-CD30 o NF- κ B podría ser explorado en pacientes con *PLCG1* mutado; contribuyendo a la selección de un tratamiento basado en las características moleculares de los tumores. Por supuesto, se necesitan estudios clínicos y biológicos para validar estos resultados.

6.2.3. Otras mutaciones frecuentes en LTP

Los datos de NGS en una serie de muestras FFIP de LTP incluyendo 58 LTAI y 40 LTPNE revelaron que el 56.1% de los casos mostraron mutaciones en alguno de los 48 genes que componen el panel de estudio.

6.2.3.1. Reguladores epigenéticos

La mutación R172 en *IDH2* se encontró en un 11.2% de los casos (8 LTAI, 1 LTP-TFH y 2 LTPNE). Sin embargo, no hemos encontrado la mutación R140 como sí ocurre en LMA³⁰¹, coincidiendo con estudios previos^{27-29, 240}. Este resultado difiere del publicado por otros autores, que no encuentran la mutación de *IDH2* en LTPNE^{7, 20, 21}. La presencia de mutaciones en *IDH2* no se asoció con pronóstico, ni en este trabajo ni en estudios previos^{29, 240}, como sí se observa en LMA donde se asocia con peor pronóstico³⁰². Encontramos una asociación significativa entre la presencia de mutaciones en *IDH2* y la expresión de CD10, por lo que mutaciones en este gen podrían correlacionarse con diferenciación T_{FH}²⁹. Recientemente, se han generado anticuerpos para el estudio inmunohistoquímico de mutaciones en *IDH2*³⁰³⁻³⁰⁵ que podrían ser utilizados en la rutina clínica.

Por otro lado, hemos observado mutaciones en el gen *TET2* en un 23.5% de los casos estudiados (17 LTAI, 2 LTP-TFH y 4 LTPNE). Encontramos que las mutaciones

S1870L y L1340R están descritas en LTP ^{20, 21}. Hemos identificado un grupo de pacientes LTP que sólo poseen mutaciones en este gen y no en el resto de genes presentes en el panel de estudio, coincidiendo con estudios previos ^{20, 21, 26}. Mutaciones en *TET2* han sido asociadas con parámetros clínicos adversos y una tendencia con peor pronóstico ³¹. Sin embargo, en este y otros estudios ³² no hemos encontrado correlación pronóstica. Por otro lado, encontramos una asociación significativa entre la presencia de mutaciones en *TET2* y la expresión de PD-1, por lo que mutaciones en este gen podrían correlacionarse con diferenciación T_{FH} ³¹.

Un 7.1% de los casos (6 LTAI y 1 LTP-TFH) mostraron mutaciones en el gen *DNMT3A*. Dos casos sólo tienen mutación en este gen con respecto al resto de genes presentes en el panel, coincidiendo con estudios previos ^{21, 240}; estas mutaciones (R736C y V690D) han sido publicadas anteriormente en LTP ^{20, 32}. La presencia de mutaciones en este gen no se asoció con pronóstico, datos que coinciden con los publicados anteriormente ³². Sin embargo, en LMA mutaciones en este gen se asocian con un pronóstico adverso ³⁰⁶.

Nuestros resultados de NGS son consistentes con los datos publicados por otros grupos, que muestran un solapamiento entre la mutación *RHOA-G17V* y mutaciones en los reguladores epigenéticos en LTP ²¹. Sin embargo, no hemos encontrado asociación entre la presencia de mutaciones en los reguladores epigenéticos, al contrario que lo descrito ^{20-22, 30, 32, 240}.

En este estudio, mutaciones en los genes *RHOA*, *IDH2*, *TET2* y *DNMT3A* afectan a una proporción significativa de pacientes con LTAI, y muchos de estos cambios son observados en pacientes con fenotipo T_{FH} (LTP-TFH). Estos datos coinciden con estudios previos ^{7, 21, 26, 29, 31}. Además, observamos que todos los casos con mutaciones en *IDH2* también tienen la mutación *RHOA-G17V*. Nguyen y cols. sugieren que la adquisición de mutaciones en *IDH2* podría ocurrir después de adquirir la mutación *RHOA-G17V* en las células tumorales ²⁸. Por otro lado, nosotros y estudios previos ^{20, 26, 28} observamos pacientes con mutaciones en *RHOA* e *IDH2*, pero no en *TET2* y *DNMT3A*. Sin embargo, otros trabajos sugieren que los genes *TET2* y *DNMT3A* son iniciadores de la enfermedad, ya que se han encontrado mutaciones en ellos en precursores hematopoyéticos de sujetos sanos, además de en células madre hematopoyéticas de pacientes con LTP, y posteriormente aparecerían mutaciones en

otros genes los cuales tendrían una implicación en el mantenimiento y progresión de la enfermedad^{20, 21, 30, 32, 217, 240, 307}.

La identificación de mutaciones frecuentes en reguladores epigenéticos en LTAI y LTP-TFH extiende la importancia de alteraciones epigenéticas en linfomagénesis. Esto sugiere que en estas enfermedades, en las que la quimioterapia convencional es inefectiva en muchos de los pacientes, el uso de nuevos agentes como demetilantes podría tener un papel, de acuerdo con algunas observaciones clínicas aisladas^{308, 309}.

6.2.3.2. Vía de señalización de NF-κB

Mutaciones en genes de la vía de NF-κB han sido identificadas en un 8.2% de los casos de la serie estudiada (4 LTAI, 2 LTP-TFH y 2 LTPNE). El gen *CARD11* se ha encontrado más frecuentemente mutado en este estudio, siendo la mutación F97Y previamente descrita en linfomas^{310, 311}. Mutaciones en este gen han sido descritas en linfomas de célula T^{23, 26}, así como de célula B^{22, 175} y ATL²⁴. Por otro lado, mutaciones en los genes *TNFRSF21* y *FAS* también se han encontrado en linfomas T incluyendo LCCT y LTP^{27, 297, 312}. Otro gen encontrado mutado en este estudio ha sido *RC3H1*; sin embargo, alteraciones en este gen no han sido encontradas en LTP³¹³. En este estudio encontramos que los casos con mutaciones en los genes *TNFRSF21*, *FAS*, *NLRP2* y *RC3H1* mostraron expresión nuclear de p52 y/o p50. La presencia de mutaciones en esta vía de señalización no se asoció con pronóstico. Sin embargo, los LTP se han asociado con la activación de la vía de señalización de NF-κB y ésta fue asociada con una menor supervivencia²⁹⁸.

6.2.3.3. Vías de señalización de PI3K y ciclo celular

Mutaciones en la vía de señalización de PI3K se han encontrado en un 9.2% de los casos, incluyendo 3 LTAI y 5 LTPNE. En este estudio encontramos 4/5 pacientes con la misma mutación en el gen *PTEN* (F278L), la cual ha sido descrita en melanoma³¹⁴ y carcinoma endometrial³¹⁵. Otras mutaciones en *PTEN* han sido descritas en linfomas, incluyendo LCCT y LTP^{21, 23}. Por otro lado, encontramos un paciente con mutación en el gen *CSF2RB*; mutaciones en este gen se han encontrado en LL-T³¹⁶ y en líneas celulares derivadas de LCCT²³. Mutaciones en los genes *LPL* y *PIK3C2B* también se han encontrado en pacientes y líneas celulares de LCCT²³.

Mutaciones en genes implicados en el ciclo celular se han encontrado en un 3.1% de los casos (2 LTAI y 1 LTPNE). Por un lado, encontramos dos pacientes con mutaciones en el dominio de unión al ADN en el gen *TP53*. Dichas mutaciones han sido previamente descritas en diferentes tipos de tumores sólidos³¹⁷⁻³²¹. Mutaciones en *TP53* han sido encontradas en LTP y LCCT^{23, 32}. Encontramos la mutación RB1-A333E, la cual se relacionó con la expresión de Ki-67. El gen *RBI* se ha encontrado mutado en LCCT²³ y delecionado en un 25% de los mismos²⁹⁷.

En este estudio, encontramos una correlación significativa entre mutaciones en ambas vías de señalización. Esta relación podría ser debida a que el gen *RB* es esencial para controlar la supresión del crecimiento celular mediado por *PTEN*³²². La presencia de mutaciones en estas vías de señalización no se asoció con pronóstico.

6.2.3.4. Vía de señalización de JAK/STAT

Mutaciones en genes de la vía de señalización de JAK/STAT se han encontrado en un 6.1% de los casos (3 LTAI, 2 LTP-TFH y 2 LTPNE). En este estudio las mutaciones encontradas en el gen *JAK1* ocurren en los dominios quinasa y pseudo-quinasa. Estos datos coinciden con los publicados por otros grupos en linfomas de célula T^{26, 32, 195, 203, 323}. Las mutaciones T901R y G1097V han sido previamente descritas en leucemia prolinfocítica T y LACG asociado al implante de mama^{323, 324}. Por otro lado, encontramos mutaciones en el dominio de unión al ADN en los genes *STAT*. La mutación STAT1-E563K se relacionó con la expresión de p-STAT6. Dicha mutación ha sido previamente descrita en LTP²⁰. Recientemente, un estudio ha mostrado mutaciones en el gen *STAT6* en LTAI¹³⁵, pero no muestran correlación con la fosforilación de la proteína; sin embargo nuestro panel de estudio NGS, no engloba dicho gen. En este estudio encontramos un caso con la mutación STAT3-D566N, el cual mostró expresión nuclear de p-STAT3 y positividad para CD30. Se trata de un paciente que expresa marcadores de fenotipo T_{TFH} (LTP-TFH) carente de morfología anaplásica, por lo que este dato muestra que mutaciones en *STAT3* pueden encontrarse en otros linfomas T que no sean LACG¹⁹⁵. En este estudio, encontramos la mutación CCR4-Y331*, la cual ha sido descrita previamente en ATL^{24, 325}. Otras mutaciones en este gen han sido descritas en LCCT y ATL^{23, 326} y se ha observado que confiere peor pronóstico en pacientes con ATL. Yhosida y cols. identificaron que mutaciones en el gen *CCR4* en pacientes con ATL promueven la activación de la vía de señalización de PI3K³²⁶. En

este trabajo, encontramos una correlación entre la presencia de mutaciones en las vías JAK/STAT y PI3K.

En este trabajo, la frecuencia de mutaciones en genes JAK/STAT es ligeramente mayor que la encontrada por Vallois y cols. (4.7%)²⁶. Encontramos una relación entre la presencia de mutaciones en esta vía y el fenotipo T_{FH}; sin embargo Vallois y cols.²⁶ sugieren que las mutaciones en JAK/STAT no tienen mucha importancia en la patogénesis de los linfomas derivados de células T_{FH}. En este estudio, la presencia de mutaciones en esta vía de señalización se asoció con una menor supervivencia. Este dato no se ha encontrado previamente descrito en LTP, aunque recientemente se han identificado mutaciones en la vía de señalización de JAK/STAT como un mecanismo oncogénico en leucemias y linfomas de célula T^{20, 24, 26, 32, 194, 195, 197-203, 323}, hallazgos que sugieren esta vía como una potencial diana terapéutica en linfomas de células T²⁰⁷.

6.2.3.5. Vías de señalización de TCR y MAPK

Mutaciones en la vía de señalización de TCR han sido observadas en un 2% de los casos incluyendo 1 LTAI y 1 LTP-TFH. Por su parte, mutaciones en genes de la vía de las MAPK se han encontrado también en un 2% de los pacientes (1 LTAI y 1 LTP-TFH). En ninguno de los casos, la presencia de mutaciones en estas vías se relacionó con pronóstico.

Las mutaciones encontradas en este estudio en el gen *PDCDI* no han sido descritas previamente en la literatura. Encontramos un caso con la mutación PDCDI-Y223*, el cual mostró expresión de PD-1. Sin embargo el paciente con la mutación PDCDI-A202T no mostró expresión de PD-1. Esta descrito que *PDCDI* previene la proliferación continua de linfocitos T³²⁷ y se ha encontrado deletado y mutado en LCCT^{23, 297}.

Mutaciones en genes de la vía de las MAPK, como las encontradas en este estudio (*MAP3K5* y *RASAI*), no han sido descritas previamente. Mutaciones en el gen *MAP3K5* han sido descritas en melanoma y LCCT^{23, 328}, destacando una disminución en la expresión de *ERK*. En nuestro trabajo, el paciente con mutación en este gen, no mostró expresión nuclear de p-ERK. Por otro lado, mutaciones en *RASAI* están involucradas en desórdenes vasculares³²⁹ y se han descrito en LCCT²³, las cuales pueden producir una haploinsuficiencia en la proteína generando un incremento en la

vía de señalización de las MAPK³³⁰. En este estudio, el paciente con la mutación en el gen *RASAI* mostró expresión nuclear de p-ERK.

En resumen, la presencia de mutaciones en genes de vías de señalización implicadas en LTP identifica posibles dianas terapéuticas y podría permitir seleccionar pacientes susceptibles a tratamientos con inhibidores específicos^{26, 203}.

6.3. Observaciones finales y perspectivas

El trabajo presentado en esta Tesis Doctoral integra estudios moleculares de alta profundidad que ha permitido el reconocimiento de rutas y genes esenciales para la supervivencia de células neoplásicas, con el objetivo de entender mejor la patogenia molecular de los LTP, llevando a cabo una clasificación más precisa de los diferentes subtipos histológicos, y la posible identificación de marcadores que orienten la terapia; sin embargo, quedan áreas de investigación futura.

El análisis de los perfiles de expresión realizado en este trabajo demuestra un impacto pronóstico en los LTP, identificando un subtipo de pacientes diagnosticados de LTAI con alta expresión de p-ERK y menor supervivencia. Por otro lado, un subtipo de pacientes LTPNE con peor pronóstico, asociado con la expresión incrementada de GATA3.

Varios estudios han mostrado que los LTAI tienen un perfil de expresión diferente a los LTPNE, siendo similares a las células T_{FH} normales^{38, 39, 43}. Además, se ha podido demostrar que aproximadamente el 20% de los LTPNE podrían reclasificarse como LTAI^{42, 44}, debido a que expresan marcadores asociados a células T_{FH}^{15, 43, 331-333}. En el estudio de NGS, hemos clasificado un 45% de casos LTPNE como LTP-TFH, mediante datos inmunohistoquímicos. Nuestros resultados sugieren que la expresión de marcadores de fenotipo T_{FH} no ayuda a distinguir de forma nítida a los LTAI de otros linfomas derivados de células T_{FH}, así coincidiendo con datos publicados por otros autores⁷. Por otro lado, el estudio mutacional, reveló que la frecuencia de mutaciones en los LTPNE y en los LTP-TFH fue llamativamente inferior con respecto a los casos diagnosticados de LTAI. Estudios previos observaron esta baja frecuencia sólo en pacientes con LTPNE^{7, 26}. El reconocimiento de un patrón de mutación altamente específico podría ayudar a distinguir un subtipo histológico de otro. Aunque en este estudio hay un grupo de casos con alta carga mutacional y fenotipo T_{FH}, este hallazgo

no tiene una repercusión clínica, por lo que no encontramos límites precisos que separen los LTAI y los LTP-TFH.

La identificación de mutaciones frecuentes en reguladores epigenéticos y genes de diferentes vías de señalización implicadas en la patogénesis de los LTP podría servir para identificar dianas terapéuticas.

De este modo, la identificación de marcadores moleculares contribuye a mejorar la clasificación de los distintos subtipos de LTP de cara a la terapia. Los datos mostrados en este trabajo suponen un discreto progreso, requiriendo estudios posteriores que confirmen estas observaciones y la traslade a la clínica.

CONCLUSIONES

Los análisis de expresión y mutacionales aquí realizados permiten identificar firmas y genes mutados que amplían nuestro entendimiento de la biología de estos tumores, permite revisar la suclasificación de los mismos y hace posible proponer nuevas dianas terapéuticas o confirmar algunas ya establecidas. En concreto,

1. La NGS es un método eficaz para detectar alteraciones genéticas en muestras FFIP, incluso en casos con baja proporción de células neoplásicas, que podrían no haber sido detectadas mediante secuenciación Sanger.
2. Las expresiones de p-ERK, C-MYC y Ki-67 permiten identificar subgrupos de pacientes con peor pronóstico, susceptibles de un tratamiento con inhibidores de la vía RAS/RAF/MEK/ERK.
3. La expresión de p-ERK y GATA3 permite reconocer grupos de pacientes diagnosticados de Linfoma T angioinmunoblástico y linfoma T periférico no especificado, con comportamiento más agresivo.
4. La mutación RHOA-G17V se relaciona con la expresión de p-ERK, PD-1, CXCL13, CD10 y p52. Pacientes con esta mutación podrían ser susceptibles a un tratamiento con inhibidores de las vías de ERK, PI3K y/o NF- κ B.
5. La mutación PLCG1-S345F se relaciona con la expresión de CD30, p50 y GATA3 y confiere peor pronóstico a pacientes con Linfoma T periférico no especificado. Pacientes con la mutación PLCG1-S345F podrían ser susceptibles a un tratamiento con inhibidores de la vía de NF- κ B o un tratamiento dirigido anti-CD30.
6. Mutaciones en los genes *RHOA*, *TET2*, *IDH2* y *DNMT3A* se relacionan con un fenotipo T_{FH}. Sin embargo, este patrón no distingue de forma clara los Linfomas T angioinmunoblásticos de otros Linfomas T periféricos derivados de células T_{FH}.
7. Mutaciones en la vía de señalización de JAK/STAT confieren peor pronóstico a pacientes con Linfomas T periféricos y se relacionan con la presencia de mutaciones en la vía PI3K. Pacientes con mutaciones en estas vías podrían ser susceptibles a tratamientos con inhibidores específicos.

BIBLIOGRAFÍA

- 1 S. H. Swerdlow, E. Campo, S. A. Pileri, N. L. Harris, H. Stein, R. Siebert, R. Advani, M. Ghielmini, G. A. Salles, A. D. Zelenetz and E. S. Jaffe. The 2016 revision of the World Health Organization classification of lymphoid neoplasms. *Blood*. 2016;127(20):2375-90.
- 2 J. Vose, J. Armitage and D. Weisenburger. International peripheral T-cell and natural killer/T-cell lymphoma study: pathology findings and clinical outcomes. *J Clin Oncol*. 2008;26(25):4124-30.
- 3 M. A. Rizvi, A. M. Evens, M. S. Tallman, B. P. Nelson and S. T. Rosen. T-cell non-Hodgkin lymphoma. *Blood*. 2006;107(4):1255-64.
- 4 T. Rudiger, D. D. Weisenburger, J. R. Anderson, J. O. Armitage, J. Diebold, K. A. MacLennan, B. N. Nathwani, F. Ullrich and H. K. Muller-Hermelink. Peripheral T-cell lymphoma (excluding anaplastic large-cell lymphoma): results from the Non-Hodgkin's Lymphoma Classification Project. *Ann Oncol*. 2002;13(1):140-9.
- 5 L. de Leval and P. Gaulard. Pathology and biology of peripheral T-cell lymphomas. *Histopathology*. 2011;58(1):49-68.
- 6 F. M. Foss, P. L. Zinzani, J. M. Vose, R. D. Gascoyne, S. T. Rosen and K. Tobinai. Peripheral T-cell lymphoma. *Blood*. 2011;117(25):6756-67.
- 7 M. P. Dobay, F. Lemonnier, E. Missiaglia, C. Bastard, D. Vallois, J. P. Jais, L. Scourzic, A. Dupuy, V. Fataccioli, A. Pujals, M. Parrens, F. Le Bras, T. Rousset, J. M. Picquenot, N. Martin, C. Haioun, R. Delarue, O. A. Bernard, M. Delorenzi, L. de Leval and P. Gaulard. Integrative clinicopathological and molecular analyses of angioimmunoblastic T-cell lymphoma and other nodal lymphomas of follicular helper T-cell origin. *Haematologica*. 2017;102(4):e148-e51.
- 8 H. Stein, D. Y. Mason, J. Gerdes, N. O'Connor, J. Wainscoat, G. Pallesen, K. Gatter, B. Falini, G. Delsol, H. Lemke and et al. The expression of the Hodgkin's disease associated antigen Ki-1 in reactive and neoplastic lymphoid tissue: evidence that Reed-Sternberg cells and histiocytic malignancies are derived from activated lymphoid cells. *Blood*. 1985;66(4):848-58.
- 9 S. W. Morris, M. N. Kirstein, M. B. Valentine, K. Dittmer, D. N. Shapiro, A. T. Look and D. L. Saltman. Fusion of a kinase gene, ALK, to a nucleolar protein gene, NPM, in non-Hodgkin's lymphoma. *Science*. 1995;267(5196):316-7.
- 10 S. W. Morris, C. Naeve, P. Mathew, P. L. James, M. N. Kirstein, X. Cui and D. P. Witte. ALK, the chromosome 2 gene locus altered by the t(2;5) in non-Hodgkin's

lymphoma, encodes a novel neural receptor tyrosine kinase that is highly related to leukocyte tyrosine kinase (LTK). *Oncogene*. 1997;14(18):2175-88.

11 M. Shiota and S. Mori. Anaplastic large cell lymphomas expressing the novel chimeric protein p80NPM/ALK: a distinct clinicopathologic entity. *Leukemia*. 1997;11 Suppl 3(538-40).

12 M. Marzec, M. Kasprzycka, X. Liu, P. N. Raghunath, P. Wlodarski and M. A. Wasik. Oncogenic tyrosine kinase NPM/ALK induces activation of the MEK/ERK signaling pathway independently of c-Raf. *Oncogene*. 2007;26(6):813-21.

13 A. J. Ferreri, S. Govi, S. A. Pileri and K. J. Savage. Anaplastic large cell lymphoma, ALK-positive. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2012;83(2):293-302.

14 L. de Leval, E. Savilo, J. Longtine, J. A. Ferry and N. L. Harris. Peripheral T-cell lymphoma with follicular involvement and a CD4+/bcl-6+ phenotype. *Am J Surg Pathol*. 2001;25(3):395-400.

15 Y. Huang, A. Moreau, J. Dupuis, B. Streubel, B. Petit, S. Le Gouill, N. Martin-Garcia, C. Copie-Bergman, F. Gaillard, M. Qubaja, B. Fabiani, G. Roncador, C. Haioun, M. H. Delfau-Larue, T. Marafioti, A. Chott and P. Gaulard. Peripheral T-cell lymphomas with a follicular growth pattern are derived from follicular helper T cells (TFH) and may show overlapping features with angioimmunoblastic T-cell lymphomas. *Am J Surg Pathol*. 2009;33(5):682-90.

16 C. Dierks, F. Adrian, P. Fisch, H. Ma, H. Maurer, D. Herchenbach, C. U. Forster, C. Sprissler, G. Liu, S. Rottmann, G. R. Guo, Z. Katja, H. Veelken and M. Warmuth. The ITK-SYK fusion oncogene induces a T-cell lymphoproliferative disease in mice mimicking human disease. *Cancer Res*. 2010;70(15):6193-204.

17 K. Pechloff, J. Holch, U. Ferch, M. Schweneker, K. Brunner, M. Kremer, T. Sparwasser, L. Quintanilla-Martinez, U. Zimmer-Strobl, B. Streubel, A. Gewies, C. Peschel and J. Ruland. The fusion kinase ITK-SYK mimics a T cell receptor signal and drives oncogenesis in conditional mouse models of peripheral T cell lymphoma. *J Exp Med*. 2010;207(5):1031-44.

18 T. Serwold, K. Hochedlinger, J. Swindle, J. Hedgpeth, R. Jaenisch and I. L. Weissman. T-cell receptor-driven lymphomagenesis in mice derived from a reprogrammed T cell. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010;107(44):18939-43.

19 A. L. Feldman, D. X. Sun, M. E. Law, A. J. Novak, A. D. Attygalle, E. C. Thorland, S. R. Fink, J. A. Vrana, B. L. Caron, W. G. Morice, E. D. Remstein, K. L.

Grogg, P. J. Kurtin, W. R. Macon and A. Dogan. Overexpression of Syk tyrosine kinase in peripheral T-cell lymphomas. *Leukemia*. 2008;22(6):1139-43.

20 T. Palomero, L. Couronne, H. Khiabani, M. Y. Kim, A. Ambesi-Impiombato, A. Perez-Garcia, Z. Carpenter, F. Abate, M. Allegretta, J. E. Haydu, X. Jiang, I. S. Lossos, C. Nicolas, M. Balbin, C. Bastard, G. Bhagat, M. A. Piris, E. Campo, O. A. Bernard, R. Rabadan and A. A. Ferrando. Recurrent mutations in epigenetic regulators, RHOA and FYN kinase in peripheral T cell lymphomas. *Nat Genet*. 2014;46(2):166-70.

21 M. Sakata-Yanagimoto, T. Enami, K. Yoshida, Y. Shiraishi, R. Ishii, Y. Miyake, H. Muto, N. Tsuyama, A. Sato-Otsubo, Y. Okuno, S. Sakata, Y. Kamada, R. Nakamoto-Matsubara, N. B. Tran, K. Izutsu, Y. Sato, Y. Ohta, J. Furuta, S. Shimizu, T. Komeno, T. Ito, M. Noguchi, E. Noguchi, M. Sanada, K. Chiba, H. Tanaka, K. Suzukawa, T. Nanmoku, Y. Hasegawa, O. Nureki, S. Miyano, N. Nakamura, K. Takeuchi, S. Ogawa and S. Chiba. Somatic RHOA mutation in angioimmunoblastic T cell lymphoma. *Nat Genet*. 2014;46(2):171-5.

22 H. Y. Yoo, M. K. Sung, S. H. Lee, S. Kim, H. Lee, S. Park, S. C. Kim, B. Lee, K. Rho, J. E. Lee, K. H. Cho, W. Kim, H. Ju, J. Kim, S. J. Kim, W. S. Kim, S. Lee and Y. H. Ko. A recurrent inactivating mutation in RHOA GTPase in angioimmunoblastic T cell lymphoma. *Nat Genet*. 2014;46(4):371-5.

23 J. P. Vaque, G. Gomez-Lopez, V. Monsalvez, I. Varela, N. Martinez, C. Perez, O. Dominguez, O. Grana, J. L. Rodriguez-Peralto, S. M. Rodriguez-Pinilla, C. Gonzalez-Vela, M. Rubio-Camarillo, E. Martin-Sanchez, D. G. Pisano, E. Papadavid, T. Papadaki, L. Requena, J. A. Garcia-Marco, M. Mendez, M. Provencio, M. Hospital, D. Suarez-Massa, C. Postigo, D. San Segundo, M. Lopez-Hoyos, P. L. Ortiz-Romero, M. A. Piris and M. Sanchez-Beato. PLCG1 mutations in cutaneous T-cell lymphomas. *Blood*. 2014;123(13):2034-43.

24 K. Kataoka, Y. Nagata, A. Kitanaka, Y. Shiraishi, T. Shimamura, J. Yasunaga, Y. Totoki, K. Chiba, A. Sato-Otsubo, G. Nagae, R. Ishii, S. Muto, S. Kotani, Y. Watatani, J. Takeda, M. Sanada, H. Tanaka, H. Suzuki, Y. Sato, Y. Shiozawa, T. Yoshizato, K. Yoshida, H. Makishima, M. Iwanaga, G. Ma, K. Nosaka, M. Hishizawa, H. Itonaga, Y. Imaizumi, W. Munakata, H. Ogasawara, T. Sato, K. Sasai, K. Muramoto, M. Penova, T. Kawaguchi, H. Nakamura, N. Hama, K. Shide, Y. Kubuki, T. Hidaka, T. Kameda, T. Nakamaki, K. Ishiyama, S. Miyawaki, S. S. Yoon, K. Tobinai, Y. Miyazaki, A. Takaori-Kondo, F. Matsuda, K. Takeuchi, O. Nureki, H. Aburatani, T.

- Watanabe, T. Shibata, M. Matsuoka, S. Miyano, K. Shimoda and S. Ogawa. Integrated molecular analysis of adult T cell leukemia/lymphoma. *Nat Genet.* 2015;47(11):1304-15.
- 25 J. Rohr, S. Guo, J. Huo, A. Bouska, C. Lachel, Y. Li, P. D. Simone, W. Zhang, Q. Gong, C. Wang, A. Cannon, T. Heavican, A. Mottok, S. Hung, A. Rosenwald, R. Gascoyne, K. Fu, T. C. Greiner, D. D. Weisenburger, J. M. Vose, L. M. Staudt, W. Xiao, G. E. Borgstahl, S. Davis, C. Steidl, T. McKeithan, J. Iqbal and W. C. Chan. Recurrent activating mutations of CD28 in peripheral T-cell lymphomas. *Leukemia.* 2016;30(5):1062-70.
- 26 D. Vallois, M. P. Dobay, R. D. Morin, F. Lemonnier, E. Missiaglia, M. Juilland, J. Iwaszkiewicz, V. Fataccioli, B. Bisig, A. Roberti, J. Grewal, J. Bruneau, B. Fabiani, A. Martin, C. Bonnet, O. Michielin, J. P. Jais, M. Figeac, O. A. Bernard, M. Delorenzi, C. Haioun, O. Tournilhac, M. Thome, R. D. Gascoyne, P. Gaulard and L. de Leval. Activating mutations in genes related to TCR signaling in angioimmunoblastic and other follicular helper T-cell-derived lymphomas. *Blood.* 2016;128(11):1490-502.
- 27 M. Wang, S. Zhang, S. S. Chuang, M. Ashton-Key, E. Ochoa, N. Bolli, G. Vassiliou, Z. Gao and M. Q. Du. Angioimmunoblastic T cell lymphoma: novel molecular insights by mutation profiling. *Oncotarget.* 2017;8(11):17763-70.
- 28 T. B. Nguyen, M. Sakata-Yanagimoto, Y. Asabe, D. Matsubara, J. Kano, K. Yoshida, Y. Shiraishi, K. Chiba, H. Tanaka, S. Miyano, K. Izutsu, N. Nakamura, K. Takeuchi, H. Miyoshi, K. Ohshima, T. Minowa, S. Ogawa, M. Noguchi and S. Chiba. Identification of cell-type-specific mutations in nodal T-cell lymphomas. *Blood Cancer J.* 2017;7(1):e516.
- 29 R. A. Cairns, J. Iqbal, F. Lemonnier, C. Kucuk, L. de Leval, J. P. Jais, M. Parrens, A. Martin, L. Xerri, P. Brousset, L. C. Chan, W. C. Chan, P. Gaulard and T. W. Mak. IDH2 mutations are frequent in angioimmunoblastic T-cell lymphoma. *Blood.* 2012;119(8):1901-3.
- 30 L. Couronne, C. Bastard and O. A. Bernard. TET2 and DNMT3A mutations in human T-cell lymphoma. *N Engl J Med.* 2012;366(1):95-6.
- 31 F. Lemonnier, L. Couronne, M. Parrens, J. P. Jais, M. Travert, L. Lamant, O. Tournillac, T. Rousset, B. Fabiani, R. A. Cairns, T. Mak, C. Bastard, O. A. Bernard, L. de Leval and P. Gaulard. Recurrent TET2 mutations in peripheral T-cell lymphomas

correlate with TFH-like features and adverse clinical parameters. *Blood*. 2012;120(7):1466-9.

