

UNIVERSITATEA DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE
“CAROL DAVILA” BUCUREȘTI



**FACTORI TISULARI DE DIAGNOSTIC ȘI PROGRESIE ÎN
MYCOSIS FUNGOIDES INCIPIENT**

- REZUMAT -

Coordonator științific:

Prof. Dr. Florica Stăniceanu

Doctorand:

Tiberiu Tebeică

- 2016 -

CUPRINS

PARTEA GENERALĂ – STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII

Informații generale	1
Etiopatogenie și genetică	2
Aspecte clinice, patologie și diagnostic	5
Stadializare și prognostic	10

PARTEA SPECIALĂ – CERCETĂRI PROPRII

Ipoteza de lucru și obiectivele generale	11
Materiale și metodă	12
Pacienți și controale	12
Analiza criteriilor de diagnostic histopatologic	13
Analiza expresiei imunofenotipice a infiltratelor tumoral și reactiv	14
Identificarea factorilor implicați în progresia bolii	15
Rezultate	16
Componența loturilor țintă și control	16
Date demografice	16
Modificări histopatologice în leziunile incipiente	17
Expresia imunofenotipică a infiltratelor tumoral și reactiv	22
Factori asociați cu progresia bolii	26

CONCLUZII	28
------------------	-----------

BIBLIOGRAFIE SELECTIVĂ	32
-------------------------------	-----------

Capitolul 1 – Informații generale

1.1. Definiție

Limfoamele cutanate primare (LCP) alcătuiesc un grup heterogen de boli limfoproliferative extranodale non-Hodgkin care, în momentul diagnosticului, sunt localizate la nivelul tegumentului. După tractul gastro-intestinal, pielea este, ca frecvență, al doilea organ de origine a limfoamelor extranodale (1). Spre deosebire de limfoamele nodale non-Hodgkin, derivate în marea lor majoritate din limfocite B, aproximativ 75% dintre LCP își au originea în diferite subseturi de limfocite T. Grupul limfoamelor cutanate primare cu celule T (LCP-T) reunește astfel o multitudine de afecțiuni cu prezentări clinice, caracteristici histologice și implicații terapeutice diferite.

Mycosis fungoides (MF) este cea mai frecvent întâlnită formă de LCP-T. Împreună cu sindromul Sezary (SS), considerat o lungă perioadă de vreme ca fiind varianta sa leucemică, constituie aproximativ două treimi din totalul limfoamelor cutanate primare (2-4). Definiția bolii, așa cum este ea inclusă în clasificarea WHO-EORTC, implică prezența unui tablou clinico-evolutiv tipic, intitulat “modelul Alibert-Bazin” (5). Conform acestui model, în majoritatea cazurilor afecțiunea trece din punct de vedere clinic prin 3 stadii: stadiul de pată, stadiul de placă și stadiul tumoral. Această prezentare clinico-patologică și evolutivă este considerată “clasică” și definitorie pentru MF (6).

1.2. Incidență și epidemiologie

Deși MF este un limfom întâlnit relativ rar, acesta reprezintă peste o treime dintre toate limfoamele non-Hodgkin cutanate primare și peste jumătate din LCP-T (3). Se estimează că MF reprezintă 0,5% dintre toate limfoamele non-Hodgkin diagnosticate în fiecare an (7). Incidența anuală a MF a fost raportată ca fiind în continuă creștere, de aproximativ 2,9 cazuri la 1 milion de persoane în perioada 1973-1984 (7,8), 3,6 cazuri la 1 milion de persoane în perioada 1973-1992 (9) și 4,1 cazuri la 1 milion de persoane în perioada 2001-2005 (3). Această creștere ar putea fi explicată în parte prin îmbunătățirea standardelor de diagnostic și tratament (10), prin modificarea metodelor de raportare și a clasificării bolilor limfoproliferative de-a lungul timpului, precum și prin explozia de cazuri de sindrom al imunodeficienței dobândite (SIDA) din anii ‘80 care a contribuit în parte la creșterea incidenței limfomului non-Hodgkin (11).

Rata incidenței la bărbați este semnificativ mai mare (5,3 vs. 3,2/1.000.000 persoane-an, raportul ratei incidenței anuale B/F de 1,66), raportul fiind similar și în cazul etniei pacienților (raportul ratei incidenței între afro-americani și caucazieni de 1,44) (3). În ceea ce privește rata incidenței în funcție de vârstă și vârsta la momentul diagnosticului, incidența MF este mai mare la vârstnici, atingând un maxim în jurul decadelor a IX-a, când și numărul de cazuri nou diagnosticate la bărbați este dublu față de genul opus. Rata MF este mai mică, și totodată similară în funcție de gen, la pacienții tineri, sub 30 ani, și în populația pediatrică.

Capitolul 2 – Etiopatogenie și genetică

2.1. Etiologie

Cauzele și mecanismele MF sunt puțin înțelese. În linii mari, nu există dovezi convingătoare privind asocierea MF cu factori de mediu, comportamentali sau virali, dar sunt în discuție două mari ipoteze. Prima sugerează faptul că agentul declanșator al MF ar putea fi un antigen persistent. A doua ipoteză este cea a existenței unui agent viral care poate determina atât transformarea malignă a celulelor T, precum și expresia continuă a antigenelor virale similar primei ipoteze.

Ipoteza stimulării antigenice sugerează faptul că MF este cauzat de persistența unui antigen. Stimularea continuă și activarea celulelor T helper din piele de către diverse antigene de natură exogenă ar conduce inițial la inflamație cronică, activare care poate fi urmată de transformarea malignă a unei clone.

Factorii de mediu au fost luați în discuție ca posibili factori de risc pentru MF, printre care factorul ocupațional, expunerea la radiații, medicamente și infecții. S-a presupus că factorii de mediu și stilul de viață pot avea un rol important inclusiv în fenomenul creșterii incidenței bolii, mai ales în țările industrializate. Cel mai frecvent incriminați au fost agenții chimici și farmacologici, inclusiv tutun (12). Observația conform căreia dermatita, de cele mai multe ori nespecifică, precede debutul bolii și chiar reprezintă un stadiu premalign sau incipient de limfom cutanat susține rolul factorilor de risc ocupaționali. Alături de antigenele specifice, superantigenele bacteriene, precum cele ale stafilococului auriu, pot fi o cauză de stimulare continuă a celulelor T (13,14). Infecția cu *S aureus* se corelează cu severitatea bolii la pacienți cu LCP-T (15), iar tratamentul antibiotic al infecției a îmbunătățit evoluția bolii la pacienții infectați (16).

Incidența limfoamelor cutanate este mai mare la vârstnici (8), iar mortalitatea este de asemenea mai mare în cazul acestor pacienți (9). Au fost descrise LCP-T inclusiv la pacienți transplantați, în multe situații acestea având o evoluție chiar mai agresivă ca de obicei (17,18). MF a fost întâlnit și în contextul infecției HIV (19), iar la unii pacienți seropozitivi a fost