32 O. Odejide, O. Weigert, A. A. Lane, D. Toscano, M. A. Lunning, N. Kopp, S. Kim, D. van Bodegom, S. Bolla, J. Schatz, J. Teruya-Feldstein, E. Hochberg, A. Louissaint, D. Dorfman, K. Stevenson, S. J. Rodig, P. P. Piccaluga, E. Jacobsen, S. A. Pileri, N. L. Harris, S. Ferrero, G. Inghirami, S. M. Horwitz and D. M. Weinstock. A targeted mutational landscape of angioimmunoblastic T cell lymphoma. *Blood*. 2014;123(9):1293-6.

33 W. L. Zhao. Targeted therapy in T-cell malignancies: dysregulation of the cellular signaling pathways. *Leukemia*. 2010;24(1):13-21.

34 E. Martin-Sanchez, S. M. Rodriguez-Pinilla, M. Sanchez-Beato, L. Lombardia, B. Dominguez-Gonzalez, D. Romero, L. Odqvist, P. Garcia-Sanz, M. B. Wozniak, G. Kurz, C. Blanco-Aparicio, M. Mollejo, F. J. Alves, J. Menarguez, F. Gonzalez-Palacios, J. L. Rodriguez-Peralto, P. L. Ortiz-Romero, J. F. Garcia, J. R. Bischoff and M. A. Piris. Simultaneous inhibition of pan-phosphatidylinositol-3-kinases and MEK as a potential therapeutic strategy in peripheral T-cell lymphomas. *Haematologica*. 2013;98(1):57-64.

35 L. Quintanilla-Martinez, S. Kumar, F. Fend, E. Reyes, J. Teruya-Feldstein, D. W. Kingma, L. Sorbara, M. Raffeld, S. E. Straus and E. S. Jaffe. Fulminant EBV(+) T-cell lymphoproliferative disorder following acute/chronic EBV infection: a distinct clinicopathologic syndrome. *Blood*. 2000;96(2):443-51.

36 B. Martinez-Delgado, M. Cuadros, E. Honrado, A. Ruiz de la Parte, G. Roncador, J. Alves, J. M. Castrillo, C. Rivas and J. Benitez. Differential expression of NF-kappaB pathway genes among peripheral T-cell lymphomas. *Leukemia*. 2005;19(12):2254-63.

37 B. Ballester, O. Ramuz, C. Gisselbrecht, G. Doucet, L. Loi, B. Loriod, F. Bertucci, R. Bouabdallah, E. Devilard, N. Carbuccia, M. J. Mozziconacci, D. Birnbaum, P. Brousset, F. Berger, G. Salles, J. Briere, R. Houlgatte, P. Gaulard and L. Xerri. Gene expression profiling identifies molecular subgroups among nodal peripheral T-cell lymphomas. *Oncogene*. 2006;25(10):1560-70.

38 L. de Leval, D. S. Rickman, C. Thielen, Ad Reynies, Y. L. Huang, G. Delsol, L. Lamant, K. Leroy, J. Briere, T. Molina, F. Berger, C. Gisselbrecht, L. Xerri and P. Gaulard. The gene expression profile of nodal peripheral T-cell lymphoma demonstrates

a molecular link between angioimmunoblastic T-cell lymphoma (AITL) and follicular helper T (TFH) cells. *Blood*. 2007;109(11):4952-63.

39 P. P. Piccaluga, C. Agostinelli, A. Califano, A. Carbone, L. Fantoni, S. Ferrari, A. Gazzola, A. Gloghini, S. Righi, M. Rossi, E. Tagliafico, P. L. Zinzani, S. Zupo, M. Baccarani and S. A. Pileri. Gene expression analysis of angioimmunoblastic lymphoma indicates derivation from T follicular helper cells and vascular endothelial growth factor deregulation. *Cancer Res*. 2007;67(22):10703-10.

40 P. P. Piccaluga, C. Agostinelli, A. Califano, M. Rossi, K. Basso, S. Zupo, P. Went, U. Klein, P. L. Zinzani, M. Baccarani, R. Dalla Favera and S. A. Pileri. Gene expression analysis of peripheral T cell lymphoma, unspecified, reveals distinct profiles and new potential therapeutic targets. *J Clin Invest*. 2007;117(3):823-34.

41 M. Cuadros, S. S. Dave, E. S. Jaffe, E. Honrado, R. Milne, J. Alves, J. Rodriguez, M. Zajac, J. Benitez, L. M. Staudt and B. Martinez-Delgado. Identification of a proliferation signature related to survival in nodal peripheral T-cell lymphomas. *J Clin Oncol*. 2007;25(22):3321-9.

42 J. Iqbal, D. D. Weisenburger, T. C. Greiner, J. M. Vose, T. McKeithan, C. Kucuk, H. Geng, K. Deffenbacher, L. Smith, K. Dybkaer, S. Nakamura, M. Seto, J. Delabie, F. Berger, F. Loong, W. Y. Au, Y. H. Ko, I. Sng, J. O. Armitage and W. C. Chan. Molecular signatures to improve diagnosis in peripheral T-cell lymphoma and prognostication in angioimmunoblastic T-cell lymphoma. *Blood*. 2010;115(5):1026-36.

43 S. M. Rodriguez-Pinilla, L. Atienza, C. Murillo, A. Perez-Rodriguez, S. Montes-Moreno, G. Roncador, C. Perez-Seoane, P. Dominguez, F. I. Camacho and M. A. Piris. Peripheral T-cell lymphoma with follicular T-cell markers. *Am J Surg Pathol*. 2008;32(12):1787-99.

44 J. Iqbal, G. Wright, C. Wang, A. Rosenwald, R. D. Gascoyne, D. D. Weisenburger, T. C. Greiner, L. Smith, S. Guo, R. A. Wilcox, B. T. Teh, S. T. Lim, S. Y. Tan, L. M. Rimsza, E. S. Jaffe, E. Campo, A. Martinez, J. Delabie, R. M. Braziel, J. R. Cook, R. R. Tubbs, G. Ott, E. Geissinger, P. Gaulard, P. P. Piccaluga, S. A. Pileri, W. Y. Au, S. Nakamura, M. Seto, F. Berger, L. de Leval, J. M. Connors, J. Armitage, J. Vose, W. C. Chan and L. M. Staudt. Gene expression signatures delineate biological and prognostic subgroups in peripheral T-cell lymphoma. *Blood*. 2014;123(19):2915-23.

- 45 X. Wang, M. B. Werneck, B. G. Wilson, H. J. Kim, M. J. Kluk, C. S. Thom, J. W. Wischhusen, J. A. Evans, J. L. Jesneck, P. Nguyen, C. G. Sansam, H. Cantor and C. W. Roberts. TCR-dependent transformation of mature memory phenotype T cells in mice. *J Clin Invest*. 2011;121(10):3834-45.
- 46 E. Geissinger, P. Sadler, S. Roth, T. Grieb, B. Puppe, N. Muller, P. Reimer, C. S. Vetter-Kauczok, J. Wenzel, I. Bonzheim, T. Rudiger, H. K. Muller-Hermelink and A. Rosenwald. Disturbed expression of the T-cell receptor/CD3 complex and associated signaling molecules in CD30+ T-cell lymphoproliferations. *Haematologica*. 2010;95(10):1697-704.
- 47 S. M. Rodriguez-Pinilla, M. E. Sanchez, J. Rodriguez, J. F. Garcia, B. Sanchez-Espiridion, L. F. Lamana, G. Sosa, J. C. Rivero, J. Menarguez, I. B. Gomez, F. I. Camacho, P. R. Guillen, C. P. Orduna, G. Rodriguez, C. Barrionuevo, R. Franco, M. Mollejo, J. F. Marco, R. D. de Otazu and M. A. Piris. Loss of TCR-beta F1 and/or EZRIN expression is associated with unfavorable prognosis in nodal peripheral T-cell lymphomas. *Blood Cancer J*. 2013;3(e111).
- 48 M. A. Thompson, J. Stumph, S. E. Henrickson, A. Rosenwald, Q. Wang, S. Olson, S. J. Brandt, J. Roberts, X. Zhang, Y. Shyr and M. C. Kinney. Differential gene expression in anaplastic lymphoma kinase-positive and anaplastic lymphoma kinase-negative anaplastic large cell lymphomas. *Hum Pathol*. 2005;36(5):494-504.
- 49 A. Dogan, A. D. Attygalle and C. Kyriakou. Angioimmunoblastic T-cell lymphoma. *Br J Haematol*. 2003;121(5):681-91.
- 50 L. de Leval, C. Gisselbrecht and P. Gaulard. Advances in the understanding and management of angioimmunoblastic T-cell lymphoma. *Br J Haematol*. 2010;148(5):673-89.
- 51 H. Stein, H. D. Foss, H. Durkop, T. Marafioti, G. Delsol, K. Pulford, S. Pileri and B. Falini. CD30(+) anaplastic large cell lymphoma: a review of its histopathologic, genetic, and clinical features. *Blood*. 2000;96(12):3681-95.
- 52 A. Fornari, R. Piva, R. Chiarle, D. Novero and G. Inghirami. Anaplastic large cell lymphoma: one or more entities among T-cell lymphoma? *Hematol Oncol*. 2009;27(4):161-70.
- 53 Y. Zhou, A. D. Attygalle, S. S. Chuang, T. Diss, H. Ye, H. Liu, R. A. Hamoudi, P. Munson, C. M. Bacon, A. Dogan and M. Q. Du. Angioimmunoblastic T-cell

lymphoma: histological progression associates with EBV and HHV6B viral load. *Br J Haematol.* 2007;138(1):44-53.

54 K. L. Grogg, A. D. Attygalle, W. R. Macon, E. D. Remstein, P. J. Kurtin and A. Dogan. Expression of CXCL13, a chemokine highly upregulated in germinal center T-helper cells, distinguishes angioimmunoblastic T-cell lymphoma from peripheral T-cell lymphoma, unspecified. *Mod Pathol.* 2006;19(8):1101-7.

55 P. Went, C. Agostinelli, A. Gallamini, P. P. Piccaluga, S. Ascani, E. Sabbatini, F. Bacci, B. Falini, T. Motta, M. Paulli, T. Artusi, M. Piccioli, P. L. Zinzani and S. A. Pileri. Marker expression in peripheral T-cell lymphoma: a proposed clinical-pathologic prognostic score. *J Clin Oncol.* 2006;24(16):2472-9.

56 D. Rodriguez-Abreu, V. B. Filho and E. Zucca. Peripheral T-cell lymphomas, unspecified (or not otherwise specified): a review. *Hematol Oncol.* 2008;26(1):8-20.

57 I. Bonzheim, E. Geissinger, S. Roth, A. Zettl, A. Marx, A. Rosenwald, H. K. Muller-Hermelink and T. Rudiger. Anaplastic large cell lymphomas lack the expression of T-cell receptor molecules or molecules of proximal T-cell receptor signaling. *Blood.* 2004;104(10):3358-60.

58 H. D. Foss, I. Anagnostopoulos, I. Araujo, C. Assaf, G. Demel, J. A. Kummer, M. Hummel and H. Stein. Anaplastic large-cell lymphomas of T-cell and null-cell phenotype express cytotoxic molecules. *Blood.* 1996;88(10):4005-11.

59 C. Thorns, B. Bastian, D. Pinkel, R. Roydasgupta, J. Fridlyand, H. Merz, M. Krokowski, H. W. Bernd and A. C. Feller. Chromosomal aberrations in angioimmunoblastic T-cell lymphoma and peripheral T-cell lymphoma unspecified: A matrix-based CGH approach. *Genes Chromosomes Cancer.* 2007;46(1):37-44.

60 A. Zettl, T. Rudiger, M. A. Konrad, A. Chott, I. Simonitsch-Klupp, R. Sonnen, H. K. Muller-Hermelink and G. Ott. Genomic profiling of peripheral T-cell lymphoma, unspecified, and anaplastic large T-cell lymphoma delineates novel recurrent chromosomal alterations. *Am J Pathol.* 2004;164(5):1837-48.

61 L. Lamant, A. de Reynies, M. M. Duplantier, D. S. Rickman, F. Sabourdy, S. Giuriato, L. Brugieres, P. Gaulard, E. Espinos and G. Delsol. Gene-expression profiling of systemic anaplastic large-cell lymphoma reveals differences based on ALK status and two distinct morphologic ALK+ subtypes. *Blood.* 2007;109(5):2156-64.

62 I. Salaverria, S. Bea, A. Lopez-Guillermo, V. Lespinet, M. Pinyol, B. Burkhardt, L. Lamant, A. Zettl, D. Horsman, R. Gascoyne, G. Ott, R. Siebert, G. Delsol and E.

Campo. Genomic profiling reveals different genetic aberrations in systemic ALK-positive and ALK-negative anaplastic large cell lymphomas. *Br J Haematol.* 2008;140(5):516-26.

63 J. Suzumiya, K. Ohshima, K. Tamura, K. Karube, N. Uike, K. Tobinai, R. D. Gascoyne, J. M. Vose, J. O. Armitage and D. D. Weisenburger. The International Prognostic Index predicts outcome in aggressive adult T-cell leukemia/lymphoma: analysis of 126 patients from the International Peripheral T-Cell Lymphoma Project. *Ann Oncol.* 2009;20(4):715-21.

64 A. Gallamini, C. Stelitano, R. Calvi, M. Bellei, D. Mattei, U. Vitolo, F. Morabito, M. Martelli, E. Brusamolino, E. Iannitto, F. Zaja, S. Cortelazzo, L. Rigacci, L. Devizzi, G. Todeschini, G. Santini, M. Brugiatelli and M. Federico. Peripheral T-cell lymphoma unspecified (PTCL-U): a new prognostic model from a retrospective multicentric clinical study. *Blood.* 2004;103(7):2474-9.

65 N. Schmitz, L. Trumper, M. Ziepert, M. Nickelsen, A. D. Ho, B. Metzner, N. Peter, M. Loeffler, A. Rosenwald and M. Pfreundschuh. Treatment and prognosis of mature T-cell and NK-cell lymphoma: an analysis of patients with T-cell lymphoma treated in studies of the German High-Grade Non-Hodgkin Lymphoma Study Group. *Blood.* 2010;116(18):3418-25.

66 G. Gutierrez-Garcia, A. Garcia-Herrera, T. Cardesa, A. Martinez, N. Villamor, G. Ghita, A. Martinez-Trillos, L. Colomo, X. Setoain, S. Rodriguez, E. Gine, E. Campo and A. Lopez-Guillermo. Comparison of four prognostic scores in peripheral T-cell lymphoma. *Ann Oncol.* 2010;22(2):397-404.

67 P. Kanavaros, M. Bai, K. Stefanaki, G. Poussias, D. Rontogianni, E. Zioga, V. Gorgoulis and N. J. Agnantis. Immunohistochemical expression of the p53, mdm2, p21/Waf-1, Rb, p16, Ki67, cyclin D1, cyclin A and cyclin B1 proteins and apoptotic index in T-cell lymphomas. *Histol Histopathol.* 2001;16(2):377-86.

68 M. P. Escalon, N. S. Liu, Y. Yang, M. Hess, P. L. Walker, T. L. Smith and N. H. Dang. Prognostic factors and treatment of patients with T-cell non-Hodgkin lymphoma: the M. D. Anderson Cancer Center experience. *Cancer.* 2005;103(10):2091-8.

69 K. J. Savage. Therapies for peripheral T-cell lymphomas. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program.* 2011;2011(515-24).

70 V. Mak, J. Hamm, M. Chhanabhai, T. Shenkier, R. Klasa, L. H. Sehn, D. Villa, R. D. Gascoyne, J. M. Connors and K. J. Savage. Survival of patients with peripheral T-

cell lymphoma after first relapse or progression: spectrum of disease and rare long-term survivors. *J Clin Oncol.* 2013;31(16):1970-6.

71 S. J. Kim, K. Kim, B. S. Kim, C. Suh, J. Huh, Y. H. Ko and W. S. Kim. Alemtuzumab and DHAP (A-DHAP) is effective for relapsed peripheral T-cell lymphoma, unspecified: interim results of a phase II prospective study. *Ann Oncol.* 2009;20(2):390-2.

72 B. B. Park, B. Y. Ryoo, J. H. Lee, H. C. Kwon, S. H. Yang, H. J. Kang, H. J. Kim, S. Y. Oh, Y. H. Ko, J. R. Huh, S. S. Lee, E. M. Nam, K. W. Park, J. H. Kim, J. H. Kang, S. M. Bang, S. Park, K. Kim, K. Park, C. Suh and W. S. Kim. Clinical features and treatment outcomes of angioimmunoblastic T-cell lymphoma. *Leuk Lymphoma.* 2007;48(4):716-22.

73 D. A. Rider, C. E. Havenith, R. de Ridder, J. Schuurman, C. Favre, J. C. Cooper, S. Walker, O. Baadsgaard, S. Marschner, J. G. vandeWinkel, J. Cambier, P. W. Parren and D. R. Alexander. A human CD4 monoclonal antibody for the treatment of T-cell lymphoma combines inhibition of T-cell signaling by a dual mechanism with potent Fc-dependent effector activity. *Cancer Res.* 2007;67(20):9945-53.

74 J. Chen, M. Zhang, W. Ju and T. A. Waldmann. Effective treatment of a murine model of adult T-cell leukemia using depsiptide and its combination with unmodified daclizumab directed toward CD25. *Blood.* 2009;113(6):1287-93.

75 C. E. Dearden, R. Johnson, R. Pettengell, S. Devereux, K. Cwynarski, S. Whittaker and A. McMillan. Guidelines for the management of mature T-cell and NK-cell neoplasms (excluding cutaneous T-cell lymphoma). *Br J Haematol.* 2011;153(4):451-85.

76 B. Pro, R. Advani, P. Brice, N. L. Bartlett, J. D. Rosenblatt, T. Illidge, J. Matous, R. Ramchandren, M. Fanale, J. M. Connors, Y. Yang, E. L. Sievers, D. A. Kennedy and A. Shustov. Brentuximab vedotin (SGN-35) in patients with relapsed or refractory systemic anaplastic large-cell lymphoma: results of a phase II study. *J Clin Oncol.* 2012;30(18):2190-6.

77 Y. H. Kim, M. Tavallae, U. Sundram, K. A. Salva, G. S. Wood, S. Li, S. Rozati, S. Nagpal, M. Krathen, S. Reddy, R. T. Hoppe, A. Nguyen-Lin, W. K. Weng, R. Armstrong, M. Pulitzer, R. H. Advani and S. M. Horwitz. Phase II Investigator-Initiated Study of Brentuximab Vedotin in Mycosis Fungoides and Sezary Syndrome With

Variable CD30 Expression Level: A Multi-Institution Collaborative Project. *J Clin Oncol.* 2015;33(32):3750-8.

78 J. O. Armitage. The aggressive peripheral T-cell lymphomas: 2012 update on diagnosis, risk stratification, and management. *Am J Hematol.* 2012;87(5):511-9.

79 B. Coiffier, B. Pro, H. M. Prince, F. Foss, L. Sokol, M. Greenwood, D. Caballero, P. Borchmann, F. Morschhauser, M. Wilhelm, L. Pinter-Brown, S. Padmanabhan, A. Shustov, J. Nichols, S. Carroll, J. Balser, B. Balser and S. Horwitz. Results from a pivotal, open-label, phase II study of romidepsin in relapsed or refractory peripheral T-cell lymphoma after prior systemic therapy. *J Clin Oncol.* 2012;30(6):631-6.

80 O. A. O'Connor, B. Pro, L. Pinter-Brown, N. Bartlett, L. Popplewell, B. Coiffier, M. J. Lechowicz, K. J. Savage, A. R. Shustov, C. Gisselbrecht, E. Jacobsen, P. L. Zinzani, R. Furman, A. Goy, C. Haioun, M. Crump, J. M. Zain, E. Hsi, A. Boyd and S. Horwitz. Pralatrexate in patients with relapsed or refractory peripheral T-cell lymphoma: results from the pivotal PROPEL study. *J Clin Oncol.* 2011;29(9):1182-9.

81 P. Reimer, T. Rudiger, E. Geissinger, F. Weissinger, C. Nerl, N. Schmitz, A. Engert, H. Einsele, H. K. Muller-Hermelink and M. Wilhelm. Autologous stem-cell transplantation as first-line therapy in peripheral T-cell lymphomas: results of a prospective multicenter study. *J Clin Oncol.* 2009;27(1):106-13.

82 A. M. Intlekofer and A. Younes. From empiric to mechanism-based therapy for peripheral T cell lymphoma. *Int J Hematol.* 2014;99(3):249-62.

83 I. Aifantis, M. Mandal, K. Sawai, A. Ferrando and T. Vilimas. Regulation of T-cell progenitor survival and cell-cycle entry by the pre-T-cell receptor. *Immunol Rev.* 2006;209(159-69).

84 E. Arpaia, M. Shahar, H. Dadi, A. Cohen and C. M. Roifman. Defective T cell receptor signaling and CD8⁺ thymic selection in humans lacking zap-70 kinase. *Cell.* 1994;76(5):947-58.

85 M. E. Elder, D. Lin, J. Clever, A. C. Chan, T. J. Hope, A. Weiss and T. G. Parslow. Human severe combined immunodeficiency due to a defect in ZAP-70, a T cell tyrosine kinase. *Science.* 1994;264(5165):1596-9.

86 Q. Gong, L. White, R. Johnson, M. White, I. Negishi, M. Thomas and A. C. Chan. Restoration of thymocyte development and function in zap-70^{-/-} mice by the Syk protein tyrosine kinase. *Immunity.* 1997;7(3):369-77.

- 87 T. S. Finco, T. Kadlecsek, W. Zhang, L. E. Samelson and A. Weiss. LAT is required for TCR-mediated activation of PLCgamma1 and the Ras pathway. *Immunity*. 1998;9(5):617-26.
- 88 K. V. Salojin, J. Zhang, C. Meagher and T. L. Delovitch. ZAP-70 is essential for the T cell antigen receptor-induced plasma membrane targeting of SOS and Vav in T cells. *J Biol Chem*. 2000;275(8):5966-75.
- 89 M. Sieh, A. Batzer, J. Schlessinger and A. Weiss. GRB2 and phospholipase C-gamma 1 associate with a 36- to 38-kilodalton phosphotyrosine protein after T-cell receptor stimulation. *Mol Cell Biol*. 1994;14(7):4435-42.
- 90 Q. Qi and A. August. Keeping the (kinase) party going: SLP-76 and ITK dance to the beat. *Sci STKE*. 2007;2007(396):pe39.
- 91 R. L. Williams and M. Katan. Structural views of phosphoinositide-specific phospholipase C: signalling the way ahead. *Structure*. 1996;4(12):1387-94.
- 92 J. P. Roose, M. Mollenauer, V. A. Gupta, J. Stone and A. Weiss. A diacylglycerol-protein kinase C-RasGRP1 pathway directs Ras activation upon antigen receptor stimulation of T cells. *Mol Cell Biol*. 2005;25(11):4426-41.
- 93 Z. Sun, C. W. Arendt, W. Ellmeier, E. M. Schaeffer, M. J. Sunshine, L. Gandhi, J. Annes, D. Petrzilka, A. Kupfer, P. L. Schwartzberg and D. R. Littman. PKC-theta is required for TCR-induced NF-kappaB activation in mature but not immature T lymphocytes. *Nature*. 2000;404(6776):402-7.
- 94 K. D. Fischer, Y. Y. Kong, H. Nishina, K. Tedford, L. E. Marengere, I. Kozieradzki, T. Sasaki, M. Starr, G. Chan, S. Gardener, M. P. Nghiem, D. Bouchard, M. Barbacid, A. Bernstein and J. M. Penninger. Vav is a regulator of cytoskeletal reorganization mediated by the T-cell receptor. *Curr Biol*. 1998;8(10):554-62.
- 95 W. Zhang, B. J. Irvin, R. P. Triple, R. T. Abraham and L. E. Samelson. Functional analysis of LAT in TCR-mediated signaling pathways using a LAT-deficient Jurkat cell line. *Int Immunol*. 1999;11(6):943-50.
- 96 M. M. McKay and D. K. Morrison. Integrating signals from RTKs to ERK/MAPK. *Oncogene*. 2007;26(22):3113-21.
- 97 W. B. Tsai, I. Aiba, Y. Long, H. K. Lin, L. Feun, N. Savaraj and M. T. Kuo. Activation of Ras/PI3K/ERK pathway induces c-Myc stabilization to upregulate argininosuccinate synthetase, leading to arginine deiminase resistance in melanoma cells. *Cancer Res*. 2012;72(10):2622-33.

- 98 R. Seger and E. G. Krebs. The MAPK signaling cascade. *FASEB J.* 1995;9(9):726-35.
- 99 R. Marais, Y. Light, C. Mason, H. Paterson, M. F. Olson and C. J. Marshall. Requirement of Ras-GTP-Raf complexes for activation of Raf-1 by protein kinase C. *Science.* 1998;280(5360):109-12.
- 100 M. Villalba, N. Coudronniere, M. Deckert, E. Teixeira, P. Mas and A. Altman. A novel functional interaction between Vav and PKCtheta is required for TCR-induced T cell activation. *Immunity.* 2000;12(2):151-60.
- 101 M. Villalba, J. Hernandez, M. Deckert, Y. Tanaka and A. Altman. Vav modulation of the Ras/MEK/ERK signaling pathway plays a role in NFAT activation and CD69 up-regulation. *Eur J Immunol.* 2000;30(6):1587-96.
- 102 M. Case, E. Matheson, L. Minto, R. Hassan, C. J. Harrison, N. Bown, S. Bailey, J. Vormoor, A. G. Hall and J. A. Irving. Mutation of genes affecting the RAS pathway is common in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Cancer Res.* 2008;68(16):6803-9.
- 103 H. Davies, G. R. Bignell, C. Cox, P. Stephens, S. Edkins, S. Clegg, J. Teague, H. Woffendin, M. J. Garnett, W. Bottomley, N. Davis, E. Dicks, R. Ewing, Y. Floyd, K. Gray, S. Hall, R. Hawes, J. Hughes, V. Kosmidou, A. Menzies, C. Mould, A. Parker, C. Stevens, S. Watt, S. Hooper, R. Wilson, H. Jayatilake, B. A. Gusterson, C. Cooper, J. Shipley, D. Hargrave, K. Pritchard-Jones, N. Maitland, G. Chenevix-Trench, G. J. Riggins, D. D. Bigner, G. Palmieri, A. Cossu, A. Flanagan, A. Nicholson, J. W. Ho, S. Y. Leung, S. T. Yuen, B. L. Weber, H. F. Seigler, T. L. Darrow, H. Paterson, R. Marais, C. J. Marshall, R. Wooster, M. R. Stratton and P. A. Futreal. Mutations of the BRAF gene in human cancer. *Nature.* 2002;417(6892):949-54.
- 104 V. Pettrossi, A. Santi, E. Imperi, G. Russo, A. Pucciarini, B. Bigerna, G. Schiavoni, E. Fortini, A. Spanhol-Rosseto, P. Sportoletti, R. Mannucci, M. P. Martelli, L. Klein-Hitpass, B. Falini and E. Tiacci. BRAF inhibitors reverse the unique molecular signature and phenotype of hairy cell leukemia and exert potent antileukemic activity. *Blood.* 2015;125(8):1207-16.
- 105 M. Kohno and J. Pouyssegur. Targeting the ERK signaling pathway in cancer therapy. *Ann Med.* 2006;38(3):200-11.
- 106 J. Lin and A. Weiss. T cell receptor signalling. *J Cell Sci.* 2001;114(Pt 2):243-4.

- 107 A. Rao, C. Luo and P. G. Hogan. Transcription factors of the NFAT family: regulation and function. *Annu Rev Immunol.* 1997;15(707-47).
- 108 E. J. Scheinman and O. Avni. Transcriptional regulation of GATA3 in T helper cells by the integrated activities of transcription factors downstream of the interleukin-4 receptor and T cell receptor. *J Biol Chem.* 2009;284(5):3037-48.
- 109 S. S. Bae, D. K. Perry, Y. S. Oh, J. H. Choi, S. H. Galadari, T. Ghayur, S. H. Ryu, Y. A. Hannun and P. G. Suh. Proteolytic cleavage of phospholipase C-gamma1 during apoptosis in Molt-4 cells. *FASEB J.* 2000;14(9):1083-92.
- 110 C. E. Crooke, A. Pozzi and G. F. Carpenter. PLC-gamma1 regulates fibronectin assembly and cell aggregation. *Exp Cell Res.* 2009;315(13):2207-14.
- 111 D. Husain, R. D. Meyer, M. Mehta, W. M. Pfeifer, E. Chou, G. Navruzbekov, E. Ahmed and N. Rahimi. Role of c-Cbl-dependent regulation of phospholipase Cgamma1 activation in experimental choroidal neovascularization. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2010;51(12):6803-9.
- 112 S. Y. Shin, H. Y. Choi, B. H. Ahn, S. Min do, S. W. Son and Y. H. Lee. Phospholipase Cgamma1 stimulates transcriptional activation of the matrix metalloproteinase-3 gene via the protein kinase C/Raf/ERK cascade. *Biochem Biophys Res Commun.* 2007;353(3):611-6.
- 113 Y. Wang, A. Tomar, S. P. George and S. Khurana. Obligatory role for phospholipase C-gamma(1) in villin-induced epithelial cell migration. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2007;292(5):C1775-86.
- 114 C. L. Arteaga, M. D. Johnson, G. Todderud, R. J. Coffey, G. Carpenter and D. L. Page. Elevated content of the tyrosine kinase substrate phospholipase C-gamma 1 in primary human breast carcinomas. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1991;88(23):10435-9.
- 115 D. Y. Noh, Y. H. Lee, S. S. Kim, Y. I. Kim, S. H. Ryu, P. G. Suh and J. G. Park. Elevated content of phospholipase C-gamma 1 in colorectal cancer tissues. *Cancer.* 1994;73(1):36-41.
- 116 J. C. Peak, N. P. Jones, S. Hobbs, M. Katan and S. A. Eccles. Phospholipase C gamma 1 regulates the Rap GEF1-Rap1 signalling axis in the control of human prostate carcinoma cell adhesion. *Oncogene.* 2008;27(20):2823-32.
- 117 X. Li, L. Hua, F. Deng, X. Bai, W. Zeng, D. Lu, Y. Su and S. Luo. NF-kappaB and Hsp70 are involved in the phospholipase Cgamma1 signaling pathway in colorectal cancer cells. *Life Sci.* 2005;77(22):2794-803.

- 118 R. J. Smith, L. M. Sam, J. M. Justen, G. L. Bundy, G. A. Bala and J. E. Bleasdale. Receptor-coupled signal transduction in human polymorphonuclear neutrophils: effects of a novel inhibitor of phospholipase C-dependent processes on cell responsiveness. *J Pharmacol Exp Ther.* 1990;253(2):688-97.
- 119 S. M. Thomas, F. M. Coppelli, A. Wells, W. E. Gooding, J. Song, J. Kassis, S. D. Drenning and J. R. Grandis. Epidermal growth factor receptor-stimulated activation of phospholipase C γ -1 promotes invasion of head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer Res.* 2003;63(17):5629-35.
- 120 A. K. Thompson, S. P. Mostafapour, L. C. Denlinger, J. E. Bleasdale and S. K. Fisher. The aminosteroid U-73122 inhibits muscarinic receptor sequestration and phosphoinositide hydrolysis in SK-N-SH neuroblastoma cells. A role for G β in receptor compartmentation. *J Biol Chem.* 1991;266(35):23856-62.
- 121 A. B. Jaffe and A. Hall. Rho GTPases: biochemistry and biology. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 2005;21(247-69).
- 122 F. M. Vega and A. J. Ridley. Rho GTPases in cancer cell biology. *FEBS Lett.* 2008;582(14):2093-101.
- 123 S. J. Heasman and A. J. Ridley. Mammalian Rho GTPases: new insights into their functions from in vivo studies. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2008;9(9):690-701.
- 124 V. L. Tybulewicz and R. B. Henderson. Rho family GTPases and their regulators in lymphocytes. *Nat Rev Immunol.* 2009;9(9):630-44.
- 125 S. Etienne-Manneville and A. Hall. Rho GTPases in cell biology. *Nature.* 2002;420(6916):629-35.
- 126 D. J. Mackay and A. Hall. Rho GTPases. *J Biol Chem.* 1998;273(33):20685-8.
- 127 V. L. Tybulewicz. Vav-family proteins in T-cell signalling. *Curr Opin Immunol.* 2005;17(3):267-74.
- 128 P. S. Costello, A. E. Walters, P. J. Mee, M. Turner, L. F. Reynolds, A. Prisco, N. Sarner, R. Zamoyska and V. L. Tybulewicz. The Rho-family GTP exchange factor Vav is a critical transducer of T cell receptor signals to the calcium, ERK, and NF-kappaB pathways. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999;96(6):3035-40.
- 129 L. F. Reynolds, C. de Bettignies, T. Norton, A. Beeser, J. Chernoff and V. L. Tybulewicz. Vav1 transduces T cell receptor signals to the activation of the Ras/ERK pathway via LAT, Sos, and RasGRP1. *J Biol Chem.* 2004;279(18):18239-46.

- 130 L. F. Reynolds, L. A. Smyth, T. Norton, N. Freshney, J. Downward, D. Kioussis and V. L. Tybulewicz. Vav1 transduces T cell receptor signals to the activation of phospholipase C-gamma1 via phosphoinositide 3-kinase-dependent and -independent pathways. *J Exp Med.* 2002;195(9):1103-14.
- 131 L. J. Holsinger, I. A. Graef, W. Swat, T. Chi, D. M. Bautista, L. Davidson, R. S. Lewis, F. W. Alt and G. R. Crabtree. Defects in actin-cap formation in Vav-deficient mice implicate an actin requirement for lymphocyte signal transduction. *Curr Biol.* 1998;8(10):563-72.
- 132 C. Krawczyk, A. Oliveira-dos-Santos, T. Sasaki, E. Griffiths, P. S. Ohashi, S. Snapper, F. Alt and J. M. Penninger. Vav1 controls integrin clustering and MHC/peptide-specific cell adhesion to antigen-presenting cells. *Immunity.* 2002;16(3):331-43.
- 133 C. Wulfig, A. Bauch, G. R. Crabtree and M. M. Davis. The vav exchange factor is an essential regulator in actin-dependent receptor translocation to the lymphocyte-antigen-presenting cell interface. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000;97(18):10150-5.
- 134 L. Ardouin, M. Bracke, A. Mathiot, S. N. Pagakis, T. Norton, N. Hogg and V. L. Tybulewicz. Vav1 transduces TCR signals required for LFA-1 function and cell polarization at the immunological synapse. *Eur J Immunol.* 2003;33(3):790-7.
- 135 F. Abate, A. C. da Silva-Almeida, S. Zairis, J. Robles-Valero, L. Couronne, H. Khiabani, S. A. Quinn, M. Y. Kim, M. A. Laginestra, C. Kim, D. Fiore, G. Bhagat, M. A. Piris, E. Campo, I. S. Lossos, O. A. Bernard, G. Inghirami, S. Pileri, X. R. Bustelo, R. Rabadan, A. A. Ferrando and T. Palomero. Activating mutations and translocations in the guanine exchange factor VAV1 in peripheral T-cell lymphomas. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2017;114(4):764-9.
- 136 D. W. Shen, L. M. Pouliot, J. P. Gillet, W. Ma, A. C. Johnson, M. D. Hall and M. M. Gottesman. The transcription factor GCF2 is an upstream repressor of the small GTPase RhoA, regulating membrane protein trafficking, sensitivity to doxorubicin, and resistance to cisplatin. *Mol Pharm.* 2012;9(6):1822-33.
- 137 F. Valderrama, J. V. Cordeiro, S. Schleich, F. Frischknecht and M. Way. Vaccinia virus-induced cell motility requires F11L-mediated inhibition of RhoA signaling. *Science.* 2006;311(5759):377-81.

- 138 S. Zhang, X. Zhou, R. A. Lang and F. Guo. RhoA of the Rho family small GTPases is essential for B lymphocyte development. *PLoS One*. 2012;7(3):e33773.
- 139 M. Machacek, L. Hodgson, C. Welch, H. Elliott, O. Pertz, P. Nalbant, A. Abell, G. L. Johnson, K. M. Hahn and G. Danuser. Coordination of Rho GTPase activities during cell protrusion. *Nature*. 2009;461(7260):99-103.
- 140 A. Hirai, S. Nakamura, Y. Noguchi, T. Yasuda, M. Kitagawa, I. Tatsuno, T. Oeda, K. Tahara, T. Terano, S. Narumiya, L. D. Kohn and Y. Saito. Geranylgeranylated rho small GTPase(s) are essential for the degradation of p27Kip1 and facilitate the progression from G1 to S phase in growth-stimulated rat FRTL-5 cells. *J Biol Chem*. 1997;272(1):13-6.
- 141 R. Komuro, T. Sasaki, K. Takaishi, S. Orita and Y. Takai. Involvement of Rho and Rac small G proteins and Rho GDI in Ca²⁺-dependent exocytosis from PC12 cells. *Genes Cells*. 1996;1(10):943-51.
- 142 C. Lamaze, T. H. Chuang, L. J. Terlecky, G. M. Bokoch and S. L. Schmid. Regulation of receptor-mediated endocytosis by Rho and Rac. *Nature*. 1996;382(6587):177-9.
- 143 R. Karlsson, E. D. Pedersen, Z. Wang and C. Brakebusch. Rho GTPase function in tumorigenesis. *Biochim Biophys Acta*. 2009;1796(2):91-8.
- 144 S. Narumiya, M. Tanji and T. Ishizaki. Rho signaling, ROCK and mDia1, in transformation, metastasis and invasion. *Cancer Metastasis Rev*. 2009;28(1-2):65-76.
- 145 G. Fritz, I. Just and B. Kaina. Rho GTPases are over-expressed in human tumors. *Int J Cancer*. 1999;81(5):682-7.
- 146 K. Ariake, H. Ohtsuka, F. Motoi, D. Douchi, M. Oikawa, T. Rikiyama, K. Fukase, Y. Katayose, S. Egawa and M. Unno. GCF2/LRRFIP1 promotes colorectal cancer metastasis and liver invasion through integrin-dependent RhoA activation. *Cancer Lett*. 2012;325(1):99-107.
- 147 D. M. Gilkes, L. Xiang, S. J. Lee, P. Chaturvedi, M. E. Hubbi, D. Wirtz and G. L. Semenza. Hypoxia-inducible factors mediate coordinated RhoA-ROCK1 expression and signaling in breast cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2014;111(3):E384-93.
- 148 T. Hu, H. Guo, W. Wang, S. Yu, L. Han, L. Jiang, J. Ma, C. Yang, Q. Guo and K. Nan. Loss of p57 expression and RhoA overexpression are associated with poor survival of patients with hepatocellular carcinoma. *Oncol Rep*. 2013;30(4):1707-14.

- 149 P. R. Molli, M. B. Pradhan, S. H. Advani and N. R. Naik. RhoA: a therapeutic target for chronic myeloid leukemia. *Mol Cancer*. 2012;11(16).
- 150 D. Zhang, J. Y. Zhang, S. D. Dai, S. L. Liu, Y. Liu, N. Tang and E. H. Wang. Co-expression of delta-catenin and RhoA is significantly associated with a malignant lung cancer phenotype. *Int J Clin Exp Pathol*. 2014;7(7):3724-32.
- 151 S. L. Ondrejka, B. Grzywacz, J. Bodo, H. Makishima, C. Polprasert, J. W. Said, B. Przychodzen, J. P. Maciejewski and E. D. Hsi. Angioimmunoblastic T-cell Lymphomas With the RHOA p.Gly17Val Mutation Have Classic Clinical and Pathologic Features. *Am J Surg Pathol*. 2016;40(3):335-41.
- 152 S. Chiba, T. Enami, S. Ogawa and M. Sakata-Yanagimoto. G17V RHOA: Genetic evidence of GTP-unbound RHOA playing a role in tumorigenesis in T cells. *Small GTPases*. 2015;6(2):100-3.
- 153 M. Kakiuchi, T. Nishizawa, H. Ueda, K. Gotoh, A. Tanaka, A. Hayashi, S. Yamamoto, K. Tatsuno, H. Katoh, Y. Watanabe, T. Ichimura, T. Ushiku, S. Funahashi, K. Tateishi, I. Wada, N. Shimizu, S. Nomura, K. Koike, Y. Seto, M. Fukayama, H. Aburatani and S. Ishikawa. Recurrent gain-of-function mutations of RHOA in diffuse-type gastric carcinoma. *Nat Genet*. 2014;46(6):583-7.
- 154 M. S. Lawrence, P. Stojanov, C. H. Mermel, J. T. Robinson, L. A. Garraway, T. R. Golub, M. Meyerson, S. B. Gabriel, E. S. Lander and G. Getz. Discovery and saturation analysis of cancer genes across 21 tumour types. *Nature*. 2014;505(7484):495-501.
- 155 M. Rohde, J. Richter, M. Schlesner, M. J. Betts, A. Claviez, B. R. Bonn, M. Zimmermann, C. Damm-Welk, R. B. Russell, A. Borkhardt, R. Eils, J. I. Hoell, M. Szczepanowski, I. Oschlies, W. Klapper, B. Burkhardt and R. Siebert. Recurrent RHOA mutations in pediatric Burkitt lymphoma treated according to the NHL-BFM protocols. *Genes Chromosomes Cancer*. 2014;53(11):911-6.
- 156 S. C. Sun. Non-canonical NF-kappaB signaling pathway. *Cell Res*. 2011;21(1):71-85.
- 157 S. Vallabhapurapu and M. Karin. Regulation and function of NF-kappaB transcription factors in the immune system. *Annu Rev Immunol*. 2009;27(693-733).
- 158 M. Karin and Y. Ben-Neriah. Phosphorylation meets ubiquitination: the control of NF-[kappa]B activity. *Annu Rev Immunol*. 2000;18(621-63).

- 159 S. Gerondakis, N. Morrice, I. B. Richardson, R. Wettenhall, J. Fecondo and R. J. Grumont. The activity of a 70 kilodalton I kappa B molecule identical to the carboxyl terminus of the p105 NF-kappa B precursor is modulated by protein kinase A. *Cell Growth Differ.* 1993;4(8):617-27.
- 160 M. S. Hayden and S. Ghosh. Shared principles in NF-kappaB signaling. *Cell.* 2008;132(3):344-62.
- 161 M. S. Hayden and S. Ghosh. NF-kappaB, the first quarter-century: remarkable progress and outstanding questions. *Genes Dev.* 2012;26(3):203-34.
- 162 L. A. O'Neill. How Toll-like receptors signal: what we know and what we don't know. *Curr Opin Immunol.* 2006;18(1):3-9.
- 163 P. G. Atkinson, H. J. Coope, M. Rowe and S. C. Ley. Latent membrane protein 1 of Epstein-Barr virus stimulates processing of NF-kappa B2 p100 to p52. *J Biol Chem.* 2003;278(51):51134-42.
- 164 E. D. Cahir McFarland, K. M. Izumi and G. Mosialos. Epstein-barr virus transformation: involvement of latent membrane protein 1-mediated activation of NF-kappaB. *Oncogene.* 1999;18(49):6959-64.
- 165 S. Montes-Moreno, L. Odqvist, J. A. Diaz-Perez, A. B. Lopez, S. G. de Villambrosia, F. Mazorra, M. E. Castillo, M. Lopez, R. Pajares, J. F. Garcia, M. Mollejo, F. I. Camacho, C. Ruiz-Marcellan, M. Adrados, N. Ortiz, R. Franco, C. Ortiz-Hidalgo, A. Suarez-Gauthier, K. H. Young and M. A. Piris. EBV-positive diffuse large B-cell lymphoma of the elderly is an aggressive post-germinal center B-cell neoplasm characterized by prominent nuclear factor-kB activation. *Mod Pathol.* 2012;25(7):968-82.
- 166 V. Baud and M. Karin. Is NF-kappaB a good target for cancer therapy? Hopes and pitfalls. *Nat Rev Drug Discov.* 2009;8(1):33-40.
- 167 D. C. Guttridge, C. Albanese, J. Y. Reuther, R. G. Pestell and A. S. Baldwin, Jr. NF-kappaB controls cell growth and differentiation through transcriptional regulation of cyclin D1. *Mol Cell Biol.* 1999;19(8):5785-99.
- 168 P. J. Jost and J. Ruland. Aberrant NF-kappaB signaling in lymphoma: mechanisms, consequences, and therapeutic implications. *Blood.* 2007;109(7):2700-7.
- 169 T. Mukhopadhyay, J. A. Roth and S. A. Maxwell. Altered expression of the p50 subunit of the NF-kappa B transcription factor complex in non-small cell lung carcinoma. *Oncogene.* 1995;11(5):999-1003.

- 170 C. Baer, C. C. Oakes, A. S. Ruppert, R. Claus, S. Z. Kim-Wanner, D. Mertens, T. Zenz, S. Stilgenbauer, J. C. Byrd and C. Plass. Epigenetic silencing of miR-708 enhances NF-kappaB signaling in chronic lymphocytic leukemia. *Int J Cancer*. 2015;137(6):1352-61.
- 171 J. Houldsworth, S. Mathew, P. H. Rao, K. Dyomina, D. C. Louie, N. Parsa, K. Offit and R. S. Chaganti. REL proto-oncogene is frequently amplified in extranodal diffuse large cell lymphoma. *Blood*. 1996;87(1):25-9.
- 172 Y. Ma, Z. Liao, Y. Xu, Z. Zhong, X. Wang, F. Zhang, S. Chen, L. Yang, G. Luo, X. Huang, S. Huang, X. Wu and Y. Li. Characteristics of CARMA1-BCL10-MALT1-A20-NF-kappaB expression in T cell-acute lymphocytic leukemia. *Eur J Med Res*. 2014;19(62).
- 173 L. Mansouri, L. A. Sutton, V. Ljungstrom, S. Bondza, L. Arngarden, S. Bhoi, J. Larsson, D. Cortese, A. Kalushkova, K. Plevova, E. Young, R. Gunnarsson, E. Falk-Sorqvist, P. Lonn, A. F. Muggen, X. J. Yan, B. Sander, G. Enblad, K. E. Smedby, G. Juliusson, C. Belessi, J. Rung, N. Chiorazzi, J. C. Strefford, A. W. Langerak, S. Pospisilova, F. Davi, M. Hellstrom, H. Jernberg-Wiklund, P. Ghia, O. Soderberg, K. Stamatopoulos, M. Nilsson and R. Rosenquist. Functional loss of IkappaBepsilon leads to NF-kappaB deregulation in aggressive chronic lymphocytic leukemia. *J Exp Med*. 2015;212(6):833-43.
- 174 D. Trecca, L. Guerrini, N. S. Fracchiolla, M. Pomati, L. Baldini, A. T. Maiolo and A. Neri. Identification of a tumor-associated mutant form of the NF-kappaB RelA gene with reduced DNA-binding and transactivating activities. *Oncogene*. 1997;14(7):791-9.
- 175 G. Lenz, R. E. Davis, V. N. Ngo, L. Lam, T. C. George, G. W. Wright, S. S. Dave, H. Zhao, W. Xu, A. Rosenwald, G. Ott, H. K. Muller-Hermelink, R. D. Gascoyne, J. M. Connors, L. M. Rimsza, E. Campo, E. S. Jaffe, J. Delabie, E. B. Smeland, R. I. Fisher, W. C. Chan and L. M. Staudt. Oncogenic CARD11 mutations in human diffuse large B cell lymphoma. *Science*. 2008;319(5870):1676-9.
- 176 F. C. Braun, P. Grabarczyk, M. Mobs, F. K. Braun, J. Eberle, M. Beyer, W. Sterry, F. Busse, J. Schroder, M. Delin, G. K. Przybylski and C. A. Schmidt. Tumor suppressor TNFAIP3 (A20) is frequently deleted in Sezary syndrome. *Leukemia*. 2011;25(9):1494-501.

- 177 K. Honma, S. Tsuzuki, M. Nakagawa, H. Tagawa, S. Nakamura, Y. Morishima and M. Seto. TNFAIP3/A20 functions as a novel tumor suppressor gene in several subtypes of non-Hodgkin lymphomas. *Blood*. 2009;114(12):2467-75.
- 178 R. Schmitz, M. L. Hansmann, V. Bohle, J. I. Martin-Subero, S. Hartmann, G. Mechtersheimer, W. Klapper, I. Vater, M. Giefing, S. Gesk, J. Stanelle, R. Siebert and R. Kuppers. TNFAIP3 (A20) is a tumor suppressor gene in Hodgkin lymphoma and primary mediastinal B cell lymphoma. *J Exp Med*. 2009;206(5):981-9.
- 179 V. N. Ngo, R. M. Young, R. Schmitz, S. Jhavar, W. Xiao, K. H. Lim, H. Kohlhammer, W. Xu, Y. Yang, H. Zhao, A. L. Shaffer, P. Romesser, G. Wright, J. Powell, A. Rosenwald, H. K. Muller-Hermelink, G. Ott, R. D. Gascoyne, J. M. Connors, L. M. Rimsza, E. Campo, E. S. Jaffe, J. Delabie, E. B. Smeland, R. I. Fisher, R. M. Braziel, R. R. Tubbs, J. R. Cook, D. D. Weisenburger, W. C. Chan and L. M. Staudt. Oncogenically active MYD88 mutations in human lymphoma. *Nature*. 2011;470(7332):115-9.
- 180 J. J. O'Shea. Jaks, STATs, cytokine signal transduction, and immunoregulation: are we there yet? *Immunity*. 1997;7(1):1-11.
- 181 M. H. Heim. The Jak-STAT pathway: cytokine signalling from the receptor to the nucleus. *J Recept Signal Transduct Res*. 1999;19(1-4):75-120.
- 182 J. E. Darnell, Jr., I. M. Kerr and G. R. Stark. Jak-STAT pathways and transcriptional activation in response to IFNs and other extracellular signaling proteins. *Science*. 1994;264(5164):1415-21.
- 183 M. Chatterjee-Kishore, F. van den Akker and G. R. Stark. Association of STATs with relatives and friends. *Trends Cell Biol*. 2000;10(3):106-11.
- 184 K. D. Liu, S. L. Gaffen and M. A. Goldsmith. JAK/STAT signaling by cytokine receptors. *Curr Opin Immunol*. 1998;10(3):271-8.
- 185 A. Bonni, Y. Sun, M. Nadal-Vicens, A. Bhatt, D. A. Frank, I. Rozovsky, N. Stahl, G. D. Yancopoulos and M. E. Greenberg. Regulation of gliogenesis in the central nervous system by the JAK-STAT signaling pathway. *Science*. 1997;278(5337):477-83.
- 186 P. J. Hauser, D. Agrawal, J. Hackney and W. J. Pledger. STAT3 activation accompanies keratinocyte differentiation. *Cell Growth Differ*. 1998;9(10):847-55.
- 187 A. Kumar, M. Commane, T. W. Flickinger, C. M. Horvath and G. R. Stark. Defective TNF-alpha-induced apoptosis in STAT1-null cells due to low constitutive levels of caspases. *Science*. 1997;278(5343):1630-2.

- 188 E. Chen, L. M. Staudt and A. R. Green. Janus kinase deregulation in leukemia and lymphoma. *Immunity*. 2012;36(4):529-41.
- 189 D. A. Frank, S. Mahajan and J. Ritz. B lymphocytes from patients with chronic lymphocytic leukemia contain signal transducer and activator of transcription (STAT) 1 and STAT3 constitutively phosphorylated on serine residues. *J Clin Invest*. 1997;100(12):3140-8.
- 190 R. Garcia, C. L. Yu, A. Hudnall, R. Catlett, K. L. Nelson, T. Smithgall, D. J. Fujita, S. P. Ethier and R. Jove. Constitutive activation of Stat3 in fibroblasts transformed by diverse oncoproteins and in breast carcinoma cells. *Cell Growth Differ*. 1997;8(12):1267-76.
- 191 E. Margolskee, V. Jobanputra, P. Jain, J. Chen, K. Ganapathi, O. Nahum, B. Levy, J. Morscio, V. Murty, T. Tousseyn, B. Alobeid, M. Mansukhani and G. Bhagat. Genetic landscape of T- and NK-cell post-transplant lymphoproliferative disorders. *Oncotarget*. 2016;7(25):37636-48.
- 192 V. Sriuranpong, J. I. Park, P. Amornphimoltham, V. Patel, B. D. Nelkin and J. S. Gutkind. Epidermal growth factor receptor-independent constitutive activation of STAT3 in head and neck squamous cell carcinoma is mediated by the autocrine/paracrine stimulation of the interleukin 6/gp130 cytokine system. *Cancer Res*. 2003;63(11):2948-56.
- 193 W. Vainchenker and S. N. Constantinescu. JAK/STAT signaling in hematological malignancies. *Oncogene*. 2013;32(21):2601-13.
- 194 D. Bellanger, V. Jacquemin, M. Chopin, G. Pierron, O. A. Bernard, J. Ghysdael and M. H. Stern. Recurrent JAK1 and JAK3 somatic mutations in T-cell prolymphocytic leukemia. *Leukemia*. 2014;28(2):417-9.
- 195 R. Crescenzo, F. Abate, E. Lasorsa, F. Tabbo, M. Gaudiano, N. Chiesa, F. Di Giacomo, E. Spaccarotella, L. Barbarossa, E. Ercole, M. Todaro, M. Boi, A. Acquaviva, E. Ficarra, D. Novero, A. Rinaldi, T. Tousseyn, A. Rosenwald, L. Kenner, L. Cerroni, A. Tzankov, M. Ponzoni, M. Paulli, D. Weisenburger, W. C. Chan, J. Iqbal, M. A. Piris, A. Zamo, C. Ciardullo, D. Rossi, G. Gaidano, S. Pileri, E. Tiacci, B. Falini, L. D. Shultz, L. Mevellec, J. E. Vialard, R. Piva, F. Bertoni, R. Rabadan and G. Inghirami. Convergent mutations and kinase fusions lead to oncogenic STAT3 activation in anaplastic large cell lymphoma. *Cancer Cell*. 2015;27(4):516-32.

- 196 E. Flex, V. Petrangeli, L. Stella, S. Chiaretti, T. Hornakova, L. Knoops, C. Ariola, V. Fodale, E. Clappier, F. Paoloni, S. Martinelli, A. Fragale, M. Sanchez, S. Tavolaro, M. Messina, G. Cazzaniga, A. Camera, G. Pizzolo, A. Tornesello, M. Vignetti, A. Battistini, H. Cave, B. D. Gelb, J. C. Renauld, A. Biondi, S. N. Constantinescu, R. Foa and M. Tartaglia. Somatically acquired JAK1 mutations in adult acute lymphoblastic leukemia. *J Exp Med*. 2008;205(4):751-8.
- 197 A. Jerez, M. J. Clemente, H. Makishima, H. Koskela, F. Leblanc, K. Peng Ng, T. Olson, B. Przychodzen, M. Afable, I. Gomez-Segui, K. Guinta, L. Durkin, E. D. Hsi, K. McGraw, D. Zhang, M. W. Wlodarski, K. Porkka, M. A. Sekeres, A. List, S. Mustjoki, T. P. Loughran and J. P. Maciejewski. STAT3 mutations unify the pathogenesis of chronic lymphoproliferative disorders of NK cells and T-cell large granular lymphocyte leukemia. *Blood*. 2012;120(15):3048-57.
- 198 M. J. Kiel, A. A. Sahasrabudde, D. C. Rolland, T. Velusamy, F. Chung, M. Schaller, N. G. Bailey, B. L. Betz, R. N. Miranda, P. Porcu, J. C. Byrd, L. J. Medeiros, S. L. Kunkel, D. W. Bahler, M. S. Lim and K. S. Elenitoba-Johnson. Genomic analyses reveal recurrent mutations in epigenetic modifiers and the JAK-STAT pathway in Sezary syndrome. *Nat Commun*. 2015;6(8470).
- 199 G. C. Koo, S. Y. Tan, T. Tang, S. L. Poon, G. E. Allen, L. Tan, S. C. Chong, W. S. Ong, K. Tay, M. Tao, R. Quek, S. Loong, K. W. Yeoh, S. P. Yap, K. A. Lee, L. C. Lim, D. Tan, C. Goh, I. Cutcutache, W. Yu, C. C. Ng, V. Rajasegaran, H. L. Heng, A. Gan, C. K. Ong, S. Rozen, P. Tan, B. T. Teh and S. T. Lim. Janus kinase 3-activating mutations identified in natural killer/T-cell lymphoma. *Cancer Discov*. 2012;2(7):591-7.
- 200 H. L. Koskela, S. Eldfors, P. Ellonen, A. J. van Adrichem, H. Kuusanmaki, E. I. Andersson, S. Lagstrom, M. J. Clemente, T. Olson, S. E. Jalkanen, M. M. Majumder, H. Almusa, H. Edgren, M. Lepisto, P. Mattila, K. Guinta, P. Koistinen, T. Kuittinen, K. Penttinen, A. Parsons, J. Knowles, J. Saarela, K. Wennerberg, O. Kallioniemi, K. Porkka, T. P. Loughran, Jr., C. A. Heckman, J. P. Maciejewski and S. Mustjoki. Somatic STAT3 mutations in large granular lymphocytic leukemia. *N Engl J Med*. 2012;366(20):1905-13.
- 201 C. Kucuk, B. Jiang, X. Hu, W. Zhang, J. K. Chan, W. Xiao, N. Lack, C. Alkan, J. C. Williams, K. N. Avery, P. Kavak, A. Scuto, E. Sen, P. Gaulard, L. Staudt, J. Iqbal, A. Cornish, Q. Gong, Q. Yang, H. Sun, F. d'Amore, S. Leppa, W. Liu, K. Fu, L. de

- Leval, T. McKeithan and W. C. Chan. Activating mutations of STAT5B and STAT3 in lymphomas derived from gammadelta-T or NK cells. *Nat Commun.* 2015;6(6025).
- 202 A. Nicolae, L. Xi, S. Pittaluga, Z. Abdullaev, S. D. Pack, J. Chen, T. A. Waldmann, E. S. Jaffe and M. Raffeld. Frequent STAT5B mutations in gammadelta hepatosplenic T-cell lymphomas. *Leukemia.* 2014;28(11):2244-8.
- 203 C. Perez, J. Gonzalez-Rincon, A. Onaindia, C. Almaraz, N. Garcia-Diaz, H. Pisonero, S. Curiel-Olmo, S. Gomez, L. Cereceda, R. Madureira, M. Hospital, D. Suarez-Massa, J. L. Rodriguez-Peralto, C. Postigo, A. Leon-Castillo, C. Gonzalez-Vela, N. Martinez, P. Ortiz-Romero, M. Sanchez-Beato, M. A. Piris and J. P. Vaque. Mutated JAK kinases and deregulated STAT activity are potential therapeutic targets in cutaneous T-cell lymphoma. *Haematologica.* 2015;100(11):e450-3.
- 204 R. A. Kirken, R. A. Erwin, D. Taub, W. J. Murphy, F. Behbod, L. Wang, F. Pericle and W. L. Farrar. Tyrphostin AG-490 inhibits cytokine-mediated JAK3/STAT5a/b signal transduction and cellular proliferation of antigen-activated human T cells. *J Leukoc Biol.* 1999;65(6):891-9.
- 205 B. J. Bain and S. Ahmad. Should myeloid and lymphoid neoplasms with PCM1-JAK2 and other rearrangements of JAK2 be recognized as specific entities? *Br J Haematol.* 2014;166(6):809-17.
- 206 C. Harrison, J. J. Kiladjian, H. K. Al-Ali, H. Gisslinger, R. Waltzman, V. Stalbovskaya, M. McQuitty, D. S. Hunter, R. Levy, L. Knoops, F. Cervantes, A. M. Vannucchi, T. Barbui and G. Barosi. JAK inhibition with ruxolitinib versus best available therapy for myelofibrosis. *N Engl J Med.* 2012;366(9):787-98.
- 207 A. Younes, J. Romaguera, M. Fanale, P. McLaughlin, F. Hagemeister, A. Copeland, S. Neelapu, L. Kwak, J. Shah, S. de Castro Faria, S. Hart, J. Wood, R. Jayaraman, K. Ethirajulu and J. Zhu. Phase I study of a novel oral Janus kinase 2 inhibitor, SB1518, in patients with relapsed lymphoma: evidence of clinical and biologic activity in multiple lymphoma subtypes. *J Clin Oncol.* 2012;30(33):4161-7.
- 208 X. Zhang, M. A. Blaskovich, K. D. Forinash and S. M. Sebt. Withacnistin inhibits recruitment of STAT3 and STAT5 to growth factor and cytokine receptors and induces regression of breast tumours. *Br J Cancer.* 2014;111(5):894-902.
- 209 S. Alas and B. Bonavida. Rituximab inactivates signal transducer and activation of transcription 3 (STAT3) activity in B-non-Hodgkin's lymphoma through inhibition of

the interleukin 10 autocrine/paracrine loop and results in down-regulation of Bcl-2 and sensitization to cytotoxic drugs. *Cancer Res.* 2001;61(13):5137-44.

210 S. B. Baylin and P. A. Jones. A decade of exploring the cancer epigenome - biological and translational implications. *Nat Rev Cancer.* 2011;11(10):726-34.

211 S. Ito, A. C. D'Alessio, O. V. Taranova, K. Hong, L. C. Sowers and Y. Zhang. Role of Tet proteins in 5mC to 5hmC conversion, ES-cell self-renewal and inner cell mass specification. *Nature.* 2010;466(7310):1129-33.

212 K. P. Koh, A. Yabuuchi, S. Rao, Y. Huang, K. Cunniff, J. Nardone, A. Laiho, M. Tahiliani, C. A. Sommer, G. Mostoslavsky, R. Lahesmaa, S. H. Orkin, S. J. Rodig, G. Q. Daley and A. Rao. Tet1 and Tet2 regulate 5-hydroxymethylcytosine production and cell lineage specification in mouse embryonic stem cells. *Cell Stem Cell.* 2011;8(2):200-13.

213 M. Tahiliani, K. P. Koh, Y. Shen, W. A. Pastor, H. Bandukwala, Y. Brudno, S. Agarwal, L. M. Iyer, D. R. Liu, L. Aravind and A. Rao. Conversion of 5-methylcytosine to 5-hydroxymethylcytosine in mammalian DNA by MLL partner TET1. *Science.* 2009;324(5929):930-5.

214 M. Ko, J. An, H. S. Bandukwala, L. Chavez, T. Aijo, W. A. Pastor, M. F. Segal, H. Li, K. P. Koh, H. Lahdesmaki, P. G. Hogan, L. Aravind and A. Rao. Modulation of TET2 expression and 5-methylcytosine oxidation by the CXXC domain protein IDAX. *Nature.* 2013;497(7447):122-6.

215 Q. Li, K. M. Haigis, A. McDaniel, E. Harding-Theobald, S. C. Kogan, K. Akagi, J. C. Wong, B. S. Braun, L. Wolff, T. Jacks and K. Shannon. Hematopoiesis and leukemogenesis in mice expressing oncogenic NrasG12D from the endogenous locus. *Blood.* 2011;117(6):2022-32.

216 K. Moran-Crusio, L. Reavie, A. Shih, O. Abdel-Wahab, D. Ndiaye-Lobry, C. Lobry, M. E. Figueroa, A. Vasanthakumar, J. Patel, X. Zhao, F. Perna, S. Pandey, J. Madzo, C. Song, Q. Dai, C. He, S. Ibrahim, M. Beran, J. Zavadil, S. D. Nimer, A. Melnick, L. A. Godley, I. Aifantis and R. L. Levine. Tet2 loss leads to increased hematopoietic stem cell self-renewal and myeloid transformation. *Cancer Cell.* 2011;20(1):11-24.

217 C. Quivoron, L. Couronne, V. Della Valle, C. K. Lopez, I. Plo, O. Wagner-Ballon, M. Do Cruzeiro, F. Delhommeau, B. Arnulf, M. H. Stern, L. Godley, P. Opolon, H. Tilly, E. Solary, Y. Duffourd, P. Dessen, H. Merle-Beral, F. Nguyen-Khac, M.

Fontenay, W. Vainchenker, C. Bastard, T. Mercher and O. A. Bernard. TET2 inactivation results in pleiotropic hematopoietic abnormalities in mouse and is a recurrent event during human lymphomagenesis. *Cancer Cell*. 2011;20(1):25-38.

218 R. Bejar, A. Lord, K. Stevenson, M. Bar-Natan, A. Perez-Ladaga, J. Zaneveld, H. Wang, B. Caughey, P. Stojanov, G. Getz, G. Garcia-Manero, H. Kantarjian, R. Chen, R. M. Stone, D. Neuberg, D. P. Steensma and B. L. Ebert. TET2 mutations predict response to hypomethylating agents in myelodysplastic syndrome patients. *Blood*. 2014;124(17):2705-12.

219 O. Abdel-Wahab, A. Mullally, C. Hedvat, G. Garcia-Manero, J. Patel, M. Wadleigh, S. Malinger, J. Yao, O. Kilpivaara, R. Bhat, K. Huberman, S. Thomas, I. Dolgalev, A. Heguy, E. Paietta, M. M. Le Beau, M. Beran, M. S. Tallman, B. L. Ebert, H. M. Kantarjian, R. M. Stone, D. G. Gilliland, J. D. Crispino and R. L. Levine. Genetic characterization of TET1, TET2, and TET3 alterations in myeloid malignancies. *Blood*. 2009;114(1):144-7.

220 F. Asmar, V. Punj, J. Christensen, M. T. Pedersen, A. Pedersen, A. B. Nielsen, C. Hother, U. Ralfkiaer, P. Brown, E. Ralfkiaer, K. Helin and K. Gronbaek. Genome-wide profiling identifies a DNA methylation signature that associates with TET2 mutations in diffuse large B-cell lymphoma. *Haematologica*. 2013;98(12):1912-20.

221 F. Delhommeau, S. Dupont, V. Della Valle, C. James, S. Trannoy, A. Masse, O. Kosmider, J. P. Le Couedic, F. Robert, A. Alberdi, Y. Lecluse, I. Plo, F. J. Dreyfus, C. Marzac, N. Casadevall, C. Lacombe, S. P. Romana, P. Dessen, J. Soulier, F. Viguié, M. Fontenay, W. Vainchenker and O. A. Bernard. Mutation in TET2 in myeloid cancers. *N Engl J Med*. 2009;360(22):2289-301.

222 H. Makishima, A. M. Jankowska, M. A. McDevitt, C. O'Keefe, S. Dujardin, H. Cazzolli, B. Przychodzen, C. Prince, J. Nicoll, H. Siddaiah, M. Shaik, H. Szpurka, E. Hsi, A. Advani, R. Paquette and J. P. Maciejewski. CBL, CBLB, TET2, ASXL1, and IDH1/2 mutations and additional chromosomal aberrations constitute molecular events in chronic myelogenous leukemia. *Blood*. 2011;117(21):e198-206.

223 C. Roche-Lestienne, A. Marceau, E. Labis, O. Nibourel, V. Coiteux, J. Guilhot, L. Legros, F. Nicolini, P. Rousselot, M. Gardembas, N. Helevaut, C. Frimat, F. X. Mahon, F. Guilhot and C. Preudhomme. Mutation analysis of TET2, IDH1, IDH2 and ASXL1 in chronic myeloid leukemia. *Leukemia*. 2011;25(10):1661-4.

- 224 A. Tefferi, K. H. Lim and R. Levine. Mutation in TET2 in myeloid cancers. *N Engl J Med.* 2009;361(11):1117; author reply -8.
- 225 H. Nakajima and H. Kunimoto. TET2 as an epigenetic master regulator for normal and malignant hematopoiesis. *Cancer Sci.* 2014;105(9):1093-9.
- 226 T. J. Ley, L. Ding, M. J. Walter, M. D. McLellan, T. Lamprecht, D. E. Larson, C. Kandoth, J. E. Payton, J. Baty, J. Welch, C. C. Harris, C. F. Lichti, R. R. Townsend, R. S. Fulton, D. J. Dooling, D. C. Koboldt, H. Schmidt, Q. Zhang, J. R. Osborne, L. Lin, M. O'Laughlin, J. F. McMichael, K. D. Delehaunty, S. D. McGrath, L. A. Fulton, V. J. Magrini, T. L. Vickery, J. Hundal, L. L. Cook, J. J. Conyers, G. W. Swift, J. P. Reed, P. A. Alldredge, T. Wylie, J. Walker, J. Kalicki, M. A. Watson, S. Heath, W. D. Shannon, N. Varghese, R. Nagarajan, P. Westervelt, M. H. Tomasson, D. C. Link, T. A. Graubert, J. F. DiPersio, E. R. Mardis and R. K. Wilson. DNMT3A mutations in acute myeloid leukemia. *N Engl J Med.* 2010;363(25):2424-33.
- 227 T. Chen and E. Li. Establishment and maintenance of DNA methylation patterns in mammals. *Curr Top Microbiol Immunol.* 2006;301(179-201).
- 228 L. Yang, R. Rau and M. A. Goodell. DNMT3A in haematological malignancies. *Nat Rev Cancer.* 2015;15(3):152-65.
- 229 Q. Gao, E. J. Steine, M. I. Barrasa, D. Hockemeyer, M. Pawlak, D. Fu, S. Reddy, G. W. Bell and R. Jaenisch. Deletion of the de novo DNA methyltransferase Dnmt3a promotes lung tumor progression. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2011;108(44):18061-6.
- 230 G. L. Gravina, G. Ranieri, P. Muzi, F. Marampon, A. Mancini, B. Di Pasquale, L. Di Clemente, V. Dolo, A. M. D'Alessandro and C. Festuccia. Increased levels of DNA methyltransferases are associated with the tumorigenic capacity of prostate cancer cells. *Oncol Rep.* 2013;29(3):1189-95.
- 231 B. K. Oh, H. Kim, H. J. Park, Y. H. Shim, J. Choi, C. Park and Y. N. Park. DNA methyltransferase expression and DNA methylation in human hepatocellular carcinoma and their clinicopathological correlation. *Int J Mol Med.* 2007;20(1):65-73.
- 232 J. Yang, X. Wei, Q. Wu, Z. Xu, D. Gu, Y. Jin, Y. Shen, H. Huang, H. Fan and J. Chen. Clinical significance of the expression of DNA methyltransferase proteins in gastric cancer. *Mol Med Rep.* 2011;4(6):1139-43.
- 233 J. J. Zhang, Y. Zhu, J. L. Wu, W. B. Liang, R. Zhu, Z. K. Xu, Q. Du and Y. Miao. Association of increased DNA methyltransferase expression with carcinogenesis

- and poor prognosis in pancreatic ductal adenocarcinoma. *Clin Transl Oncol*. 2012;14(2):116-24.
- 234 S. Mizuno, T. Chijiwa, T. Okamura, K. Akashi, Y. Fukumaki, Y. Niho and H. Sasaki. Expression of DNA methyltransferases DNMT1, 3A, and 3B in normal hematopoiesis and in acute and chronic myelogenous leukemia. *Blood*. 2001;97(5):1172-9.
- 235 V. Grossmann, C. Haferlach, S. Weissmann, A. Roller, S. Schindela, F. Poetzinger, K. Stadler, F. Bellos, W. Kern, T. Haferlach, S. Schnittger and A. Kohlmann. The molecular profile of adult T-cell acute lymphoblastic leukemia: mutations in RUNX1 and DNMT3A are associated with poor prognosis in T-ALL. *Genes Chromosomes Cancer*. 2013;52(4):410-22.
- 236 H. A. Hou, Y. Y. Kuo, C. Y. Liu, W. C. Chou, M. C. Lee, C. Y. Chen, L. I. Lin, M. H. Tseng, C. F. Huang, Y. C. Chiang, F. Y. Lee, M. C. Liu, C. W. Liu, J. L. Tang, M. Yao, S. Y. Huang, B. S. Ko, S. C. Hsu, S. J. Wu, W. Tsay, Y. C. Chen and H. F. Tien. DNMT3A mutations in acute myeloid leukemia: stability during disease evolution and clinical implications. *Blood*. 2012;119(2):559-68.
- 237 M. Y. Shah and J. D. Licht. DNMT3A mutations in acute myeloid leukemia. *Nat Genet*. 2011;43(4):289-90.
- 238 F. Thol, M. Heuser, F. Damm, J. H. Klusmann, K. Reinhardt and D. Reinhardt. DNMT3A mutations are rare in childhood acute myeloid leukemia. *Haematologica*. 2011;96(8):1238-40.
- 239 M. J. Walter, L. Ding, D. Shen, J. Shao, M. Grillot, M. McLellan, R. Fulton, H. Schmidt, J. Kalicki-Veizer, M. O'Laughlin, C. Kandoth, J. Baty, P. Westervelt, J. F. DiPersio, E. R. Mardis, R. K. Wilson, T. J. Ley and T. A. Graubert. Recurrent DNMT3A mutations in patients with myelodysplastic syndromes. *Leukemia*. 2011;25(7):1153-8.
- 240 C. Wang, T. W. McKeithan, Q. Gong, W. Zhang, A. Bouska, A. Rosenwald, R. D. Gascoyne, X. Wu, J. Wang, Z. Muhammad, B. Jiang, J. Rohr, A. Cannon, C. Steidl, K. Fu, Y. Li, S. Hung, D. D. Weisenburger, T. C. Greiner, L. Smith, G. Ott, E. G. Rogan, L. M. Staudt, J. Vose, J. Iqbal and W. C. Chan. IDH2R172 mutations define a unique subgroup of patients with angioimmunoblastic T-cell lymphoma. *Blood*. 2015;126(15):1741-52.

- 241 D. Robbins, J. A. Wittwer, S. Codarin, M. L. Circu, T. Y. Aw, T. T. Huang, H. Van Remmen, A. Richardson, D. B. Wang, S. N. Witt, R. L. Klein and Y. Zhao. Isocitrate dehydrogenase 1 is downregulated during early skin tumorigenesis which can be inhibited by overexpression of manganese superoxide dismutase. *Cancer Sci.* 2012;103(8):1429-33.
- 242 Q. Lv, S. Xing, Z. Li, J. Li, P. Gong, X. Xu, L. Chang, X. Jin, F. Gao, W. Li, G. Zhang, J. Yang and X. Zhang. Altered expression levels of IDH2 are involved in the development of colon cancer. *Exp Ther Med.* 2012;4(5):801-6.
- 243 J. Balss, J. Meyer, W. Mueller, A. Korshunov, C. Hartmann and A. von Deimling. Analysis of the IDH1 codon 132 mutation in brain tumors. *Acta Neuropathol.* 2008;116(6):597-602.
- 244 A. F. Ghiam, R. A. Cairns, J. Thoms, A. Dal Pra, O. Ahmed, A. Meng, T. W. Mak and R. G. Bristow. IDH mutation status in prostate cancer. *Oncogene.* 2012;31(33):3826.
- 245 E. R. Mardis, L. Ding, D. J. Dooling, D. E. Larson, M. D. McLellan, K. Chen, D. C. Koboldt, R. S. Fulton, K. D. Delehaunty, S. D. McGrath, L. A. Fulton, D. P. Locke, V. J. Magrini, R. M. Abbott, T. L. Vickery, J. S. Reed, J. S. Robinson, T. Wylie, S. M. Smith, L. Carmichael, J. M. Eldred, C. C. Harris, J. Walker, J. B. Peck, F. Du, A. F. Dukes, G. E. Sanderson, A. M. Brummett, E. Clark, J. F. McMichael, R. J. Meyer, J. K. Schindler, C. S. Pohl, J. W. Wallis, X. Shi, L. Lin, H. Schmidt, Y. Tang, C. Haipek, M. E. Wiechert, J. V. Ivy, J. Kalicki, G. Elliott, R. E. Ries, J. E. Payton, P. Westervelt, M. H. Tomasson, M. A. Watson, J. Baty, S. Heath, W. D. Shannon, R. Nagarajan, D. C. Link, M. J. Walter, T. A. Graubert, J. F. DiPersio, R. K. Wilson and T. J. Ley. Recurring mutations found by sequencing an acute myeloid leukemia genome. *N Engl J Med.* 2009;361(11):1058-66.
- 246 D. W. Parsons, S. Jones, X. Zhang, J. C. Lin, R. J. Leary, P. Angenendt, P. Mankoo, H. Carter, I. M. Siu, G. L. Gallia, A. Olivi, R. McLendon, B. A. Rasheed, S. Keir, T. Nikolskaya, Y. Nikolsky, D. A. Busam, H. Tekleab, L. A. Diaz, Jr., J. Hartigan, D. R. Smith, R. L. Strausberg, S. K. Marie, S. M. Shinjo, H. Yan, G. J. Riggins, D. D. Bigner, R. Karchin, N. Papadopoulos, G. Parmigiani, B. Vogelstein, V. E. Velculescu and K. W. Kinzler. An integrated genomic analysis of human glioblastoma multiforme. *Science.* 2008;321(5897):1807-12.

- 247 H. Yan, D. W. Parsons, G. Jin, R. McLendon, B. A. Rasheed, W. Yuan, I. Kos, I. Batinic-Haberle, S. Jones, G. J. Riggins, H. Friedman, A. Friedman, D. Reardon, J. Herndon, K. W. Kinzler, V. E. Velculescu, B. Vogelstein and D. D. Bigner. IDH1 and IDH2 mutations in gliomas. *N Engl J Med*. 2009;360(8):765-73.
- 248 Y. Zhang, H. Wei, K. Tang, D. Lin, C. Zhang, Y. Mi, L. Wang, C. Wang, M. Wang and J. Wang. Mutation analysis of isocitrate dehydrogenase in acute lymphoblastic leukemia. *Genet Test Mol Biomarkers*. 2012;16(8):991-5.
- 249 W. C. Chou, W. C. Lei, B. S. Ko, H. A. Hou, C. Y. Chen, J. L. Tang, M. Yao, W. Tsay, S. J. Wu, S. Y. Huang, S. C. Hsu, Y. C. Chen, Y. C. Chang, K. T. Kuo, F. Y. Lee, M. C. Liu, C. W. Liu, M. H. Tseng, C. F. Huang and H. F. Tien. The prognostic impact and stability of Isocitrate dehydrogenase 2 mutation in adult patients with acute myeloid leukemia. *Leukemia*. 2011;25(2):246-53.
- 250 R. A. Cairns and T. W. Mak. Oncogenic isocitrate dehydrogenase mutations: mechanisms, models, and clinical opportunities. *Cancer Discov*. 2013;3(7):730-41.
- 251 M. Sakata-Yanagimoto. Multistep tumorigenesis in peripheral T cell lymphoma. *Int J Hematol*. 2015;102(5):523-7.
- 252 J. F. Garcia, F. I. Camacho, M. Morente, M. Fraga, C. Montalban, T. Alvaro, C. Bellas, A. Castano, A. Diez, T. Flores, C. Martin, M. A. Martinez, F. Mazon, J. Menarguez, M. J. Mestre, M. Mollejo, A. I. Saez, L. Sanchez and M. A. Piris. Hodgkin and Reed-Sternberg cells harbor alterations in the major tumor suppressor pathways and cell-cycle checkpoints: analyses using tissue microarrays. *Blood*. 2003;101(2):681-9.
- 253 G. Roncador, J. F. Garcia Verdes-Montenegro, S. Tedoldi, J. C. Paterson, W. Klapper, E. Ballabio, L. Maestre, S. Pileri, M. L. Hansmann, M. A. Piris, D. Y. Mason and T. Marafioti. Expression of two markers of germinal center T cells (SAP and PD-1) in angioimmunoblastic T-cell lymphoma. *Haematologica*. 2007;92(8):1059-66.
- 254 L. de Leval, M. Parrens, F. Le Bras, J. P. Jais, V. Fataccioli, A. Martin, L. Lamant, R. Delarue, F. Berger, F. Arbion, C. Bossard, M. C. Copin, D. Canioni, F. Charlotte, G. Damaj, P. Dartigues, B. Fabiani, A. Ledoux-Pilon, K. Montagne, T. Molina, M. Patey, P. Tas, M. Peoch, B. Petit, T. Petrella, J. M. Picquenot, T. Rousset, M. C. Rousselet, I. Soubeyran, S. Thiebault, O. Tournilhac, L. Xerri, C. Gisselbrecht, C. Haioun, G. Delsol and P. Gaulard. Angioimmunoblastic T-cell lymphoma is the most common T-cell lymphoma in two distinct French information data sets. *Haematologica*. 2015;100(9):e361-4.

- 255 Z. X. Yan, L. L. Wu, K. Xue, Q. L. Zhang, Y. Guo, M. Romero, C. Leboeuf, A. Janin, S. J. Chen, L. Wang and W. L. Zhao. MicroRNA187 overexpression is related to tumor progression and determines sensitivity to bortezomib in peripheral T-cell lymphoma. *Leukemia*. 2014.
- 256 T. Wang, A. L. Feldman, D. A. Wada, Y. Lu, A. Polk, R. Briski, K. Ristow, T. M. Habermann, D. Thomas, S. C. Ziesmer, L. E. Wellik, T. M. Lanigan, T. E. Witzig, M. R. Pittelkow, N. G. Bailey, A. C. Hristov, M. S. Lim, S. M. Ansell and R. A. Wilcox. GATA-3 expression identifies a high-risk subset of PTCL, NOS with distinct molecular and clinical features. *Blood*. 2014;123(19):3007-15.
- 257 Stekel. *Microarray bioinformatics*. Cambridge University Press. 2013
- 258 A. Subramanian, P. Tamayo, V. K. Mootha, S. Mukherjee, B. L. Ebert, M. A. Gillette, A. Paulovich, S. L. Pomeroy, T. R. Golub, E. S. Lander and J. P. Mesirov. Gene set enrichment analysis: a knowledge-based approach for interpreting genome-wide expression profiles. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005;102(43):15545-50.
- 259 T. Satoh, W. J. Fantl, J. A. Escobedo, L. T. Williams and Y. Kaziro. Platelet-derived growth factor receptor mediates activation of ras through different signaling pathways in different cell types. *Mol Cell Biol*. 1993;13(6):3706-13.
- 260 Q. Huang, D. S. Snyder, P. Chu, K. K. Gaal, K. L. Chang and L. M. Weiss. PDGFRA rearrangement leading to hyper-eosinophilia, T-lymphoblastic lymphoma, myeloproliferative neoplasm and precursor B-cell acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia*. 2011;25(2):371-5.
- 261 Y. Huang, A. de Reynies, L. de Leval, B. Ghazi, N. Martin-Garcia, M. Travert, J. Bosq, J. Briere, B. Petit, E. Thomas, P. Coppo, T. Marafioti, J. F. Emile, M. H. Delfau-Larue, C. Schmitt and P. Gaulard. Gene expression profiling identifies emerging oncogenic pathways operating in extranodal NK/T-cell lymphoma, nasal type. *Blood*. 2010;115(6):1226-37.
- 262 P. P. Piccaluga, C. Agostinelli, P. L. Zinzani, M. Baccarani, R. Dalla Favera and S. A. Pileri. Expression of platelet-derived growth factor receptor alpha in peripheral T-cell lymphoma not otherwise specified. *Lancet Oncol*. 2005;6(6):440.
- 263 M. Fernandez, R. Manso, F. Bernaldo de Quiros, P. Lopez, A. Martin-Duce and S. Alemany. Involvement of Cot activity in the proliferation of ALCL lymphoma cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2011;411(4):655-60.

- 264 R. Sears, F. Nuckolls, E. Haura, Y. Taya, K. Tamai and J. R. Nevins. Multiple Ras-dependent phosphorylation pathways regulate Myc protein stability. *Genes Dev.* 2000;14(19):2501-14.
- 265 C. W. Roberts, M. M. Leroux, M. D. Fleming and S. H. Orkin. Highly penetrant, rapid tumorigenesis through conditional inversion of the tumor suppressor gene Snf5. *Cancer Cell.* 2002;2(5):415-25.
- 266 W. Lutz, J. Leon and M. Eilers. Contributions of Myc to tumorigenesis. *Biochim Biophys Acta.* 2002;1602(1):61-71.
- 267 Z. Sheng, L. Li, L. J. Zhu, T. W. Smith, A. Demers, A. H. Ross, R. P. Moser and M. R. Green. A genome-wide RNA interference screen reveals an essential CREB3L2-ATF5-MCL1 survival pathway in malignant glioma with therapeutic implications. *Nat Med.* 2010;16(6):671-7.
- 268 S. de Leon Martini, C. B. Muller, R. T. Meurer, C. Fernandes Mda, R. Mariano, E. Silva M. Barbachan, F. Klamt and C. F. Andrade. The potential role of extracellular regulatory kinase in the survival of patients with early stage adenocarcinoma. *J Thorac Dis.* 2014;6(7):930-6.
- 269 P. M. LoRusso, S. S. Krishnamurthi, J. J. Rinehart, L. M. Nabell, L. Malburg, P. B. Chapman, S. E. DePrimo, S. Bentivegna, K. D. Wilner, W. Tan and A. D. Ricart. Phase I pharmacokinetic and pharmacodynamic study of the oral MAPK/ERK kinase inhibitor PD-0325901 in patients with advanced cancers. *Clin Cancer Res.* 2010;16(6):1924-37.
- 270 H. Moritake, H. Shimonodan, K. Marutsuka, S. Kamimura, H. Kojima and H. Nunoi. C-MYC rearrangement may induce an aggressive phenotype in anaplastic lymphoma kinase positive anaplastic large cell lymphoma: Identification of a novel fusion gene ALO17/C-MYC. *Am J Hematol.* 2011;86(1):75-8.
- 271 E. J. Morris, S. Jha, C. R. Restaino, P. Dayananth, H. Zhu, A. Cooper, D. Carr, Y. Deng, W. Jin, S. Black, B. Long, J. Liu, E. Dinunzio, W. Windsor, R. Zhang, S. Zhao, M. H. Angagaw, E. M. Pinheiro, J. Desai, L. Xiao, G. Shipps, A. Hruza, J. Wang, J. Kelly, S. Paliwal, X. Gao, B. S. Babu, L. Zhu, P. Daublain, L. Zhang, B. A. Lutterbach, M. R. Pelletier, U. Philippar, P. Siliphaivanh, D. Witter, P. Kirschmeier, W. R. Bishop, D. Hicklin, D. G. Gilliland, L. Jayaraman, L. Zawel, S. Fawell and A. A. Samatar. Discovery of a novel ERK inhibitor with activity in models of acquired resistance to BRAF and MEK inhibitors. *Cancer Discov.* 2013;3(7):742-50.

- 272 A. Weilemann, M. Grau, T. Erdmann, O. Merkel, U. Sobhiahshar, I. Anagnostopoulos, M. Hummel, A. Siegert, C. Hayford, H. Madle, B. Wollert-Wulf, I. Fichtner, B. Dorken, S. Dirnhofer, S. Mathas, M. Janz, N. C. Emre, A. Rosenwald, G. Ott, P. Lenz, A. Tzankov and G. Lenz. Essential role of IRF4 and MYC signaling for survival of anaplastic large cell lymphoma. *Blood*. 2015;125(1):124-32.
- 273 Z. Feng, J. Zhou and G. Bentley. An unusual case of mycosis fungoides with high proliferation index and C-MYC/8q24 translocation. *J La State Med Soc*. 2013;165(6):324-8.
- 274 X. Huang, Q. Sun, H. Fu, X. Zhou, X. Guan and J. Wang. Both c-Myc and Ki-67 expression are predictive markers in patients with extranodal NK/T-cell lymphoma, nasal type: a retrospective study in China. *Pathol Res Pract*. 2014;210(6):351-6.
- 275 C. Reynolds, J. E. Roderick, J. L. LaBelle, G. Bird, R. Mathieu, K. Bodaar, D. Colon, U. Pyati, K. E. Stevenson, J. Qi, M. Harris, L. B. Silverman, S. E. Sallan, J. E. Bradner, D. S. Neuberg, A. T. Look, L. D. Walensky, M. A. Kelliher and A. Gutierrez. Repression of BIM mediates survival signaling by MYC and AKT in high-risk T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia*. 2014;28(9):1819-27.
- 276 B. Mihaljevic, R. Nedeljkov-Jancic, V. Cemerikic-Martinovic, D. Babic and M. Colovic. Ki-67 proliferative marker in lymph node aspirates of patients with non-Hodgkin's lymphoma. *Med Oncol*. 2006;23(1):83-9.
- 277 T. Scholzen and J. Gerdes. The Ki-67 protein: from the known and the unknown. *J Cell Physiol*. 2000;182(3):311-22.
- 278 M. Federico, T. Rudiger, M. Bellei, B. N. Nathwani, S. Luminari, B. Coiffier, N. L. Harris, E. S. Jaffe, S. A. Pileri, K. J. Savage, D. D. Weisenburger, J. O. Armitage, N. Mounier and J. M. Vose. Clinicopathologic characteristics of angioimmunoblastic T-cell lymphoma: analysis of the international peripheral T-cell lymphoma project. *J Clin Oncol*. 2013;31(2):240-6.
- 279 D. D. Weisenburger, K. J. Savage, N. L. Harris, R. D. Gascoyne, E. S. Jaffe, K. A. MacLennan, T. Rudiger, S. Pileri, S. Nakamura, B. Nathwani, E. Campo, F. Berger, B. Coiffier, W. S. Kim, H. Holte, M. Federico, W. Y. Au, K. Tobinai, J. O. Armitage and J. M. Vose. Peripheral T-cell lymphoma, not otherwise specified: a report of 340 cases from the International Peripheral T-cell Lymphoma Project. *Blood*. 2011;117(12):3402-8.

- 280 V. Manfe, E. Biskup, A. Willumsgaard, A. G. Skov, D. Palmieri, P. Gasparini, A. Lagana, A. Woetmann, N. Odum, C. M. Croce and R. Gniadecki. cMyc/miR-125b-5p signalling determines sensitivity to bortezomib in preclinical model of cutaneous T-cell lymphomas. *PLoS One*. 2013;8(3):e59390.
- 281 D. Naci, M. A. El Azreq, N. Chetoui, L. Laudén, F. Sigaux, D. Charron, R. Al-Daccak and F. Aoudjit. $\alpha 2\beta 1$ integrin promotes chemoresistance against doxorubicin in cancer cells through extracellular signal-regulated kinase (ERK). *J Biol Chem*. 2012;287(21):17065-76.
- 282 A. M. Evens, S. T. Rosen, I. Helenowski, J. Kline, A. Larsen, J. Colvin, J. N. Winter, K. M. van Besien, L. I. Gordon and S. M. Smith. A phase I/II trial of bortezomib combined concurrently with gemcitabine for relapsed or refractory DLBCL and peripheral T-cell lymphomas. *Br J Haematol*. 2013;163(1):55-61.
- 283 S. J. Kim, D. H. Yoon, H. J. Kang, J. S. Kim, S. K. Park, H. J. Kim, J. Lee, B. Y. Ryoo, Y. H. Ko, J. Huh, W. I. Yang, H. K. Kim, S. K. Min, S. S. Lee, I. G. Do, C. Suh and W. S. Kim. Bortezomib in combination with CHOP as first-line treatment for patients with stage III/IV peripheral T-cell lymphomas: a multicentre, single-arm, phase 2 trial. *Eur J Cancer*. 2012;48(17):3223-31.
- 284 E. Marchi, L. Paoluzzi, L. Scotto, V. E. Seshan, J. M. Zain, P. L. Zinzani and O. A. O'Connor. Pralatrexate is synergistic with the proteasome inhibitor bortezomib in in vitro and in vivo models of T-cell lymphoid malignancies. *Clin Cancer Res*. 2010;16(14):3648-58.
- 285 Q. L. Zhang, L. Wang, Y. W. Zhang, X. X. Jiang, F. Yang, W. L. Wu, A. Janin, Z. Chen, Z. X. Shen, S. J. Chen and W. L. Zhao. The proteasome inhibitor bortezomib interacts synergistically with the histone deacetylase inhibitor suberoylanilide hydroxamic acid to induce T-leukemia/lymphoma cells apoptosis. *Leukemia*. 2009;23(8):1507-14.
- 286 W. L. Zhao, Y. Y. Liu, Q. L. Zhang, L. Wang, C. Leboeuf, Y. W. Zhang, J. Ma, J. F. Garcia, Y. P. Song, J. M. Li, Z. X. Shen, Z. Chen, A. Janin and S. J. Chen. PRDM1 is involved in chemoresistance of T-cell lymphoma and down-regulated by the proteasome inhibitor. *Blood*. 2008;111(7):3867-71.
- 287 R. Nakamoto-Matsubara, M. Sakata-Yanagimoto, T. Enami, K. Yoshida, S. Yanagimoto, Y. Shiozawa, T. Nanmoku, K. Satomi, H. Muto, N. Obara, T. Kato, N. Kurita, Y. Yokoyama, K. Izutsu, Y. Ota, M. Sanada, S. Shimizu, T. Komeno, Y. Sato,

- T. Ito, I. Kitabayashi, K. Takeuchi, N. Nakamura, S. Ogawa and S. Chiba. Detection of the G17V RHOA mutation in angioimmunoblastic T-cell lymphoma and related lymphomas using quantitative allele-specific PCR. *PLoS One*. 2014;9(10):e109714.
- 288 E. E. Sander, J. P. ten Klooster, S. van Delft, R. A. van der Kammen and J. G. Collard. Rac downregulates Rho activity: reciprocal balance between both GTPases determines cellular morphology and migratory behavior. *J Cell Biol*. 1999;147(5):1009-22.
- 289 P. Flevaris, Z. Li, G. Zhang, Y. Zheng, J. Liu and X. Du. Two distinct roles of mitogen-activated protein kinases in platelets and a novel Rac1-MAPK-dependent integrin outside-in retractile signaling pathway. *Blood*. 2009;113(4):893-901.
- 290 C. Murga, M. Zohar, H. Teramoto and J. S. Gutkind. Rac1 and RhoG promote cell survival by the activation of PI3K and Akt, independently of their ability to stimulate JNK and NF-kappaB. *Oncogene*. 2002;21(2):207-16.
- 291 R. Nagao, Y. Y. Kikuti, J. Carreras, T. Kikuchi, M. Miyaoka, H. Matsushita, M. Kojima, K. Ando, M. Sakata-Yanagimoto, S. Chiba and N. Nakamura. Clinicopathologic Analysis of Angioimmunoblastic T-cell Lymphoma With or Without RHOA G17V Mutation Using Formalin-fixed Paraffin-embedded Sections. *Am J Surg Pathol*. 2016;40(8):1041-50.
- 292 B. S. Zuckerbraun, R. A. Shapiro, T. R. Billiar and E. Tzeng. RhoA influences the nuclear localization of extracellular signal-regulated kinases to modulate p21Waf/Cip1 expression. *Circulation*. 2003;108(7):876-81.
- 293 H. Li, C. Y. Ung, X. H. Ma, B. W. Li, B. C. Low, Z. W. Cao and Y. Z. Chen. Simulation of crosstalk between small GTPase RhoA and EGFR-ERK signaling pathway via MEKK1. *Bioinformatics*. 2009;25(3):358-64.
- 294 M. K. Kiessling, P. A. Oberholzer, C. Mondal, M. B. Karpova, M. C. Zipser, W. M. Lin, M. Girardi, L. E. Macconail, S. M. Kehoe, C. Hatton, L. E. French, L. A. Garraway, G. Polier, D. Suss, C. D. Klemke, P. H. Krammer, K. Gulow and R. Dummer. High-throughput mutation profiling of CTCL samples reveals KRAS and NRAS mutations sensitizing tumors toward inhibition of the RAS/RAF/MEK signaling cascade. *Blood*. 2011;117(8):2433-40.
- 295 A. Shieh, A. F. Ward, K. L. Donlan, E. R. Harding-Theobald, J. Xu, C. G. Mullighan, C. Zhang, S. C. Chen, X. Su, J. R. Downing, G. E. Bollag and K. M.

Shannon. Defective K-Ras oncoproteins overcome impaired effector activation to initiate leukemia in vivo. *Blood*. 2013;121(24):4884-93.

296 M. Takahara, K. Kishibe, N. Bandoh, S. Nonaka and Y. Harabuchi. P53, N- and K-Ras, and beta-catenin gene mutations and prognostic factors in nasal NK/T-cell lymphoma from Hokkaido, Japan. *Hum Pathol*. 2004;35(1):86-95.

297 J. Choi, G. Goh, T. Walradt, B. S. Hong, C. G. Bunick, K. Chen, R. D. Bjornson, Y. Maman, T. Wang, J. Tordoff, K. Carlson, J. D. Overton, K. J. Liu, J. M. Lewis, L. Devine, L. Barbarotta, F. M. Foss, A. Subtil, E. C. Vonderheid, R. L. Edelson, D. G. Schatz, T. J. Boggon, M. Girardi and R. P. Lifton. Genomic landscape of cutaneous T cell lymphoma. *Nat Genet*. 2015;47(9):1011-9.

298 L. Odqvist, M. Sanchez-Beato, S. Montes-Moreno, E. Martin-Sanchez, R. Pajares, L. Sanchez-Verde, P. L. Ortiz-Romero, J. Rodriguez, S. M. Rodriguez-Pinilla, F. Iniesta-Martinez, J. C. Solera-Arroyo, R. Ramos-Asensio, T. Flores, J. M. Palanca, F. G. Bragado, P. D. Franjo and M. A. Piris. NIK controls classical and alternative NF-kappaB activation and is necessary for the survival of human T-cell lymphoma cells. *Clin Cancer Res*. 2013;19(9):2319-30.

299 T. Wang, Y. Lu, A. Polk, P. Chowdhury, C. M. Zamalloa, H. Fujiwara, K. Suemori, N. Beyersdorf, A. C. Hristov, M. S. Lim, N. G. Bailey and R. A. Wilcox. T-cell Receptor Signaling Activates an ITK/NF-kappaB/GATA-3 axis in T-cell Lymphomas Facilitating Resistance to Chemotherapy. *Clin Cancer Res*. 2016.

300 N. B. Silverberg, P. Lin, L. Travis, J. Farley-Li, A. J. Mancini, A. M. Wagner, S. L. Chamlin and A. S. Paller. Tacrolimus ointment promotes repigmentation of vitiligo in children: a review of 57 cases. *J Am Acad Dermatol*. 2004;51(5):760-6.

301 F. Thol, F. Damm, K. Wagner, G. Gohring, B. Schlegelberger, D. Hoelzer, M. Lubbert, W. Heit, L. Kanz, G. Schlimok, A. Raghavachar, W. Fiedler, H. Kirchner, G. Heil, M. Heuser, J. Krauter and A. Ganser. Prognostic impact of IDH2 mutations in cytogenetically normal acute myeloid leukemia. *Blood*. 2010;116(4):614-6.

302 P. Paschka, R. F. Schlenk, V. I. Gaidzik, M. Habdank, J. Kronke, L. Bullinger, D. Spath, S. Kayser, M. Zucknick, K. Gotze, H. A. Horst, U. Germing, H. Dohner and K. Dohner. IDH1 and IDH2 mutations are frequent genetic alterations in acute myeloid leukemia and confer adverse prognosis in cytogenetically normal acute myeloid leukemia with NPM1 mutation without FLT3 internal tandem duplication. *J Clin Oncol*. 2010;28(22):3636-43.

- 303 M. K. Kaneko, S. Morita, Y. Tsujimoto, R. Yanagiya, K. Nasu, H. Sasaki, Y. Hozumi, K. Goto, A. Natsume, M. Watanabe, T. Kumabe, S. Takano and Y. Kato. Establishment of novel monoclonal antibodies KMab-1 and MMab-1 specific for IDH2 mutations. *Biochem Biophys Res Commun.* 2013;432(1):40-5.
- 304 Y. Kato and M. K. Kaneko. Generation of a novel monoclonal antibody WMab-1 specific for IDH2-R172W mutation. *Biochem Biophys Res Commun.* 2013;433(4):374-8.
- 305 F. Lemonnier, R. A. Cairns, S. Inoue, W. Y. Li, A. Dupuy, S. Broutin, N. Martin, V. Fataccioli, R. Pelletier, A. Wakeham, B. E. Snow, L. de Leval, A. Pujals, C. Haioun, A. Paci, E. R. Tobin, R. Narayanaswamy, K. Yen, S. Jin, P. Gaulard and T. W. Mak. The IDH2 R172K mutation associated with angioimmunoblastic T-cell lymphoma produces 2HG in T cells and impacts lymphoid development. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2016;113(52):15084-9.
- 306 C. Thiede. Mutant DNMT3A: teaming up to transform. *Blood.* 2012;119(24):5615-7.
- 307 T. B. Nguyen, M. Sakata-Yanagimoto, R. Nakamoto-Matsubara, T. Enami, Y. Ito, T. Kobayashi, N. Obara, Y. Hasegawa and S. Chiba. Double somatic mosaic mutations in TET2 and DNMT3A--origin of peripheral T cell lymphoma in a case. *Ann Hematol.* 2015;94(7):1221-3.
- 308 M. Cheminant, J. Bruneau, O. Kosmider, F. Lefrere, R. Delarue, P. Gaulard, I. Radford, C. Derrieux, O. Hermine and F. Lemonnier. Efficacy of 5-azacytidine in a TET2 mutated angioimmunoblastic T cell lymphoma. *Br J Haematol.* 2015;168(6):913-6.
- 309 N. Mourad, N. Mounier, J. Briere, E. Raffoux, A. Delmer, A. Feller, C. J. Meijer, J. F. Emile, R. Bouabdallah, A. Bosly, J. Diebold, C. Haioun, B. Coiffier, C. Gisselbrecht and P. Gaulard. Clinical, biologic, and pathologic features in 157 patients with angioimmunoblastic T-cell lymphoma treated within the Groupe d'Etude des Lymphomes de l'Adulte (GELA) trials. *Blood.* 2008;111(9):4463-70.
- 310 W. Chan, T. B. Schaffer and J. L. Pomerantz. A quantitative signaling screen identifies CARD11 mutations in the CARD and LATCH domains that induce Bcl10 ubiquitination and human lymphoma cell survival. *Mol Cell Biol.* 2013;33(2):429-43.

- 311 S. M. Pedersen, W. Chan, R. P. Jattani, S. Mackie and J. L. Pomerantz. Correction for Pedersen et al., Regulation of CARD11 Signaling and Lymphoma Cell Survival by the E3 Ubiquitin Ligase RNF181. *Mol Cell Biol.* 2016;36(8):1322.
- 312 I. Bonzheim, E. Geissinger, W. Y. Chuang, S. Roth, P. Strobel, A. Marx, P. Reimer, M. Wilhelm, B. Puppe, A. Rosenwald, H. K. Muller-Hermelink and T. Rudiger. Analysis of single nucleotide polymorphisms in the FAS and CTLA-4 genes of peripheral T-cell lymphomas. *J Hematop.* 2008;1(1):11-21.
- 313 T. Auguste, M. Travert, K. Tarte, P. Ame-Thomas, C. Artchounin, N. Martin-Garcia, A. de Reynies, L. de Leval, P. Gaulard and M. H. Delfau-Larue. ROQUIN/RC3H1 alterations are not found in angioimmunoblastic T-cell lymphoma. *PLoS One.* 2013;8(6):e64536.
- 314 B. de Unamuno Bustos, R. Murria Estal, G. Perez Simo, I. de Juan Jimenez, B. Escutia Munoz, M. Rodriguez Serna, V. Alegre de Miquel, M. Llavador Ros, R. Ballester Sanchez, E. Nagore Enguidanos, S. Palanca Suela and R. Botella Estrada. Towards Personalized Medicine in Melanoma: Implementation of a Clinical Next-Generation Sequencing Panel. *Sci Rep.* 2017;7(1):495.
- 315 M. K. McConechy, J. Ding, M. C. Cheang, K. C. Wiegand, J. Senz, A. A. Tone, W. Yang, L. M. Prentice, K. Tse, T. Zeng, H. McDonald, A. P. Schmidt, D. G. Mutch, J. N. McAlpine, M. Hirst, S. P. Shah, C. H. Lee, P. J. Goodfellow, C. B. Gilks and D. G. Huntsman. Use of mutation profiles to refine the classification of endometrial carcinomas. *J Pathol.* 2012;228(1):20-30.
- 316 K. Watanabe-Smith, C. Tognon, J. W. Tyner, J. P. Meijerink, B. J. Druker and A. Agarwal. Discovery and functional characterization of a germline, CSF2RB-activating mutation in leukemia. *Leukemia.* 2016;30(9):1950-3.
- 317 Y. B. Gao, Z. L. Chen, J. G. Li, X. D. Hu, X. J. Shi, Z. M. Sun, F. Zhang, Z. R. Zhao, Z. T. Li, Z. Y. Liu, Y. D. Zhao, J. Sun, C. C. Zhou, R. Yao, S. Y. Wang, P. Wang, N. Sun, B. H. Zhang, J. S. Dong, Y. Yu, M. Luo, X. L. Feng, S. S. Shi, F. Zhou, F. W. Tan, B. Qiu, N. Li, K. Shao, L. J. Zhang, Q. Xue, S. G. Gao and J. He. Genetic landscape of esophageal squamous cell carcinoma. *Nat Genet.* 2014;46(10):1097-102.
- 318 A. Kropveld, E. H. Rozemuller, F. G. Leppers, K. C. Scheidel, R. A. de Weger, R. Koole, G. J. Hordijk, P. J. Slootweg and M. G. Tilanus. Sequencing analysis of RNA and DNA of exons 1 through 11 shows p53 gene alterations to be present in almost 100% of head and neck squamous cell cancers. *Lab Invest.* 1999;79(3):347-53.

- 319 A. Reles, W. H. Wen, A. Schmider, C. Gee, I. B. Runnebaum, U. Kilian, L. A. Jones, A. El-Naggar, C. Minguillon, I. Schonborn, O. Reich, R. Kreienberg, W. Lichtenegger and M. F. Press. Correlation of p53 mutations with resistance to platinum-based chemotherapy and shortened survival in ovarian cancer. *Clin Cancer Res.* 2001;7(10):2984-97.
- 320 G. Smith, F. A. Carey, J. Beattie, M. J. Wilkie, T. J. Lightfoot, J. Coxhead, R. C. Garner, R. J. Steele and C. R. Wolf. Mutations in APC, Kirsten-ras, and p53--alternative genetic pathways to colorectal cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002;99(14):9433-8.
- 321 M. Zou, Y. Shi and N. R. Farid. p53 mutations in all stages of thyroid carcinomas. *J Clin Endocrinol Metab.* 1993;77(4):1054-8.
- 322 J. M. Paramio, M. Navarro, C. Segrelles, E. Gomez-Casero and J. L. Jorcano. PTEN tumour suppressor is linked to the cell cycle control through the retinoblastoma protein. *Oncogene.* 1999;18(52):7462-8.
- 323 M. J. Kiel, T. Velusamy, D. Rolland, A. A. Sahasrabudde, F. Chung, N. G. Bailey, A. Schrader, B. Li, J. Z. Li, A. B. Ozel, B. L. Betz, R. N. Miranda, L. J. Medeiros, L. Zhao, M. Herling, M. S. Lim and K. S. Elenitoba-Johnson. Integrated genomic sequencing reveals mutational landscape of T-cell prolymphocytic leukemia. *Blood.* 2014;124(9):1460-72.
- 324 P. Blombery, E. R. Thompson, K. Jones, G. M. Arnau, S. Lade, J. F. Markham, J. Li, A. Deva, R. W. Johnstone, A. Khot, H. M. Prince and D. Westerman. Whole exome sequencing reveals activating JAK1 and STAT3 mutations in breast implant-associated anaplastic large cell lymphoma anaplastic large cell lymphoma. *Haematologica.* 2016;101(9):e387-90.
- 325 M. Nakagawa, R. Schmitz, W. Xiao, C. K. Goldman, W. Xu, Y. Yang, X. Yu, T. A. Waldmann and L. M. Staudt. Gain-of-function CCR4 mutations in adult T cell leukemia/lymphoma. *J Exp Med.* 2014;211(13):2497-505.
- 326 N. Yoshida, H. Miyoshi, T. Kato, M. Sakata-Yanagimoto, D. Niino, H. Taniguchi, Y. Moriuchi, M. Miyahara, D. Kurita, Y. Sasaki, J. Shimono, K. Kawamoto, A. Utsunomiya, Y. Imaizumi, M. Seto and K. Ohshima. CCR4 frameshift mutation identifies a distinct group of adult T cell leukaemia/lymphoma with poor prognosis. *J Pathol.* 2016;238(5):621-6.
- 327 S. Yao, Y. Zhu and L. Chen. Advances in targeting cell surface signalling molecules for immune modulation. *Nat Rev Drug Discov.* 2013;12(2):130-46.

- 328 M. S. Stark, S. L. Woods, M. G. Gartside, V. F. Bonazzi, K. Dutton-Regester, L. G. Aoude, D. Chow, C. Sereduk, N. M. Niemi, N. Tang, J. J. Ellis, J. Reid, V. Zismann, S. Tyagi, D. Muzny, I. Newsham, Y. Wu, J. M. Palmer, T. Pollak, D. Youngkin, B. R. Brooks, C. Lanagan, C. W. Schmidt, B. Kobe, J. P. MacKeigan, H. Yin, K. M. Brown, R. Gibbs, J. Trent and N. K. Hayward. Frequent somatic mutations in MAP3K5 and MAP3K9 in metastatic melanoma identified by exome sequencing. *Nat Genet.* 2011;44(2):165-9.
- 329 N. Revencu, L. M. Boon, A. Mendola, M. R. Cordisco, J. Dubois, P. Clapuyt, F. Hammer, D. J. Amor, A. D. Irvine, E. Baselga, A. Dompmartin, S. Syed, A. Martin-Santiago, L. Ades, F. Collins, J. Smith, S. Sandaradura, V. R. Barrio, P. E. Burrows, F. Blei, M. Cozzolino, N. Brunetti-Pierri, A. Vicente, M. Abramowicz, J. Desir, C. Vilain, W. K. Chung, A. Wilson, C. A. Gardiner, Y. Dwight, D. J. Lord, L. Fishman, C. Cytrynbaum, S. Chamlin, F. Ghali, Y. Gilaberte, S. Joss, C. Boente Mdel, C. Leaute-Labreze, M. A. Delrue, S. Bayliss, L. Martorell, M. A. Gonzalez-Ensenat, J. Mazereeuw-Hautier, B. O'Donnell, D. Bessis, R. E. Pyeritz, A. Salhi, O. T. Tan, O. Wargon, J. B. Mulliken and M. Vikkula. RASA1 mutations and associated phenotypes in 68 families with capillary malformation-arteriovenous malformation. *Hum Mutat.* 2013;34(12):1632-41.
- 330 W. E. Tidyman and K. A. Rauen. The RASopathies: developmental syndromes of Ras/MAPK pathway dysregulation. *Curr Opin Genet Dev.* 2009;19(3):230-6.
- 331 C. Agostinelli, S. Hartmann, W. Klapper, P. Korkolopoulou, S. Righi, T. Marafioti, P. P. Piccaluga, E. Patsouris, M. L. Hansmann, K. Lennert and S. A. Pileri. Peripheral T cell lymphomas with follicular T helper phenotype: a new basket or a distinct entity? Revising Karl Lennert's personal archive. *Histopathology.* 2011;59(4):679-91.
- 332 L. de Leval, J. A. Ferry, B. Falini, M. Shipp and N. L. Harris. Expression of bcl-6 and CD10 in primary mediastinal large B-cell lymphoma: evidence for derivation from germinal center B cells? *Am J Surg Pathol.* 2001;25(10):1277-82.
- 333 S. A. Pileri. Follicular helper T-cell-related lymphomas. *Blood.* 2015;126(15):1733-4.

ANEXOS

ANEXO I: Informes de los Comités Éticos de Investigación.

El proyecto no incluye análisis clínicos. La parte de análisis de muestras está revisada por los CEIC de los hospitales en los que se ha realizado el estudio.



FUNDACIÓN MARQUÉS DE VALDECILLA
IFIMAV



M^a BLANCA SÁNCHEZ SANTIAGO, Secretario/a del **COMITÉ ÉTICO DE INVESTIGACIÓN CLÍNICA DE CANTABRIA**

CERTIFICA

Que este Comité ha evaluado la propuesta del Investigador Principal del estudio:

TÍTULO: Neoplasias hematológicas: terapia apoyada en el diagnóstico molecular

TIPO DE ESTUDIO: Proyecto de Investigación

y considera que:

- Se cumplen los requisitos necesarios de idoneidad del protocolo en relación con los objetivos del estudio y están justificados los riesgos y molestias previsibles para el sujeto, teniendo en cuenta los beneficios esperados.
- Son adecuados tanto el procedimiento para obtener el consentimiento informado
- La capacidad del investigador y sus colaboradores, y las instalaciones y medios disponibles, tal y como ha sido informado, son apropiados para llevar a cabo el estudio.

Este CEIC, emite un informe **FAVORABLE** para que dicho Estudio sea realizado en el **HOSPITAL UNIVERSITARIO MARQUÉS DE VALDECILLA**, actuando como investigador principal el Dr./Dra. **MIGUEL ANGEL PIRIS PINILLA**

Como queda reflejado en el Acta: 31/2011.

Lo que firmo en Santander, a **05 de diciembre de 2011**


M^a BLANCA SÁNCHEZ SANTIAGO
Secretario/a del CEIC

Tlfno: 942 315 515 • Fax: 942 315 517 • e-mails: ifimav.eclnicos3@fmdv.org y ifimav.eclnicos4@fmdv.org
• <http://www.ifimav.org> Avda. Valdecilla, s/n • 39008 SANTANDER (Cantabria)

INFORME DEL COMITÉ ETICO DE INVESTIGACION CLINICA

TITULO DEL PROYECTO: "Neoplasias hematológicas: Terapia apoyada en el diagnóstico molecular"

INVESTIGADOR PRINCIPAL: Dra. Socorro Rodríguez Pinilla

Este Proyecto de Investigación Biomédica ha sido evaluado por el CEIC-FJD según consta en el acta nº 07/11 correspondiente al 26 de julio de 2011.

Consideramos que el Estudio reúne las normas éticas estándar de nuestra Institución para experimentación en el hombre, y que éstas a su vez coinciden con las de la Declaración de Helsinki de 1964, posteriores revisiones de Tokio (1975), Venecia (1983), Hong Kong (1989), Somerset West (1996), Edimburgo (2000) y la última edición de Seúl (2008).

Asimismo, hacemos constar que no existe contraprestación económica para el centro ni para el investigador.

Madrid, 26 de julio de 2011


Dra. Macarena Benilla Porras
Vicepresidente CEIC-FJD

Conocido y conforme:


Antonio González Fernández
Area Administrativa de Investigación

Vº Bº


Juan Antonio Alvaro de la Parra
Gerente FJD-UTE

PIC 32/2011

ANEXO II: Artículos científicos.

Los resultados presentados en esta Tesis Doctoral están plasmados en cuatro artículos publicados y uno en preparación.

Artículos publicados (adjuntos):

1. “The RHOA G17V gene mutation occurs frequently in peripheral T-cell lymphoma and is associated with a characteristic molecular signature”. **Rebeca Manso**, Margarita Sánchez-Beato, Silvia Monsalvo, Laura Cereceda, Pilar Llamas; Federico Rojo, Manuela Mollejo, Javier Menárguez, Javier Alves, Mónica García-Cosío, Miguel Ángel Piris, Socorro María Rodríguez-Pinilla. *Blood* 2014. 123(18):2893-94.
2. “Recurrent presence of the PLCG1 S345F mutation in nodal peripheral T-cell lymphomas”. **Rebeca Manso**, Socorro M Rodríguez-Pinilla, Julia González-Rincón, Sagrario Gómez, Silvia Monsalvo, Pilar Llamas, Federico Rojo, David Pérez-Callejo, Laura Cereceda, Miguel A Limeres, Carmen Maeso, Lucía Ferrando, Carlos Pérez-Seoane, Guillermo Rodríguez, José M Arrinda, Federico García-Bragado, Renato Franco, José L Rodríguez-Peralto, Joaquín González-Carreró, Francisco Martín-Dávila, Miguel A Piris, Margarita Sánchez-Beato. *Haematologica* 2015.100(1):e25-7.
3. “C-MYC is related to GATA3 expression and associated with poor prognosis in nodal peripheral T-cell lymphomas”. **Rebeca Manso**, Carmen Bellas, Paloma Martín-Acosta, Manuela Mollejo, Javier Menárguez, Federico Rojo, Pilar Llamas, Miguel A Piris, Socorro M Rodríguez-Pinilla. *Haematologica* 2016: 101(8):e336-8.
4. “p-MAPK1 expression associated with poor prognosis in angioimmunoblastic T-cell lymphoma patients”. **Rebeca Manso**, Giovanna Roncador, Santiago Montes-Moreno, Federico Rojo, M Ángeles Pérez-Sáenz, Manuela Mollejo, Javier Menárguez, Nerea Carvajal, Mónica García-Cosío, Pilar Llamas, Miguel A Piris, Socorro M Rodríguez-Pinilla. *British Journal of Haematology* 2017.176(4):661-664.

Artículo en preparación (adjunto):

1. Mutations in JAK/STAT pathway genes and activation of the pathway: a significant finding in nodal peripheral T-cell lymphoma.

Además, se han publicado los siguientes artículos en los que la doctoranda ha participado:

1. "Clinical value of miR-26b discriminating ulcerative colitis-associated colorectal cancer in the subgroup of patients with metastatic disease". Ion Cristóbal, **Rebeca Manso**, Paula González-Alonso, Juan Madoz-Gúrpide, Federico Rojo, Jesús García-Foncillas. *Inflammatory Bowel Diseases* 2015.21(10):E24-5.
2. "PP2A inhibition determines poor outcome and doxorubicin resistance in early breast cancer and its activation shows promising therapeutic effects". Raúl Rincón, Ion Cristóbal, Sandra Zazo, Oriol Arpí, Silvia Menéndez, **Rebeca Manso**, Ana Lluch, Pilar Eroles, Ana Rovira, Joan Albanell, Jesús García-Foncillas, Juan Madoz-Gúrpide, Federico Rojo. *Oncotarget* 2015.6(6):4299-314.
3. "Activation of the tumor suppressor PP2A emerges as a novel potential therapeutic strategy for treating prostate cancer". Ion Cristóbal, Paula González-Alonso, Lina Daoud, Esther Solano, Blanca Torrejón, **Rebeca Manso**, Juan Madoz-Gúrpide, Federico Rojo, Jesús García-Foncillas. *Marine Drugs* 2015.13:3276-3286.
4. "PP2A inhibition as a novel therapeutic target in castration-resistant prostate cancer". Paula González-Alonso, Ion Cristóbal, **Rebeca Manso**, Juan Madoz-Gúrpide, Jesús García-Foncillas, Federico Rojo. *Tumor Biology* 2015.36:5753-55.
5. "Should we also evaluate SET together with CIP2A for the treatment with second generation tyrosine kinase inhibitors in chronic myeloid leukemia?". Ion Cristóbal, **Rebeca Manso**, Paula González-Alonso, Federico Rojo, Jesús García-Foncillas. *Leukemia* 2015.29(10):2117.
6. "Clinical usefulness of 5-FU metabolic enzymes as predictive markers of response to chemotherapy in colorectal cancer". Ion Cristóbal, **Rebeca Manso**,

- Paula Gozález-Alonso, Juan Madoz-Gúrpide, Federico Rojo, Jesús García-Foncillas. *World Journal of Surgery* 2016. 40(4):1017-8.
7. "MiR-29c downregulation contributes to metastatic progression in colorectal cancer". Ion Cristóbal, Juan Madoz-Gúrpide, **Rebeca Manso**, Federico Rojo, Jesús García-Foncillas. *Annals of Oncology* 2015.26(10):2199-200.
 8. "Primary Cutaneous Follicular Helper T-cell Lymphoma". Carlos Santonja, Carlos Soto, **Rebeca Manso**, Luis Requena, Miguel A Piris, Socorro M Rodríguez-Pinilla. *Journal of Cutaneous Pathology* 2016.43(2):164-170.
 9. "Downregulation of miR-138 as a Contributing Mechanism to Lcn-2 Overexpression in Colorectal Cancer with Liver Metastasis". Ion Cristóbal, Blanca Torrejón, Paula González-Alonso, **Rebeca Manso**, Federico Rojo, Jesús García-Foncillas. *World Journal of Surgery* 2016.40(4):1021-2.
 10. "Deregulation of the PP2A inhibitor SET shows promising therapeutic implications and determines poor clinical outcome in patients with metastatic colorectal cancer". Ion Cristóbal, Raúl Rincón, **Rebeca Manso**, Cristina Caramés, Sandra Zazo, Juan Madoz-Gúrpide, Federico Rojo, Jesús García-Foncillas. *Clinical Cancer Research* 2015.21(2):347-56.
 11. "Potential anti-tumor effects of FTY720 associated with PP2A activation: a brief review". Ion Cristóbal, Juan Madoz-Gúrpide, **Rebeca Manso**, Paula González-Alonso, Federico Rojo, Jesús García-Foncillas. *Curr Med Res Opin* 2016.32(6):1137-41.
 12. "c-Jun N-terminal kinase inactivation by mitogen-activated protein kinase phosphatase 1 determines resistance to taxanes and anthracyclines in breast cancer". Raul Rincon, Sandra Zazo, Cristina Chamizo, **Rebeca Manso**, Paula González-Alonso, Ester Martín-Aparicio, Ion Cristobal, Carmen Cañadas, Rosario Perona, Ana Lluch, Pilar Eroles, Jesús García-Foncillas, Joan Albanell, Ana Rovira, Juan Madoz-Gúrpide, Federico Rojo. *Mol Cancer Ther* 2016 (aceptado).
 13. "Downregulation of microRNA-199b predicts unfavorable prognosis and emerges as a novel therapeutic target which contributes to PP2A inhibition in

metastatic colorectal cancer". Ion Cristóbal, Cristina Caramés, Raúl Rincón, **Rebeca Manso**, Juan Madoz-Gúrpide, Blanca Torrejón, Paula González-Alonso, Federico Rojo, Jesús García-Foncillas. *Oncotarget* 2016 (aceptado).

14. "MYD88 L265P mutation in cutaneous involvement by Waldenström macroglobulinemia". Victoria Alegría, Lucía Prieto-Torres, Carlos Santonja, Raúl Córdoba, **Rebeca Manso**, Luis Requena, Socorro María Rodríguez-Pinilla. *Journal of Cutaneous Pathology* 2017 (aceptado).



blood

2014 123: 2893-2894
doi:10.1182/blood-2014-02-555946

The *RHOA* G17V gene mutation occurs frequently in peripheral T-cell lymphoma and is associated with a characteristic molecular signature

Rebeca Manso, Margarita Sánchez-Beato, Silvia Monsalvo, Sagrario Gómez, Laura Cereceda, Pilar Llamas, Federico Rojo, Manuela Mollejo, Javier Menárguez, Javier Alves, Mónica García-Cosío, Miguel A. Piris and Socorro M. Rodríguez-Pinilla

Updated information and services can be found at:

<http://bloodjournal.hematologylibrary.org/content/123/18/2893.full.html>

Articles on similar topics can be found in the following Blood collections

[Lymphoid Neoplasia](#) (1693 articles)

Information about reproducing this article in parts or in its entirety may be found online at:

http://bloodjournal.hematologylibrary.org/site/misc/rights.xhtml#repub_requests

Information about ordering reprints may be found online at:

<http://bloodjournal.hematologylibrary.org/site/misc/rights.xhtml#reprints>

Information about subscriptions and ASH membership may be found online at:

<http://bloodjournal.hematologylibrary.org/site/subscriptions/index.xhtml>

Correspondence

To the editor:

The *RHOA* G17V gene mutation occurs frequently in peripheral T-cell lymphoma and is associated with a characteristic molecular signature

Peripheral T-cell lymphomas (PTCLs) are a group with poor outcome and nonspecific therapeutic regimens. Recently, Palomero et al¹ and Sakata-Yanagimoto et al² identified a recurrent heterozygous mutation in the *RHOA* small GTPase gene encoding a p.Gly17Val alteration (G17V) that leads to inhibition of the ρ -signaling pathway. Because the *RHOA*/ ρ -kinase pathway plays a pivotal role in many cellular functions, we wanted to establish whether the G17V mutation of the *RHOA* gene (*RHOA-G17V*) has any biological relevance in nodal PTCL (n-PTCL).

Twenty-six frozen n-PTCL-samples (13 peripheral T-cell lymphomas not specified [PTCL-NOSs], 11 angioimmunoblastic T-cell lymphomas [AITLs], and 2 anaplastic large cell lymphomas) were hybridized on a whole-human-genome oligo microarray and analyzed for the presence of the *RHOA-G17V* using a specific qBiomarker somatic-mutation PCR assay (SABiosciences). Expression profile data were analyzed with gene set enrichment analysis software. *RHOA-G17V* was found in 6 AITLs and 3 PTCL-NOSs (34.6% of cases). Thirty-two gene sets were overrepresented in the mutated subgroup of tumors. Of particular significance were the pathways related to the follicular helper CD4 T-cell and AITL signature. Moreover, other pathways of great relevance to PTCL pathogenesis, such as p38 mitogen-activated protein kinase, phosphatidylinositol 3-kinase, KRAS, the alternative nuclear factor κ B (NF- κ B) pathway, and the RAC1 pathway, were significantly associated with the presence of the *RHOA-G17V* (see supplemental Table 1 available at the *Blood* Web site).

The presence of *RHOA-G17V* was further analyzed by the previously described method in an independent consecutive series of 136 paraffin-embedded n-PTCL samples. Positive results were confirmed by Sanger sequencing of the mutated region. A total of 26.4% (32/121) of the cases carried *RHOA-G17V*. A total of 34.2% (25/73) of cases were AITL; 14.6% (7/48) were PTCL-NOS ($P = .016$), 3 of which had AITL-like features. The lower percentage of mutated cases than previously reported,^{1,2} especially in AITLs, may have been due to the lower sensitivity of our assay and the paucity of tumoral cells in some AITL cases.

Immunohistochemical studies using tissue microarrays revealed a positivity for programmed cell death 1 (PD-1),³ phospho-extracellular signal-regulated kinase (p-ERK), p50, and p52 in 48.5% (66/136), 32.1% (41/136), 72.1% (98/136), and 59.6% (81/136) of patients, respectively. The presence of PD-1, nuclear p-ERK, or p52 expression was significantly positively correlated with the presence of *RHOA-G17V* ($P = .024$, 0.002, and 0.042, respectively).

There is a relationship between *RHOA* and Rac1 in which a high level of Rac activity leads to a reduction in that of ρ , and vice versa.⁴ Rac1 activity also activates multiple downstream effectors, including the NF- κ B, p38 mitogen-activated protein kinase, and mitogen-activated protein kinase kinase/extracellular signal-regulated kinase pathways.^{5,6} These findings are consistent with gene set enrichment analysis results, and some of them were validated by immunohistochemistry in an independent series of

patients. However, explanations involving other biological mechanisms cannot be ruled out.⁷

Although standard prognostic indices for this series (International Prognostic Index and Prognostic Index for PTCL-u) identified prognostic subgroup of patients (both indices, $P < .001$), the mutational status of the *RHOA* gene did not, either in the total group of all patients or after histologic subclassification (AITL vs PTCL-NOS) (Table 1 and supplemental Tables 2-3 available on the *Blood* Web site.).

We and other researchers have previously reported the usefulness of NF- κ B, phosphatidylinositol 3-kinase/AKT, and extracellular signal-regulated kinase pathway inhibitors for treating PTCL patients.^{8,9} The findings presented here suggest that *RHOA-G17V* could identify patients who are sensitive to some of these inhibitors. Further clinical and biological studies are needed to validate these results.

Rebeca Manso

Pathology Department, Fundación Jiménez Díaz,
Madrid, Spain

Margarita Sánchez-Beato

Oncohematology Area, Lymphoma Group, Medical Oncology Service,
Instituto Investigación Sanitaria
Puerta de Hierro-Majadahonda (IDIPHIM),
Madrid, Spain

Silvia Monsalvo

Haematology Department, Fundación Jiménez Díaz,
Madrid, Spain

Sagrario Gómez

Oncohematology Area, Lymphoma Group, Medical Oncology Service,
Instituto Investigación Sanitaria
Puerta de Hierro-Majadahonda (IDIPHIM),
Madrid, Spain

Laura Cereceda

Pathology Department, Hospital Universitario Marqués de Valdecilla,
Universidad de Cantabria,
Instituto de Formación e Investigación Marqués de Valdecilla,
Santander, Spain

Pilar Llamas

Haematology Department, Fundación Jiménez Díaz,
Madrid, Spain

Federico Rojo

Pathology Department, Fundación Jiménez Díaz,
Madrid, Spain

Manuela Mollejo

Pathology Department, Hospital Universitario Virgen de la Salud,
Toledo, Spain

Javier Menárguez

Pathology Department, Hospital Universitario Gregorio Marañón,
Madrid, Spain

Javier Alves

Pathology Department, Hospital Universitario "La Paz,"
Madrid, Spain

Mónica García-Cosío

Pathology Department, Hospital Universitario Ramón y Cajal,
Madrid, Spain

Table 1. Univariate analysis of the clinical and molecular parameters and the mutational status of the *RHOA* gene in the cohort of 121 patients with PTCLs

<i>RHOA</i>	Total cases	WT	MUT	P
DX	121/121			.016
AITL		48/73 (65.8%)	25/73 (34.2%)	
PTCL-NOS		41/48 (85.4%)	7/48 (14.6%)	
p-ERK	121/121			.002
Negative		70/86 (81.4%)	16/86 (18.6%)	
Positive		19/35 (54.3%)	16/35 (45.7%)	
p50	118/121			.166
Negative		25/30 (83.8%)	5/30 (16.7%)	
Positive		62/88 (70.5%)	26/88 (29.5%)	
p52	117/121			.042
Negative		34/40 (85%)	6/40 (15%)	
Positive		52/77 (67.5%)	25/77 (32.5%)	
NF-κB	119/121			.068
None		16/18 (88.9%)	2/18 (11.1%)	
p50 or p52		30/37 (81.1%)	7/37 (18.9%)	
Both		42/64 (65.6%)	22/64 (34.4%)	
PD-1	88/121			.024
Negative		24/27 (88.9%)	3/27 (11.1%)	
Positive		40/61 (65.6%)	21/61 (34.4%)	
Sex	117/121			.064
Male		47/69 (68.1%)	22/69 (31.9%)	
Female		40/48 (83.3%)	4/48 (16.7%)	
Age at diagnosis	114/121			.453
<60 y		33/42 (78.6%)	9/42 (21.4%)	
≥60 y		52/72 (72.2%)	20/72 (27.8%)	
IPI	106/121			.560
Low risk		26/32 (81.2%)	6/32 (18.8%)	
Low-intermediate risk		18/27 (66.7%)	9/27 (33.3%)	
High-intermediate risk		19/26 (73.1%)	7/26 (26.9%)	
High risk		14/21 (66.7%)	7/21 (33.3%)	
PIT	94/121			.962
Low risk		10/14 (71.4%)	4/14 (28.6%)	
Low-intermediate risk		26/35 (74.3%)	9/35 (25.7%)	
High-intermediate risk		15/22 (68.2%)	7/22 (31.8%)	
High risk		16/23 (69.6%)	7/23 (30.4%)	
ECOG	102/121			.479
<1		53/72 (73.6%)	19/72 (26.4%)	
≥1		20/30 (66.7%)	10/30 (33.3%)	
Treatment	106/121			.068
CHOP/CHOP-like		61/76 (80.3%)	15/76 (19.7%)	
Others		19/30 (63.3%)	11/30 (36.7%)	
Response	96/121			.446
CR		44/61 (72.1%)	17/61 (27.9%)	
PR		13/15 (86.7%)	2/15 (13.3%)	
No response		16/20 (80%)	4/20 (20%)	
Recurrence	94/121			.660
No		50/66 (75.8%)	16/66 (24.2%)	
Yes		20/28 (71.4%)	8/28 (28.6%)	
State of the patient	112/121			.615
Dead		50/69 (72.5%)	19/69 (27.5%)	
Alive		33/43 (76.7%)	10/43 (23.3%)	

CHOP, cyclophosphamide, vincristine, doxorubicin, prednisone; CR, total response; DX, diagnosis; ECOG, Eastern Cooperative Oncology Group; IPI, International Prognostic Index; MUT, mutated; PIT, Prognostic Index for PTCL-u; PR, partial response; WT, wild type.

Miguel A. Piris

Pathology Department, Hospital Universitario Marqués de Valdecilla, Universidad de Cantabria, Instituto de Formación e Investigación Marqués de Valdecilla, Santander, Spain

Socorro M. Rodríguez-Pinilla

Pathology Department, Fundación Jiménez Díaz, Madrid, Spain

M.A.P. and S.M.R.-P. contributed equally to this study.

The online version of this article contains a data supplement.

Acknowledgments: We are indebted to the patients who contributed to this study.

This work was supported by grants from the Asociación Española contra el Cáncer (AECC), the Spanish Ministerio de Educación y Ciencia (SAF2008-03871), Fondos de Investigación Sanitaria (RD06/0020/0107, RD012/0036/0060 and PI10/00621), and the Sociedad para el Desarrollo Regional de Cantabria (Gobierno de Cantabria-SODERCAN). We acknowledge the biobanks of the Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas, Instituto de Formación e Investigación Marqués de Valdecilla-Hospital Universitario Marqués de Valdecilla (RD09/0076/00076), and Fundación Jiménez Díaz (RD09/0076/00101) for their help in collecting the samples. R.M. is supported by the Fundación Conchita Rábago de Jiménez Díaz, Madrid (Spain), and M.S.-B. is supported by Miguel Servet contract CP11/00018.

Contribution: M.A.P. designed and supervised the study and reviewed the manuscript; S.M.R.-P. designed and supervised the study, evaluated the histology and immunohistochemistry, and reviewed the paper; R.M. performed the experiments, analyzed and interpreted the data, and wrote the paper; M.S.-B. performed the experiments and edited the manuscript; S.G. performed the experiments; S.M. and P.L. supplied patients' clinical data; and F.R., M.M., J.M., J.A., and M.G.-C. provided the samples.

Conflict-of-interest disclosure: The authors declare no competing financial interests.

Correspondence: Socorro M. Rodríguez-Pinilla, Pathology Department, Fundación Jiménez Díaz, Avd Reyes Católicos, 2-28040 Madrid, Spain; e-mail: smrodriguez@fjd.es.

References

- Palomero T, Couronné L, Khiabani H, et al. Recurrent mutations in epigenetic regulators, *RHOA* and *FYN* kinase in peripheral T cell lymphomas. *Nat Genet*. 2014;46(2):166-170.
- Sakata-Yanagimoto M, Enami T, Yoshida K, et al. Somatic *RHOA* mutation in angioimmunoblastic T cell lymphoma. *Nat Genet*. 2014;46(2):171-175.
- Roncador G, García Verdes-Montenegro JF, Tedoldi S, et al. Expression of two markers of germinal center T cells (*SAP* and *PD-1*) in angioimmunoblastic T-cell lymphoma. *Haematologica*. 2007;92(8):1059-1066.
- Sander EE, ten Klooster JP, van Delft S, van der Kammen RA, Collard JG. Rac downregulates Rho activity: reciprocal balance between both GTPases determines cellular morphology and migratory behavior. *J Cell Biol*. 1999;147(5):1009-1022.
- Murga C, Zohar M, Teramoto H, Gutkind JS. Rac1 and RhoG promote cell survival by the activation of PI3K and Akt, independently of their ability to stimulate JNK and NF-κB. *Oncogene*. 2002;21(2):207-216.
- Flevaris P, Li Z, Zhang G, Zheng Y, Liu J, Du X. Two distinct roles of mitogen-activated protein kinases in platelets and a novel Rac1-MAPK-dependent integrin outside-in retractile signaling pathway. *Blood*. 2009;113(4):893-901.
- Yan ZX, Wu LL, Xue K, et al. MicroRNA187 overexpression is related to tumor progression and determines sensitivity to bortezomib in peripheral T-cell lymphoma [published online ahead of print October 9, 2013]. *Leukemia*.
- Martín-Sánchez E, Rodríguez-Pinilla SM, Sánchez-Beato M, et al. Simultaneous inhibition of pan-phosphatidylinositol-3-kinases and MEK as a potential therapeutic strategy in peripheral T-cell lymphomas. *Haematologica*. 2013;98(1):57-64.
- Odqvist L, Sánchez-Beato M, Montes-Moreno S, et al. NIK controls classical and alternative NF-κB activation and is necessary for the survival of human T-cell lymphoma cells. *Clin Cancer Res*. 2013;19(9):2319-2330.

Recurrent presence of the PLCG1 S345F mutation in nodal peripheral T-cell lymphomas

Peripheral T-cell lymphomas (PTCLs) are a group of non-Hodgkin lymphomas (NHLs) with heterogeneous clinical presentation, histology, response to treatment and outcome, whose genetic background is still poorly understood. Patients with PTCL are usually treated with CHOP or more intensive regimens, generally with minimal effectiveness, thus highlighting the need for new therapeutic strategies.¹

Several findings suggest that the survival of normal and, frequently, neoplastic T cells depends upon T-cell receptor (TCR) signaling.² The t(5;9)(q33;q22), which results in an ITK-SYK fusion transcript, has been described in PTCL and angioimmunoblastic T-cell lymphoma (AITL). Moreover, transgenic mice with this translocation display chronic proximal TCR signaling, culminating in T-cell lymphomas that could be inhibited by treatment with SYK-inhibitors.^{2,3} SYK is also over-expressed in almost 90% of nodal-PTCLs (n-PTCL) and mutated in other PTCL-specific subtypes.⁴ In addition, Palomero *et al.*⁵ have recently reported activating mutations in FYN tyrosine kinase, another SRC family kinase found in T lymphocytes that has an important role in T-cell activation upon TCR stimulation. Recently, the relevance of several mutated genes (*TET2*, *IDH2*, *DNMT3A*, *RHOA*) in T-cell lymphoma pathogenesis has become apparent.⁵⁻⁷

Nevertheless, as gene expression array studies have shown, not all PTCLs depend on TCR signaling.⁸ De Leval *et al.* classified PTCL cases according to gene signatures associated with CD30 expression or T-cell activation/TCR-signaling.⁸ Moreover, several authors have confirmed an inverse correlation between the levels of expression of CD30 and TCR genes.⁹

The TCR is a multimeric complex that is expressed on the cell surface in association with four CD3 molecules. Upon receptor ligation, two tyrosine residues are rapidly phosphorylated by a member of the src-family protein tyrosine kinase (PTK), transforming them into high-affinity ligands for Syk PTKs. The co-ordinated actions of Src and Syk PTK initiate a cascade of signals that ultimately leads to cell proliferation, cytokine secretion and effector functions. Nevertheless, the resulting increase in intracellular calcium concentration ($[Ca^{2+}]_i$), occurring partly as a result of phosphorylating and activating phospholipase C- γ 1 (PLCG1),¹⁰ is critical for TCR stimulation. Activated PLCG1 generates the second messenger inositol 1,4,5-trisphosphate (IP3) and diacylglycerol (DAG) from the hydrolysis of phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate (PIP2). Whereas IP3 mediates the elevation of $[Ca^{2+}]_i$, which is essential for activating the nuclear factor of activated T cells (NFAT),¹¹ DAG activates the Ras-ERK pathway¹² and protein kinase C (PKC), which mediates the activation of NF- κ B.¹³

A recurrent mutation in the *PLCG1* gene encoding a protein with p.Ser345Phe alteration (S345F) has recently been identified that affects the PLC α protein catalytic domain in approximately 20% of cutaneous T-cell lymphomas (CTCLs),¹⁴ and a similar finding has been reported for one AITL case.¹⁵ Functional studies showed that PLCG1 mutants could increase NFAT activity and were highly sensitive to calcineurin inhibitors.¹⁴

Due to the importance of the TCR pathway in PTCL, and because PLCG1 is a critical mediator of TCR signaling, we decided to explore the frequency and biological relevance of this PLCG1-S345F mutation in n-PTCL patients.

Table 1. Statistical analysis of the clinical and molecular parameters and the mutational status of the *PLCG1* gene in the cohort of 101 patients with PTCLs.

	Clinical and molecular parameters			
	N. of cases (%)	WT	MUT	P
N	101	88	13	
DX	101	88	13	0.662
AITL	60 (59.4%)	53 (60.2%)	7 (53.8%)	
PTCL-NOS	41 (40.6%)	35 (39.8%)	6 (46.2%)	
Sex	98	85	13	0.525
Male	60 (61.2%)	51 (60%)	9 (69.2%)	
Female	38 (38.8%)	34 (40%)	4 (30.8%)	
Age at diagnosis	96	83	13	0.212
<60 years	30 (31.2%)	24 (28.9%)	6 (46.2%)	
≥60 years	66 (68.8%)	59 (71.1%)	7 (53.8%)	
IPI	87	74	13	0.829
Low risk	28 (32.2%)	23 (31.3%)	5 (38.5%)	
Low-intermediate risk	22 (25.3%)	19 (25.7%)	3 (23.1%)	
High-intermediate risk	21 (24.1%)	19 (25.7%)	2 (15.4%)	
High risk	16 (18.4%)	13 (17.6%)	3 (23.1%)	
PIT	76	64	12	0.504
Low risk	11 (14.5%)	10 (15.6%)	1 (8.3%)	
Low-intermediate risk	28 (36.8%)	25 (39.1%)	3 (25%)	
High-intermediate risk	22 (28.9%)	18 (28.1%)	4 (33.3%)	
High risk	15 (19.7%)	11 (17.2%)	4 (33.3%)	
ECOG	83	70	13	0.346
<1	60 (72.3%)	52 (74.3%)	8 (61.5%)	
≥1	23 (27.7%)	18 (25.7%)	5 (38.5%)	
Treatment	85	75	10	0.278
CHOP/CHOP-LIKE	63 (74.1%)	57 (76%)	6 (60%)	
Others	22 (25.9%)	18 (24%)	4 (40%)	
Response	81	69	12	0.280
CR	51 (63%)	45 (65.2%)	6 (50%)	
PR	16 (19.8%)	14 (20.3%)	2 (16.7%)	
No response	14 (17.3%)	10 (14.5%)	4 (33.3%)	
Recurrence	75	64	11	0.644
No	50 (66.7%)	42 (65.6%)	8 (72.7%)	
Yes	25 (33.3%)	22 (34.4%)	3 (27.3%)	
Patient status	93	80	13	0.212
Dead	57 (61.3%)	47 (58.8%)	10 (76.9%)	
Alive	36 (38.7%)	33 (41.2%)	3 (23.1%)	
NFATc1	95	83	12	0.754
Negative	28 (29.5%)	24 (28.9%)	4 (33.3%)	
Positive	67 (70.5%)	59 (71.1%)	8 (66.7%)	
P50	98	85	13	0.027
Negative	24 (24.5%)	24 (28.2%)	0 (0%)	
Positive	74 (75.5%)	61 (71.8%)	13 (100%)	
P52	97	84	13	0.294
Negative	35 (36.1%)	32 (38.1%)	3 (23.1%)	
Positive	62 (63.9%)	52 (61.9%)	10 (76.9%)	
P-ERK	102	89	13	0.975
Negative	71 (69.6%)	62 (69.7%)	9 (69.2%)	
Positive	31 (30.4%)	27 (30.3%)	4 (30.8%)	
CD30	94	81	13	<0.001
Negative	77 (81.9%)	71 (87.7%)	6 (46.2%)	
Positive	17 (18.1%)	10 (12.3%)	7 (53.8%)	
Ki67	100	87	13	0.148
Negative	78 (78%)	70 (80.5%)	8 (61.5%)	
Positive	22 (22%)	17 (19.5%)	5 (38.5%)	
CD3	94	81	13	0.148
Negative	6 (6.4%)	4 (4.9%)	2 (15.4%)	
Positive	88 (93.6%)	77 (95.1%)	11 (84.6%)	

DX: diagnosis; AITL: angioimmunoblastic T-cell lymphoma; PTCL-NOS: peripheral T-cell lymphoma not specified; WT: wild type; MUT: mutated; IPI: International Prognostic Index; PIT: Prognostic Index for PTCL; ECOG: Eastern Cooperative Oncology Group; CHOP: cyclophosphamide, vincristine, doxorubicin, prednisone; CR: total response; PR: partial response.

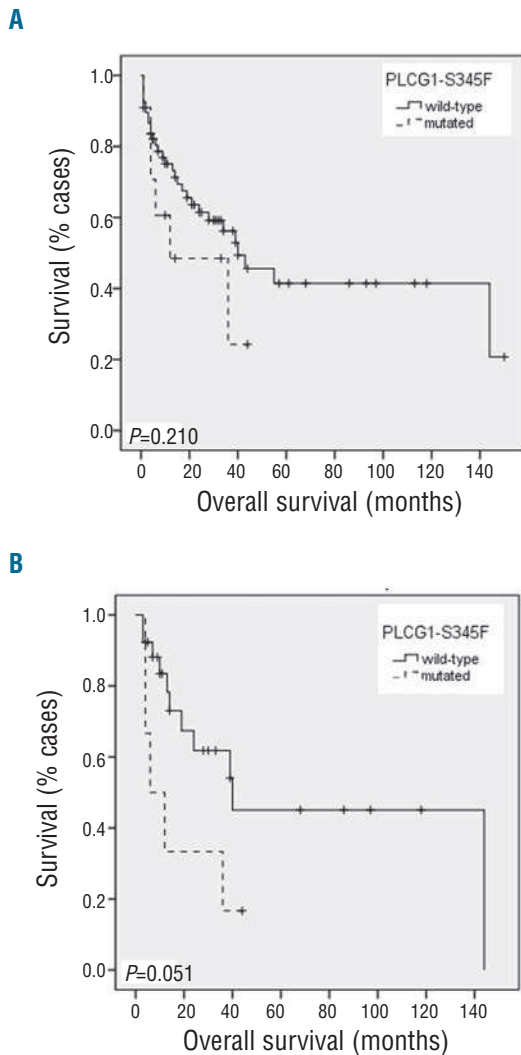


Figure 1. Kaplan-Meier survival curves for PLCG1 mutated and wild-type patients. (A) Whole cohort of nodal-PTCL. (B) PTCL-NOS subgroup.

We first examined the presence of the PLCG1-S345F mutation in a series of 101 formalin-fixed, paraffin-embedded (FFPE) PTCLs samples including 60 AITL and 41 peripheral T-cell lymphoma not otherwise specified (PTCL-NOS). Clinical data for the patients and some mutational and GEP data have been reported in two previous studies^{6,9} (see *Online Supplementary Appendix* for further information).

First, DNA was extracted from tumor from the FFPE samples of this group of patients. The PLCG1-S345F mutation was analyzed using two independent techniques, as previously reported¹⁴ (*Online Supplementary Appendix*). Only those cases found to be positive by both techniques were considered as mutated. All experiments were carried out blinded with respect to the clinical data.

The PLCG1-S345F mutation was found in 12.9% of the patients (13 of 101 PTCLs), comprising 11.7% (7 of 60) of AITL and 14.6% (6 of 41) of PTCL-NOS patients (Table 1), of whom 1 of 6 showed AITL-features. Interestingly, no correlation was found between the presence of *RHOA* and *PLCG1* mutation in this series (*data not shown*).

We analyzed the association of *PLCG1* mutation with clinical data, and found no clear association between the

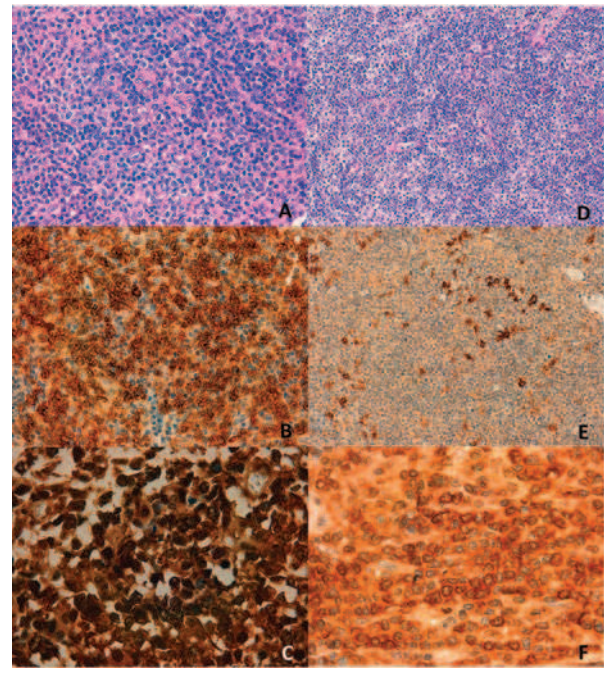


Figure 2. Representative images corresponding to a PLCG1-mutated (A-C) and a non-mutated (D-F) case, respectively. (A and D) H&E staining. (B and E) CD30 IHC detection showing positivity in the mutated case (B) versus the lack of expression in the tumoral cells in the PLCG1-wt case. Scarce CD30-positive blasts could be seen (E). (C and F) p50 immunoreactivity. p50 shows a clear nuclear expression in the mutated case (C) whereas its expression is restricted to the cytoplasm in the non-mutated case (F).

PLCG1 mutation and overall survival (OS) or other prognostic factors in the whole series; however, we found that PLCG1-mutated PTCL-NOSs showed a lower OS (log rank $\chi^2=3.81$; $P=0.05$) (Figure 1). There was also an association with response to treatment ($P=0.08$) that narrowly failed to reach statistical significance, probably as a consequence of the small sample (*Online Supplementary Tables S1 and S2*).

Tissue micro arrays (TMA) were also constructed from FFPE samples and TMA sections were stained by the Endvision method with a heat-induced antigen-retrieval step for CD3, CD30, NFATc1, Ki67, p-ERK antibodies and NF-KB subunits for the classic and alternative NF-KB pathways, p50 and p52, respectively. Cases were considered positive for each marker following previously reported cut-off values for each.^{6,9,14} Reactive tonsil tissue was included as a control. The primary antibodies were omitted to provide negative controls (*Online Supplementary Appendix and Online Supplementary Table S3*).

Immunohistochemical studies revealed positivity for CD3 in 87.1% (88 of 101), CD30 in 16.8% (17 of 101) and Ki67 in 21.8% (22 of 101) of the cases. Nuclear immunostaining for NFATc1, p-ERK, p50 and p52 was found in 66.3% (67 of 101), 29.7% (30 of 101), 73.3% (74 of 101) and 61.4% (62 of 101) of the cases, respectively.

No significant correlation was found between the presence of the PLCG1-S345F mutation and NFATc1 expression, although 66.7% of the mutated cases (8 of 12) were positive. This figure is lower than the 81.8% previously reported for CTCLs. Overexpression of NFAT in non-mutated cases could be explained by the presence of a preserved TCR/CD3 pathway in this subgroup of tumors. On the other hand, a direct statistically significant relationship was found between the presence of the PLCG1-S345F

mutation and both CD30 [7 out of 13 mutated cases (53.8%) expressed CD30 vs. 10 out of 81 [(12.3%) of the non-mutated cases; $P < 0.001$] and p50 [(13 out of 13 mutated cases (100%)] showed p50 nuclear expression; $P = 0.027$] (Table 1 and Figure 2). Analyzing this in greater depth, with respect to the histological type diagnosed, we found that the statistical relationship with CD30 was maintained in the PTCL-NOS and AITL groups (Online Supplementary Tables S1, S2 and S4). Increased signaling from mutated PLCG1, associated with increased NF- κ B activity and CD30 expression, could theoretically replace the survival signaling from T-cell receptor. These data are consistent with previously published data showing that CD30 and TCR signaling are mutually exclusive in PTCL.^{8,9}

These findings are of potential therapeutic relevance, since PLC and NF- κ B inhibition and CD30-targeted treatments could be explored for PLCG1-mutated cases, thereby contributing to the selection of targeted treatment based on the molecular features of the tumors.

Rebeca Manso,[#] Socorro M. Rodríguez-Pinilla,[#] Julia González-Rincón,² Sagrario Gómez,² Silvia Monsalvo,³ Pilar Llamas,³ Federico Rojo,⁴ David Pérez-Callejo,² Laura Cereceda,⁴ Miguel A. Limeres,⁵ Carmen Maeso,⁶ Lucía Ferrando,⁷ Carlos Pérez-Seoane,⁸ Guillermo Rodríguez,⁸ José M. Arrinda,⁹ Federico García-Bragado,¹⁰ Renato Franco,¹¹ José L. Rodríguez-Peraltó,¹² Joaquín González-Carrero,¹³ Francisco Martín-Dávila,¹⁴ Miguel A. Piris,^{4*} and Margarita Sánchez-Beato^{2*}

[#]RM and SMR-P contributed equally to this manuscript.

*Senior authors.

¹Pathology Department, IIS-Fundación Jiménez Díaz, UAM, Madrid, Spain; ²Group of Research in Lymphoma, (Medical Oncology Service), Oncohematology Area, IIS Puerta de Hierro-Majadahonda (IDIPHIM), Madrid, Spain; ³Haematology Department, IIS-Fundación Jiménez Díaz, UAM, Madrid, Spain; ⁴Pathology Department, Hospital U. Marqués de Valdecilla, IDIVAL, Santander, Spain; ⁵Pathology Department, Hospital U. Canarias Dr. Negrín, Gran Canaria, Canarias, Spain; ⁶Pathology Department, CMI Nuestra Señora de la Candelaria, Sta. Cruz de Tenerife, Spain; ⁷Pathology Department, Hospital San Pedro de Alcántara, Cáceres, Spain; ⁸Pathology Department, Hospital Reina Sofía, Córdoba, Spain; ⁹Pathology Department, Hospital del Bidasoa, Guipúzcoa, Spain; ¹⁰Pathology Department, Hospital Virgen del Camino, Pamplona, Spain; ¹¹Pathology Department, Istituto Nazionale Tumori IRCSS – Fondazione Pascal, Napoli, Italy; ¹²Pathology Department, Hospital U. 12 de octubre, Madrid, Spain; ¹³Pathology Department, Complejo Hospitalario U. de Vigo, Pontevedra, Spain; ¹⁴Pathology Department, Hospital General de Ciudad Real, Spain.

Correspondence: msbeato@idiphim.org
doi:10.3324/haematol.2014.113696

Acknowledgments: We are indebted to the patients who contributed to this study, and to the hospitals who supplied the samples. We acknowledge the Biobanks of the CNIO (RD09/0076/00113), IDIVAL-HUMV (RD09/0076/00076), HU 12 de Octubre (RD09/0076/00118), CHUVI (RD09/0076/00011) and FJD (RD09/0076/00101) for their help in collecting the samples.

Funding: This work was supported by grants from Asociación Española contra el Cáncer (AECC), Ministerio de Economía y Competitividad (MINECO) (SAF2013-47416-R), Instituto Salud Carlos III (ISCIII) – Fondos FEDER, MINECO-AES

(RD012/0036/0060, PI10/00621, CP11/00018). RM is supported by the Fundación Conchita Rábago de la Fundación Jiménez Díaz, Madrid (Spain). JG-R is supported by a predoctoral grant from the Fundación Investigación Biomedica Puerta de Hierro. Salary support to SG is provided by ISCIII-FEDER (CP11/00018). MS-B is supported by a Miguel Servet contract from ISCIII-FEDER (CP11/00018). The Instituto de Investigación Marqués de Valdecilla (IDIVAL) is partly funded by the Sociedad para el Desarrollo Regional de Cantabria (SODERCAN).

The online version of this article has a Supplementary Appendix.

Key words: PLCG1, peripheral T-cell lymphomas.

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

References

- Escalon MP, Liu NS, Yang Y, Hess M, Walker PL, Smith TL, et al. Prognostic factors and treatment of patients with T-cell non-Hodgkin lymphoma: the M. D. Anderson Cancer Center experience. *Cancer*. 2005;103(10):2091-8.
- Serwold T, Hochedlinger K, Swindle J, Hedgpeth J, Jaenisch R, Weissman IL. T-cell receptor-driven lymphomagenesis in mice derived from a reprogrammed T cell. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2010; 107(44):18939-43.
- Dierks C, Adrian F, Fisch P, Ma H, Maurer H, Herchenbach D, et al. The ITK-SYK fusion oncogene induces a T-cell lymphoproliferative disease in mice mimicking human disease. *Cancer Res*. 2010; 70(15):6193-204.
- Feldman AL, Law M, Grogg KL, Thorland EC, Fink S, Kurtin PJ, et al. Incidence of TCR and TCL1 gene translocations and isochromosome 7q in peripheral T-cell lymphomas using fluorescence in situ hybridization. *Am J Clin Pathol*. 2008;130(2):178-85.
- Palomero T, Couronne L, Khiabani H, Kim MY, Ambesi-Impimbato A, Perez-Garcia A, et al. Recurrent mutations in epigenetic regulators, RHOA and FYN kinase in peripheral T cell lymphomas. *Nat Genet*. 2014;46(2):166-70.
- Manso R, Sanchez-Beato M, Monsalvo S, Gomez S, Cereceda L, Llamas P, et al. The RHOA G17V gene mutation occurs frequently in peripheral T-cell lymphoma and is associated with a characteristic molecular signature. *Blood*. 2014;123(18):2893-4.
- Sakata-Yanagimoto M, Enami T, Yoshida K, Shiraishi Y, Ishii R, Miyake Y, et al. Somatic RHOA mutation in angioimmunoblastic T cell lymphoma. *Nat Genet*. 2014;46(2):171-5.
- de Leval L, Rickman DS, Thielen C, Reynies A, Huang YL, Delsol G, et al. The gene expression profile of nodal peripheral T-cell lymphoma demonstrates a molecular link between angioimmunoblastic T-cell lymphoma (AITL) and follicular helper T (TFH) cells. *Blood*. 2007;109(11):4952-63.
- Rodríguez-Pinilla SM, Sanchez ME, Rodriguez J, Garcia JF, Sanchez-Espiridion B, Lamana LF, et al. Loss of TCR-beta F1 and/or EZRIN expression is associated with unfavorable prognosis in nodal peripheral T-cell lymphomas. *Blood Cancer J*. 2013;3:e111.
- Qi Q, August A. Keeping the (kinase) party going: SLP-76 and ITK dance to the beat. *Sci STKE*. 2007;2007(396):pe39.
- Rao A, Luo C, Hogan PG. Transcription factors of the NFAT family: regulation and function. *Annu Rev Immunol*. 1997;15:707-47.
- Roose JP, Mollenauer M, Gupta VA, Stone J, Weiss A. A diacylglycerol-protein kinase C-RasGRP1 pathway directs Ras activation upon antigen receptor stimulation of T cells. *Mol Cell Biol*. 2005; 25(11):4426-41.
- Sun Z, Arendt CW, Ellmeier W, Schaeffer EM, Sunshine MJ, Gandhi L, et al. PKC-theta is required for TCR-induced NF-kappaB activation in mature but not immature T lymphocytes. *Nature*. 2000;404(6776):402-7.
- Vaque JF, Gomez-Lopez G, Monsalve V, Varela I, Martinez N, Perez C, et al. PLCG1 mutations in cutaneous T-cell lymphomas. *Blood*. 2014;123(13):2034-43.
- Yoo HY, Sung MK, Lee SH, Kim S, Lee H, Park S, et al. A recurrent inactivating mutation in RHOA GTPase in angioimmunoblastic T cell lymphoma. *Nat Genet*. 2014;46(4):371-5.

C-MYC is related to GATA3 expression and associated with poor prognosis in nodal peripheral T-cell lymphomas

Peripheral T-cell lymphomas (PTCLs) are a heterogeneous group of non-Hodgkin lymphomas (NHLs), characterized by aggressive clinical behavior. Nodal PTCL (n-PTCL) includes four disorders: angioimmunoblastic T-cell lymphoma (AITL), peripheral T-cell lymphoma not otherwise specified (PTCL-NOS) and anaplastic large cell lymphoma (ALCL) (ALK-positive and ALK-negative forms). While AITL and ALCL both have their own particular morphological and phenotypic features, n-PTCL-NOS comprises a variety of peripheral T-cell lymphomas. Recently, gene expression studies have identified three subgroups of PTCL-NOS that have prognostic implications. One is characterized by the overexpression of TBX21 and a better outcome, and the other two, which have a worse prognosis, have either cytotoxic markers or GATA3 overexpression.¹

Iqbal *et al.*¹ found the GATA3-positive subgroup of tumors to be enriched in *MYC* and proliferation gene signatures, amongst others. *MYC* is one of the most frequently dysregulated oncogenes in cancer and is critical to the development of mature PTCLs.²

In an attempt to validate these findings, we investigated the potential relationship between the presence of C-MYC, GATA3 and a high level of Ki-67 expression in paraffin-embedded tumoral tissue in a series of 128 n-PTCL patients (including 74 AITL and 54 PTCL-NOS) using tissue microarrays (TMAs) (Online Supplementary Information and Online Supplementary Table S1). Cut-off values for these three markers were based on previous reports^{1,3-5} (Online Supplementary Information).

We found positivity for C-MYC in 13.3% (17/128), and a high level of Ki-67 expression in 24.2% (31/128) of the cases analyzed. In this study, GATA3 expression was observed in 21.9% (28/128) of the n-PTCL cases; 20.3% (15/74) of the AITLs and 24.1% (13/54) of the PTCL-NOS patients were positive (Online Supplementary Table S2). Previous studies had reported GATA3 expression in 33%¹ and 45%⁴ of the PTCL-NOS patients. Differences in the percentages of positivity may have been due to the different sources of the antibody used (ABCAM vs. Santa Cruz Biotechnology), or to differences in case selection criteria.

Significant positive associations were found between the expression of C-MYC and the presence of both Ki-67 ($P<0.001$) and GATA3 ($P=0.010$) (Table 1), but no significant correlation was found between the expression of Ki-67 and GATA3 ($P=0.754$) (Table 1). Furthermore, C-MYC and Ki-67 expression conferred poor overall survival (OS) on these patients, as indicated by the univariate analyses ($P=0.003$ and $P=0.006$, respectively) (Figure 1A). C-MYC

was an independent prognostic factor in the multivariate analysis ($P=0.004$).

In the present series, the International Prognostic Index (IPI) and the Prognostic Index for T-cell lymphoma (PIT) were both related to prognosis (*data not shown*). Cases with a high IPI, PIT or Eastern Cooperative Oncology Group (ECOG) performance status score tended to have a higher percentage of C-MYC staining ($P=0.053$, $P=0.001$, and $P=0.008$, respectively) (Online Supplementary Table S3). On the other hand, no significant correlation of Ki-67 and GATA3 expression was found with any clinical characteristic analyzed (Online Supplementary Table S4 and S5). As expected, in the multivariate analysis of the clinical (IPI and PIT) and biological variables (C-MYC and Ki-67), the Cox regression model identified only PIT as an independent prognostic factor of disease-specific OS ($P<0.001$).

In the present series, C-MYC was expressed in the AITL and PTCL-NOS tumor subgroups. The correlation between C-MYC and Ki-67 was maintained in AITL patients ($P=0.007$); on the other hand, a significant positive association was found between the expression of C-MYC and the presence of both Ki-67 ($P=0.001$) and GATA3 ($P=0.004$) in the PTCL-NOS subgroup. In addition, the presence of C-MYC and Ki-67 conferred poor prognosis exclusively on the AITL patient subgroup ($P=0.008$ and $P=0.021$, respectively) (Figure 1B), while the presence of GATA3 conferred poor prognosis on the PTCL-NOS patients ($P=0.046$) (Figure 1C). In the multivariate analysis, the Cox regression again identified IPI as an independent prognostic factor of disease-specific OS in both histological tumor subtypes.

Considering patients by separate PIT risk subgroups indicated that only C-MYC maintained its prognostic implication in the low-risk PIT subgroup of AITL patients (Figure 2). Nevertheless, these results should be interpreted with caution, given the very small number of cases in this subgroup.

MYC is known to be activated by the loss of *SNF5* (SMARCB1),² overexpression of microRNA187,⁵ and by its own gene amplification or translocation, thereby favoring the rapid appearance of T-cell neoplasms in humans.⁶ Since C-MYC is involved in cell proliferation,⁷ the significantly positive relationship between C-MYC expression and proliferation index is not surprising. In the present series, the presence of C-MYC and Ki-67 were both independent prognostic markers in the univariate analysis. Moreover, the significance of the C-MYC marker was also significant in the AITL tumor subgroup. Their significance was not maintained when classic clinical variables were included in the multivariate analysis, although a poor prognosis subgroup of patients within the low-risk PIT subgroup of AITL patients was identified. Previous gene expression studies had identified *MYC* as being overexpressed in AITL, adult T-cell

Table 1.

	n-PTCL			AITL			PTCL-NOS		
	C-MYC	Ki-67	GATA3	C-MYC	Ki-67	GATA3	C-MYC	Ki-67	GATA3
C-MYC	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ki-67	<0.001	-	0.754	0.007	-	0.307	0.001	-	0.046
GATA3	0.010	0.754	-	0.251	0.307	-	0.004	0.111	-

leukemia/lymphoma, and ALCL cases.^{1,8} Moreover, C-MYC overexpression is known to be related to a high proliferation index and poor clinical outcome in ALCL.⁹ Cuadros *et al.*¹⁰ identified a poor prognosis signature related to proliferation using gene expression studies. Went *et al.*¹¹ associated a high level of Ki-67 expression with PTCL-NOS patient outcome when associated with clinical

parameters in the design of a new prognostic index called mPIT (modified Prognostic Index for T-cell lymphoma). Weisenburger *et al.*¹² found that Ki-67 expression conferred poor prognosis on PTCL-NOS patients, while our group³ and Federico *et al.*¹³ identified this proliferation rate as a prognostic factor in AITL patients. Recently, gene expression studies^{1,4} have shown that a specific sub-

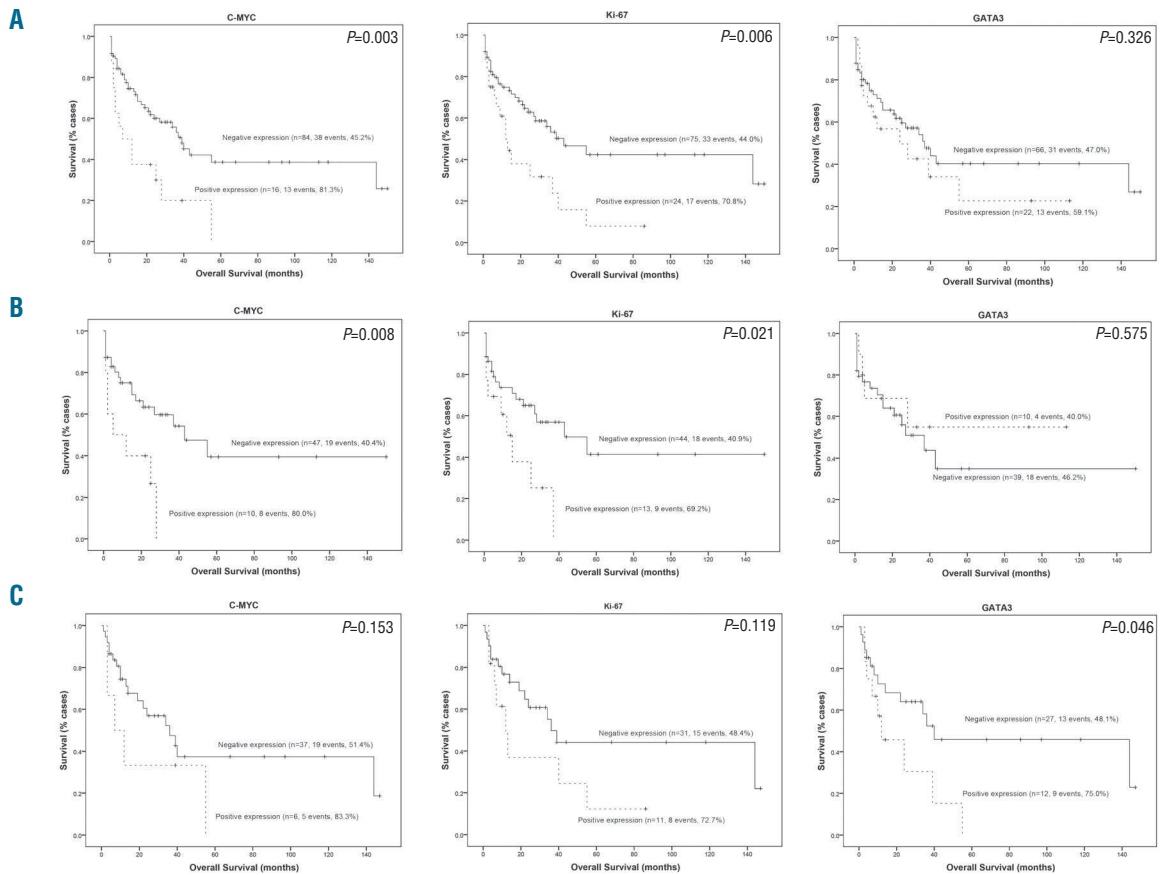


Figure 1. Kaplan-Meier survival curves of biological marker expression in the complete series (A) of n-PTCL patients and in the AITL (B) and PTCL-NOS (C) histological subgroups.

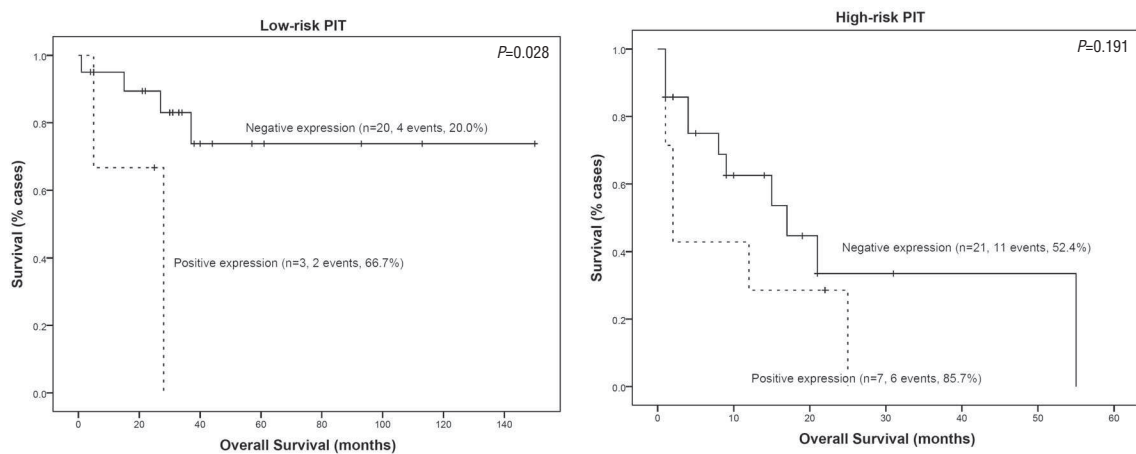


Figure 2. Kaplan-Meier survival curves of C-MYC expression in the AITL subgroup of patients in the low-risk and high-risk PIT subgroups.

group of PTCL-NOS is characterized by a high level of expression of GATA3 and poor prognosis. GATA3 and C-MYC regulate each other's expression in a manner that is not well understood, although they are critical to promoting both proliferation and differentiation of T cells.^{14,15} In this study, we used gene expression arrays to validate the correlation between C-MYC and GATA3 expression proposed by Iqbal *et al.*¹ The correlation was exclusively maintained in the PTCL-NOS subgroup when considering patients with respect to morphological and phenotypic characteristics. GATA3 expression was of prognostic value in the PTCL-NOS subgroup of tumors, but not in the AITL patients.

Together, these findings validate the relevance of MYC^{2,5,6} expression in PTCLs, and suggest a specific pathogenic role of this protein in different subgroups of n-PTCLs that warrants further investigation. Additionally, C-MYC expression identifies a group of high-risk AITL patients who would otherwise be considered to be of low-intermediate risk on the basis of their PIT score. However, these results require confirmation in an independent series of n-PTCL patients.

Rebeca Manso,¹ Carmen Bellas,² Paloma Martín-Acosta,² Manuela Mollejo,³ Javier Menárguez,⁴ Federico Rojo,⁴ Pilar Llamas,⁵ Miguel A. Piris,⁶ and Socorro M. Rodríguez-Pinilla¹

¹Pathology Department, Fundación Jiménez Díaz, UAM, Madrid; ²Pathology Department, Hospital Universitario Puerta de Hierro, Madrid; ³Pathology Department, Hospital Universitario Virgen de la Salud, Toledo; ⁴Pathology Department, Hospital Universitario Gregorio Marañón, Madrid; ⁵Haematology Department, Fundación Jiménez Díaz, UAM, Madrid; and ⁶Pathology Department, Hospital Universitario Marqués de Valdecilla, Universidad de Cantabria, IDIVAL, Santander, Spain

Correspondence: smrodriguez@fjd.es
doi:10.3324/haematol.2016.143768

Acknowledgments: we are indebted to the patients who contributed to this study and to the hospitals that supplied the samples. We acknowledge the staff of the Biobanks of the CNIO (RD09/0076/00113), IDIVAL-HUMV (RD09/0076/00076), Hospital Universitario 12 de Octubre (RD09/0076/00118), CHUVI (RD09/0076/00011) and FJD (PT13/0010/0012) for their help in collecting the samples, especially Laura Cereceda.

Funding: this study was supported by grants from the Asociación Española contra el Cáncer (AECC), Ministerio de Economía y Competitividad (MINECO) (SAF2013-47416-R), Instituto Salud Carlos III (ISCIII) – Fondos de Investigación Sanitaria (RD06/0020/0107, RD012/0036/0060 and FIS11/1759). The Instituto de Investigación Marqués de Valdecilla (IDIVAL) is partly funded by the Sociedad para el Desarrollo Regional de Cantabria (SODERCAN).

Key words: C-MYC, GATA3, PTCL.

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

References

- Iqbal J, Wright G, Wang C, et al. Gene expression signatures delineate biological and prognostic subgroups in peripheral T-cell lymphoma. *Blood*. 2014;123(19):2915-2923.
- Wang X, Werneck MB, Wilson BG, et al. TCR-dependent transformation of mature memory phenotype T cells in mice. *J Clin Invest*. 2011;121(10):3834-3845.
- Rodríguez-Pinilla SM, Sanchez ME, Rodríguez J, et al. Loss of TCR-beta F1 and/or EZRIN expression is associated with unfavorable prognosis in nodal peripheral T-cell lymphomas. *Blood Cancer J*. 2013;3:e111.
- Wang T, Feldman AL, Wada DA, et al. GATA-3 expression identifies a high-risk subset of PTCL, NOS with distinct molecular and clinical features. *Blood*. 2014;123(19):3007-3015.
- Yan ZX, Wu LL, Xue K, et al. MicroRNA187 overexpression is related to tumor progression and determines sensitivity to bortezomib in peripheral T-cell lymphoma. *Leukemia*. 2014;28(4):880-887.
- Thorns C, Bastian B, Pinkel D, et al. Chromosomal aberrations in angioimmunoblastic T-cell lymphoma and peripheral T-cell lymphoma unspecified: A matrix-based CGH approach. *Genes Chromosomes Cancer*. 2007;46(1):37-44.
- Lutz W, Leon J, Eilers M. Contributions of Myc to tumorigenesis. *Biochim Biophys Acta*. 2002;1602(1):61-71.
- Iqbal J, Weisenburger DD, Greiner TC, et al. Molecular signatures to improve diagnosis in peripheral T-cell lymphoma and prognostication in angioimmunoblastic T-cell lymphoma. *Blood*. 2010;115(5):1026-1036.
- Moritake H, Shimodan H, Marutsuka K, Kamimura S, Kojima H, Nunoi H. C-MYC rearrangement may induce an aggressive phenotype in anaplastic lymphoma kinase positive anaplastic large cell lymphoma: Identification of a novel fusion gene ALO17/C-MYC. *Am J Hematol*. 2011;86(1):75-78.
- Cuadros M, Dave SS, Jaffe ES, et al. Identification of a proliferation signature related to survival in nodal peripheral T-cell lymphomas. *J Clin Oncol*. 2007;25(22):3321-3329.
- Went P, Agostinelli C, Gallamini A, et al. Marker expression in peripheral T-cell lymphoma: a proposed clinical-pathologic prognostic score. *J Clin Oncol*. 2006;24(16):2472-2479.
- Weisenburger DD, Savage KJ, Harris NL, et al. Peripheral T-cell lymphoma, not otherwise specified: a report of 340 cases from the International Peripheral T-cell Lymphoma Project. *Blood*. 2011;117(12):3402-3408.
- Federico M, Rudiger T, Bellei M, et al. Clinicopathologic characteristics of angioimmunoblastic T-cell lymphoma: analysis of the international peripheral T-cell lymphoma project. *J Clin Oncol*. 2013;31(2):240-246.
- Wang Y, Misumi I, Gu AD, et al. GATA-3 controls the maintenance and proliferation of T cells downstream of TCR and cytokine signaling. *Nat Immunol*. 2013;14(7):714-722.
- van Hamburg JE, de Bruijn MJ, Dingjan GM, et al. Cooperation of Gata3, C-MYC and Notch in malignant transformation of double positive thymocytes. *Mol Immunol*. 2008;45(11):3085-3095.

p-MAPK1 expression associated with poor prognosis in angioimmunoblastic T-cell lymphoma patients

Peripheral T-cell lymphomas (PTCLs) are a heterogeneous group of non-Hodgkin lymphomas, characterized by their striking clinical and biological heterogeneity and non-specific therapeutic regimens. Recent advances in our understanding of PTCL biology have enabled the identification of novel therapeutic targets that could lead to individualized biomarker-driven therapy (Intlekofer & Younes, 2014).

Many pharmacological compounds against various proteins of the *RAS/RAF/MEK/MAPK1* pathway have been developed, conferring clinical benefits for the treatment of solid tumours (Kohno & Pouyssegur, 2006). Moreover, many of the genes involved in extracellular signal-regulated kinase (*MAPK1*) activation were mutated in a range of tumour subtypes (Davies *et al*, 2002).

Furthermore, the use of conventional immunohistochemical techniques could enable us to identify the activation pathway by visualizing nuclear localization of the phosphorylated MAPK1 (also termed p-ERK) protein. All these data suggest that the *RAS/RAF/MAPK1* pathway is well worth exploring in molecularly targeted orphan tumours, such as nodal-PTCLs (n-PTCLs). In the study reported here, we wanted to establish whether p-MAPK1 expression was of any biological relevance in n-PTCL.

We first analysed pathways involved in PTCL tumourigenesis in a series of 37 frozen n-PTCLs samples [20 peripheral T-cell lymphomas not specified (PTCL-NOS) and 17 angioimmunoblastic T-cell lymphomas (AITL)] and 6 reactive lymph nodes for control samples which were hybridized on a Whole-Human-Genome-Oligo-Microarray. Using Gene-Set-Enrichment-Analysis-Software, we identified 24 gene sets significantly enriched at a false discovery rate (FDR) of <0.250 in the n-PTCL cases compared with reactive lymph

nodes (Table SI). Pathways identified in the n-PTCL cases included *MAPK1* ($P = 0.014$, FDR = 0.033), amongst others.

Tissue micro arrays (TMA) were also constructed from an independent group of 84 formalin-fixed, paraffin-embedded PTCL patients homogeneously treated with CHOP (cyclophosphamide doxorubicin, vincristine, prednisolone)/CHOP-like regimens, including 46 AITL and 38 PTCL-NOS, and TMA sections were stained by the Endvision method with a heat-induced antigen-retrieval step for p-MAPK1. Cases were considered positive for p-MAPK1 when more than 20% of tumoural cells showed nuclear staining. Interestingly, p-MAPK1 was found to be positive not only in tumoural cells but also in follicular dendritic cells, vascular endothelium (used as internal control), and other unspecified stromal dendritic cells. To be sure of the neoplastic condition of the positive cells, double immunohistochemistry for p-MAPK1/PD1 (PDCD1) and p-MAPK1/CD23 (FCER2) was performed on TMA sections (Supplemental Information). Reactive tonsil tissue was included as a control. The primary antibodies were omitted to provide negative controls (Table SII). Patient's clinical data and GEP data have been reported in a previous study (Manso *et al*, 2014).

Nuclear immunostaining p-MAPK1 was detected in tumoural cells in 29.8% of the patients (25 of 84 PTCLs) (Fig 1). Interestingly, nuclear p-MAPK1 expression was more frequent in AITL (39.1%) than in PTCL-NOS (18.4%) cases ($P = 0.039$). No clinical data were significantly different in p-MAPK1-positive and p-MAPK1-negative patients in comparisons either of the whole series of cases or after their histological subclassification (AITL vs. PTCL-NOS) (Tables SIII–SV). In the present series, standard prognostic indices for PTCL, such as the prognostic index for T-cell lymphomas

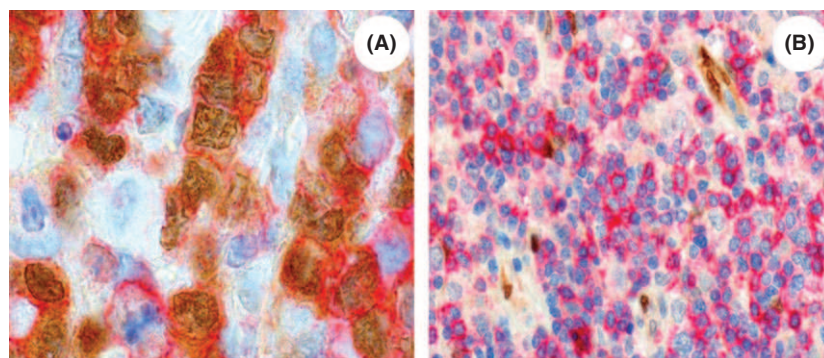


Fig 1. (A) A nodal peripheral T-cell lymphoma (n-PTCL) case showing PD1-positive (red) neoplastic cells with p-MAPK1 expression (brown). Original magnification $\times 40$. (B) A n-PTCL case without p-MAPK1 expression in PD1-positive cells. Original magnification $\times 20$.

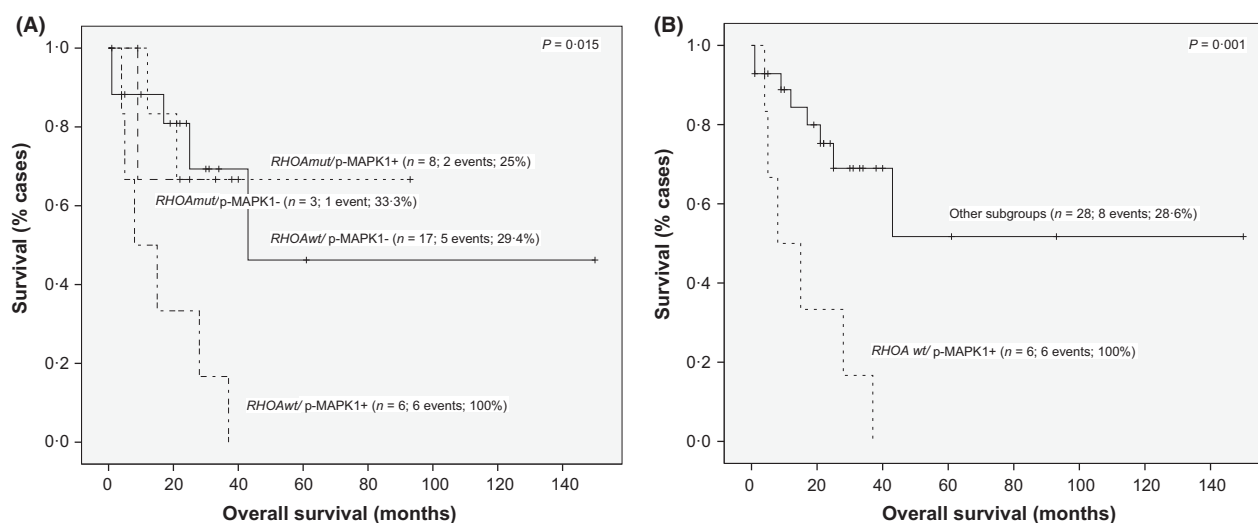


Fig 2. (A) Kaplan–Meier survival curves of the status of the *RHOA* gene and presence/absence of nuclear p-MAPK1 expression in angioimmunoblastic T-cell lymphoma (AITL) patients. (B) Kaplan–Meier survival curves of the *RHOA* wild type/p-MAPK1-positive subgroup versus other subgroups in AITL patients. wt=wild type; mut=mutated.

(PIT) or the International Prognostic Index (IPI), were significant prognostic factors of disease-specific OS in the complete series of patients and in solely the AITL patients ($P < 0.001$ for both in the complete series; $P = 0.001$ and $P = 0.002$, respectively, in the AITL patient subgroup; data not shown).

We found no association between positive p-MAPK1 expression and prognosis in the complete series; however, p-MAPK1 expression was associated with poor outcome in the AITL patient subgroup ($P = 0.046$) (Fig S1). Nevertheless, its significance was not retained in the multivariate analysis when clinical variables (IPI and PIT) were included (Table SVI). This finding has not previously been reported in T-cell lymphomas; however, the presence of high MAPK1 levels is inversely correlated with survival in adenocarcinoma (de Leon Martini *et al*, 2014).

We had previously reported a direct correlation between nuclear expression of p-MAPK1 and the presence of the *RHOA* gene G17V mutation (*RHOA*-G17V) in n-PTCL patients (Manso *et al*, 2014), which is confirmed in the present study ($P = 0.002$). This relationship was maintained in the AITL subgroup of patients ($P = 0.005$). Nevertheless, not all positive p-MAPK1 cases had a *RHOA* gene G17V mutation, suggesting that there are different mechanisms of p-MAPK1 pathway activation in AITLs. Recently, Yan *et al* (2014) identified a relationship between the nuclear expression of p-MAPK1 and *MIR187* overexpression in PTCL-NOS. In other PTCL subgroups, such as anaplastic large cell lymphomas, *MAPK1* may be activated by *COT* (MAP3K8) or *NPM1*-ALK tyrosine kinase itself (Fernandez *et al*, 2011). Interestingly, when subdividing AITL cases according to *RHOA* gene status and the presence/absence of nuclear p-MAPK1 expression, we identified the *RHOA*-G17V wild

type/p-MAPK1-positive subgroup as the one implicated in poor AITL outcome ($P = 0.015$) (Fig 2A and Fig 2B). Furthermore, in multivariate analysis, the Cox regression model identified *RHOA* wild type/p-MAPK1-positive as independent prognostic factors of disease-specific OS ($P = 0.001$) (Table SVII).

The presence of *KRAS* or *NRAS* mutations has been reported in other subtypes of PTCLs, such as cutaneous T-cell lymphoma (Kiessling *et al*, 2011) and T-cell acute lymphoblastic leukaemia/lymphoma (Shieh *et al*, 2013). Moreover, Choi *et al* (2015) have recently described a new *BRAF* mutation in 2.5% of CTCL cases (1 of 40) as well as amplification of the gene in 12.5% of them (5 of 40). We searched for mutations in exons 2, 3 and 4 of both *KRAS* and *NRAS* genes in p-MAPK1-positive cases (Supplemental Information) but obtained no positive results.

Our findings suggest that p-MAPK1 expression could identify a poor prognostic subgroup of AITL patients who could benefit from *RAS/RAF/MEK/MAPK1* pathway inhibitors or from other specific chemotherapeutic regimens. However, these results require experimental and clinical confirmation in an independent series of homogeneously treated AITL patients.

Acknowledgements

We are indebted to the patients who contributed to this study and to the hospitals that supplied the samples. We acknowledge the Biobanks of the CNIO (RD09/0076/00113), IDIVAL-HUMV (RD09/0076/00076), HU 12 de Octubre (RD09/0076/00118), CHUVI (RD09/0076/00011) and FJD (PT13/0010/0012) for their help in collecting the samples, especially Laura Cereceda. We thank Valentín Calvo for his

efficiency in providing us with important papers for our work. This study was supported by grants from the Asociación Española contra el Cáncer (AECC), Ministerio de Economía y Competitividad (MINECO) (SAF2013-47416-R), Instituto Salud Carlos III (ISCIII) – Fondos de Investigación Sanitaria (RD06/0020/0107, RD012/0036/0060 and FIS11/1759). RM is supported by the Fundación Conchita Rábago de la Fundación Jiménez Díaz, Madrid, Spain. The Instituto de Investigación Marqués de Valdecilla (IDIVAL) is partly funded by the Sociedad para el Desarrollo Regional de Cantabria (SODERCAN).

Authorship

MAP and SMR-P conceived, designed and supervised the study. SMR-P and MAP evaluated the immunohistochemistry. RM and SMR-P performed the experiments, analysed and interpreted the data. RM, MAP and SMR-P wrote the paper. GR and SM-M performed the immunohistochemistry. NC participated in the analysis of the mutational status of *KRAS* and *NRAS*. FR, MM, JM, MG-C and PL provided the samples and patient clinical data. All the authors revised the manuscript.

Disclosures

None of the authors reports any conflict of interest.

Rebeca Manso¹
 Giovanna Roncador²
 Santiago Montes-Moreno³
 Federico Rojo¹
 M. Ángeles Pérez-Sáenz⁴
 Manuela Mollejo⁵
 Javier Menárguez⁶
 Nerea Carvajal¹
 Mónica García-Cosío⁷
 Pilar Llamas⁴
 Miguel A. Piris³
 Socorro M. Rodríguez-Pinilla¹

References

Choi, J., Goh, G., Walradt, T., Hong, B.S., Bunick, C.G., Chen, K., Bjornson, R.D., Maman, Y., Wang, T., Tordoff, J., Carlson, K., Overton, J.D., Liu, K.J., Lewis, J.M., Devine, L., Barbarotta, L., Foss, F.M., Subtil, A., Vonderheid, E.C., Edelson, R.L., Schatz, D.G., Boggon, T.J., Girardi, M. & Lifton, R.P. (2015) Genomic landscape of cutaneous T cell lymphoma. *Nature Genetics*, **47**, 1011–1019.

Davies, H., Bignell, G.R., Cox, C., Stephens, P., Edkins, S., Clegg, S., Teague, J., Woffendin, H., Garnett, M.J., Bottomley, W., Davis, N., Dicks, E., Ewing, R., Floyd, Y., Gray, K., Hall, S., Hawes, R., Hughes, J., Kosmidou, V.,

Menzies, A., Mould, C., Parker, A., Stevens, C., Watt, S., Hooper, S., Wilson, R., Jayatilake, H., Gusterson, B.A., Cooper, C., Shipley, J., Hargrave, D., Pritchard-Jones, K., Maitland, N., Chenevix-Trench, G., Riggins, G.J., Bigner, D.D., Palmieri, G., Cossu, A., Flanagan, A., Nicholson, A., Ho, J.W., Leung, S.Y., Yuen, S.T., Weber, B.L., Seigler, H.F., Darrow, T.L., Paterson, H., Marais, R., Marshall, C.J., Wooster, R., Stratton, M.R. & Futreal, P.A. (2002) Mutations of the *BRAF* gene in human cancer. *Nature*, **417**, 949–954.

Fernandez, M., Manso, R., Bernaldo de Quiros, F., Lopez, P., Martin-Duce, A. & Alemany, S. (2011) Involvement of Cot activity in the proliferation of ALCL lymphoma cells. *Biochemical*

¹Pathology Department, IIS-Fundación Jiménez Díaz, UAM, ²Mono-clonal Antibodies Core Unit, Spanish National Cancer Research Centre (CNIO), Madrid, ³Pathology Department, Hospital Universitario Marqués de Valdecilla, Universidad de Cantabria, IDIVAL, Santander, ⁴Haematology Department, IIS-Fundación Jiménez Díaz, UAM, Madrid, ⁵Pathology Department, Hospital Universitario Virgen de la Salud, Toledo, ⁶Pathology Department, Hospital Universitario Gregorio Marañón, and ⁷Pathology Department, Hospital Universitario Ramón y Cajal, Madrid, Spain.

E-mail: smrodriguez@ffd.es

Keywords: peripheral T-cell lymphomas, angioimmunoblastic T-cell lymphomas, p-MAPK1

Supporting Information

Additional Supporting Information may be found in the online version of this article:

Fig S1. Kaplan–Meier survival curves of p-MAPK1 expression in the complete series of n-PTCL and after their histological subclassification (AITL vs. PTCL-NOS).

Table SI. Expression profile data were analyzed with Gene Set Enrichment Analysis (GSEA) software.

Table SII. Panel of antibodies used in this series.

Table SIII. Univariate analysis of the clinical and molecular parameters of 84 patients with n-PTCLs treated with CHOP/CHOP-like according to p-MAPK1 expression.

Table SIV. Univariate analysis of the clinical and molecular parameters of 46 patients with AITL treated with CHOP/CHOP-like according to p-MAPK1 expression.

Table SV. Univariate analysis of the clinical and molecular parameters of 38 patients with PTCL-NOS treated with CHOP/CHOP-like according to p-MAPK1 expression.

Table SVI. Multivariate analysis of the clinical and significant biological markers.

Table SVII. Multivariate analysis of the clinical and significant biological markers.

Data S1. Material and methods.

and *Biophysical Research Communications*, **411**, 655–660.

Intlekofer, A.M. & Younes, A. (2014) From empiric to mechanism-based therapy for peripheral T cell lymphoma. *International Journal of Hematology*, **99**, 249–262.

Kiessling, M.K., Oberholzer, P.A., Mondal, C., Karpova, M.B., Zipsper, M.C., Lin, W.M., Girardi, M., Macconail, L.E., Kehoe, S.M., Hatton, C., French, L.E., Garraway, L.A., Polier, G., Suss, D., Klemke, C.D., Krammer, P.H., Gulow, K. & Dummer, R. (2011) High-throughput mutation profiling of CTCL samples reveals *KRAS* and *NRAS* mutations sensitizing tumors toward inhibition of the RAS/RAF/MEK signaling cascade. *Blood*, **117**, 2433–2440.

Correspondence

- Kohno, M. & Pouyssegur, J. (2006) Targeting the ERK signaling pathway in cancer therapy. *Annals of Medicine*, **38**, 200–211.
- de Leon Martini, S., Muller, C.B., Meurer, R.T., Fernandes Mda, C., Mariano, R., Barbachan, E.S.M., Klamt, F. & Andrade, C.F. (2014) The potential role of extracellular regulatory kinase in the survival of patients with early stage adenocarcinoma. *Journal of Thoracic Disease*, **6**, 930–936.
- Manso, R., Sanchez-Beato, M., Monsalvo, S., Gomez, S., Cereceda, L., Llamas, P., Rojo, F., Mollejo, M., Menarguez, J., Alves, J., Garcia-Cosio, M., Piris, M.A. & Rodriguez-Pinilla, S.M. (2014) The RHOA G17V gene mutation occurs frequently in peripheral T-cell lymphoma and is associated with a characteristic molecular signature. *Blood*, **123**, 2893–2894.
- Shieh, A., Ward, A.F., Donlan, K.L., Harding-Theobald, E.R., Xu, J., Mullighan, C.G., Zhang, C., Chen, S.C., Su, X., Downing, J.R., Bollag, G.E. & Shannon, K.M. (2013) Defective K-Ras oncoproteins overcome impaired effector activation to initiate leukemia in vivo. *Blood*, **121**, 4884–4893.
- Yan, Z.X., Wu, L.L., Xue, K., Zhang, Q.L., Guo, Y., Romero, M., Leboeuf, C., Janin, A., Chen, S.J., Wang, L. & Zhao, W.L. (2014) Micro-RNA187 overexpression is related to tumor progression and determines sensitivity to bortezomib in peripheral T-cell lymphoma. *Leukemia*, **28**, 880–887.

Mutations in the JAK/STAT pathway genes and activation of the pathway, a relevant finding in nodal Peripheral T-cell lymphoma.

Peripheral T-cell lymphomas (PTCLs) are a heterogeneous group of non-Hodgkin lymphomas (NHLs), characterized by their striking clinical and biological heterogeneity and non-specific therapeutic regimens.

JAK proteins (Janus kinases, JAK1-3 and TYK2) exhibit tyrosine kinase activity and are associated with cytokine receptors. After ligand binding, the JAKs bind to the receptors allowing their phosphorylation, which results in the activation of members of the STAT family (signal transducer and activator of transcription, STAT1-4, 5A, 5B and 6)¹. Next, phospho-STAT dimers accumulate in the cell nucleus, bind to enhancer elements and regulate gene expression. Most of these dimers are related to proliferation, differentiation and survival^{2, 3}. Alterations of the JAK/STAT pathway are frequent in diverse subtypes of PTCL, such as anaplastic large cell lymphoma (ALCL), hepatosplenic T-cell lymphoma (HSTCL), T-cell prolymphocytic leukemia (T-PLL), extranodal NK/T-cell lymphoma, nasal type (ENKTCL), large granular lymphocyte leukemia (LGL) and PTCL in immunosuppressed patients after stem cell transplantation⁴. Several studies have demonstrated that the use of JAK/STAT inhibitors in cell lines and/or patients with hematological malignancies and solid tumors⁵ causes inhibition of cell proliferation⁶, improvement of symptoms and increased survival, respectively.

The aim of this study was to analyze the activation of the JAK/STAT pathway in a subgroup of 98 n-PTCL-NOS comprising 57 AITL and 41 PTCL-NOS patients. TMAs were constructed and the expression of p-STAT3 and p-STAT6 using immunohistochemistry (IHC) was analyzed. Twenty-eight and 26 cases were positive for p-STAT3 and p-STAT6, respectively (cases were considered positive when more than 10% and 20%, respectively, of the tumoral cells showed nuclear staining). Next Generation Sequencing (NGS) was used to identify whether mutations in genes of the JAK/STAT pathway could be involved in its activation. Overall, 6.1% (6/98) of the tumors (3 AITL and 3 PTCL-NOS) showed mutations in one gene of this pathway (Table 1). Mutations were mutually exclusive. There were three *JAK1* (G1097V, T901R y K696E), one *STAT1* (E563K), one *STAT3* (D566N) and one *CCR4* (Y331*) gene mutations. No correlations were found between p-STAT3 or p-STAT6 expression and

JAK/STAT pathway gene mutations. p-STAT3 and p-STAT6 expression was associated with the presence of AITL morphology and TFH phenotype (p=0.047 and 0.001, respectively). p-STAT3 expression was directly associated with the presence of ICOS (p=0.013), CXCL13 (p=0.005), p52 (p<0.001) and p53 (p=0.057). Moreover, p-STAT6 expression was significantly and positively correlated with the level of Ki67 expression (p=0.012) and nuclear expression of p52 (p<0.001). In this series, p-STAT6 expression and mutations in genes of the JAK/STAT pathway were both related to shorter survival (p=0.008 and 0.016, respectively) (Figure 1).

A tendency for JAK1 and/or STAT3 mutations to be present in the cutaneous T-cell lymphoma (CTCL) and ALK-negative ALCL subgroup, as well as the overrepresentation of STAT5B and/or JAK3 mutations in subgroups of epitheliotropic intestinal T-cell lymphoma (EATL) type II, hepatosplenic T-cell lymphoma (HPTSP), primary cutaneous $\gamma\delta$ T-cell lymphoma ($\gamma\delta$ -TCL) and NK/T-cell lymphomas, has been reported in previous studies^{5,7,8}. In contrast to what we have found here, a large subset of these tumors harbored concurrent activating mutations in two members of the same pathway.

In the present series of cases, *JAK1* was the most frequently mutated gene (found in 1 AITL and 2 PTCL-NOS cases), with mutations taking place in the kinase and pseudo-kinase domains of the *JAK* gene, conferring a potentially harmful function (Supplementary Figure 1). Two patients showed mutations in the DNA binding domain of both the *STAT1* (E563K) and *STAT3* (D566N) genes. STAT1-E563K is a non-synonymous SNV that has been reported by Palomero et al in PTCL-NOS, where it is associated with p-STAT6 expression and has been predicted to have a deleterious function⁹. Recently, Abate et al reported mutations in the *STAT6* gene in 8.3% (5/60) of AITL cases¹⁰. Unfortunately, they did not correlate these mutations with protein phosphorylation, and this gene was not covered by our NGS design. This series features a single case with a *STAT3* mutation, which also showed p-STAT3 nuclear expression and CD30-positivity. Nevertheless, it was considered PTCL-NOS-positive for TFH markers lacking anaplastic morphology, thus showing that *STAT3* mutations can be also found in non-anaplastic T-cell lymphomas⁸. C-C chemokine receptor type 4 (CCR4) is a chemokine receptor belonging to the G protein-coupled receptor (GPCR) family. It has been frequently found mutated in ATLL patients, on whom it confers poor prognosis¹¹

and whose PI3K-pathway becomes activated. It has been found mutated in a series of 9% of PTCL-NOS cases, and is overexpressed in AITL patients with a *RHOA* mutation¹². We found one AITL case with the most frequently mutated amino acid so far reported (Y331*).

The frequency of JAK/STAT mutations identified here is slightly higher than that found by Vallois et al (4/85)¹³. Furthermore, the results of this study also draw attention to the importance of JAK/STAT pathway activation in PTCL and AITL, whereby there are close associations between mutations in this pathway and a TFH phenotype ($p < 0.001$), and between shorter survival for both p-STAT6 expression and JAK-STAT pathway mutation. Additionally, a close relationship was found between p-STAT6 expression and a high proliferation index (Ki-67), which is a feature related to poor outcome in this and other series¹⁴. Furthermore, p-STAT3 and p-STAT6 expression was correlated with the presence of p52, a member of the alternative NF-kB-pathway that plays an important role in PTCL pathogenesis. Simultaneous activation of the NF-kB and JAK/STAT pathways has also been found in other T-cell lymphoma subtypes, such as CTCL^{5, 15}. In the present series, which mainly comprises AITL and nodal PTCL-NOS, the proportion of mutated cases is lower than that of cases showing activation of the pathway, as indicated by the phosphorylation of either JAK or STAT proteins. This implies the existence of additional alternative ways of JAK/STAT-pathway activation, a finding that is also observed in other studies performed in other T-cell lymphoma subtypes^{4, 5, 7, 8}.

Considered together, these results indicate that JAK/STAT-pathway activation in n-PTCL patients could be mechanistically and clinically significant, and suggest there may be a potential benefit from the specific inhibition of these targets. This needs further investigation in larger series of patients.

References

1. Heim MH. The Jak-STAT pathway: cytokine signalling from the receptor to the nucleus. *J Recept Signal Transduct Res.* 1999;19(1-4):75-120.
2. Darnell JE, Jr., Kerr IM, Stark GR. Jak-STAT pathways and transcriptional activation in response to IFNs and other extracellular signaling proteins. *Science.* 1994;264(5164):1415-1421.
3. Kumar A, Commune M, Flickinger TW, Horvath CM, Stark GR. Defective TNF-alpha-induced apoptosis in STAT1-null cells due to low constitutive levels of caspases. *Science.* 1997;278(5343):1630-1632.
4. Margolskee E, Jobanputra V, Jain P, et al. Genetic landscape of T- and NK-cell post-transplant lymphoproliferative disorders. *Oncotarget.* 2016;7(25):37636-37648.
5. Perez C, Gonzalez-Rincon J, Onaindia A, et al. Mutated JAK kinases and deregulated STAT activity are potential therapeutic targets in cutaneous T-cell lymphoma. *Haematologica.* 2015;100(11):e450-453.
6. Younes A, Romaguera J, Fanale M, et al. Phase I study of a novel oral Janus kinase 2 inhibitor, SB1518, in patients with relapsed lymphoma: evidence of clinical and biologic activity in multiple lymphoma subtypes. *J Clin Oncol.* 2012;30(33):4161-4167.
7. Nicolae A, Xi L, Pittaluga S, et al. Frequent STAT5B mutations in gammadelta hepatosplenic T-cell lymphomas. *Leukemia.* 2014;28(11):2244-2248.
8. Crescenzo R, Abate F, Lasorsa E, et al. Convergent mutations and kinase fusions lead to oncogenic STAT3 activation in anaplastic large cell lymphoma. *Cancer Cell.* 2015;27(4):516-532.
9. Palomero T, Couronne L, Khiabani H, et al. Recurrent mutations in epigenetic regulators, RHOA and FYN kinase in peripheral T cell lymphomas. *Nat Genet.* 2014;46(2):166-170.
10. Abate F, da Silva-Almeida AC, Zairis S, et al. Activating mutations and translocations in the guanine exchange factor VAV1 in peripheral T-cell lymphomas. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2017;114(4):764-769.
11. Yoshida N, Miyoshi H, Kato T, et al. CCR4 frameshift mutation identifies a distinct group of adult T cell leukaemia/lymphoma with poor prognosis. *J Pathol.* 2016;238(5):621-626.
12. Nagao R, Kikuti YY, Carreras J, et al. Clinicopathologic Analysis of Angioimmunoblastic T-cell Lymphoma With or Without RHOA G17V Mutation Using Formalin-fixed Paraffin-embedded Sections. *Am J Surg Pathol.* 2016;40(8):1041-1050.
13. Vallois D, Dobay MP, Morin RD, et al. Activating mutations in genes related to TCR signaling in angioimmunoblastic and other follicular helper T-cell-derived lymphomas. *Blood.* 2016;128(11):1490-1502.
14. Rodriguez-Pinilla SM, Sanchez ME, Rodriguez J, et al. Loss of TCR-beta F1 and/or EZRIN expression is associated with unfavorable prognosis in nodal peripheral T-cell lymphomas. *Blood Cancer J.* 2013;3(e111).
15. Odqvist L, Sanchez-Beato M, Montes-Moreno S, et al. NIK controls classical and alternative NF-kappaB activation and is necessary for the survival of human T-cell lymphoma cells. *Clin Cancer Res.* 2013;19(9):2319-2330.

Table 1. Details of mutations identified in JAK/STAT pathway.

Patient	Diagnosis	Gene	Locus	Amino acid change	DNA change	Coverage	Mutant allele frequency (%)	Domain	Mutation type	Functional prediction
1	PTCL-NOS	JAK1	chr1:65305426	p.Thr901Arg	c.2702C>G	1369	27	Kinase	missense	Probably damaging
24	AITL	STAT1	chr2:191844538	p.Glu563Lys	c.1687G>A	1999	6	DNA binding	missense	Probably damaging
28	AITL	CCR4	chr3:32995907	p.Tyr331*	c.993C>G	1469	6		nonsense	Stop gain
40	AITL	JAK1	chr1:65301158	p.Gly1097Val	c.3290G>T	260	16	Kinase	missense	Probably damaging
53	PTCL-NOS	JAK1	chr1:65311225	p.Lys696Glu	c.2086A>G	1921	9	Pseudo-kinase	missense	Probably damaging
54	PTCL-NOS	STAT3	chr17:40475330	p.Asp566Asn	c.1696G>A	1236	7	DNA binding	missense	Probably damaging

Figure legends

Figure 1. Kaplan-Meier survival curves for JAK/STAT mutation and p-STAT6 expression in PTCL patients.

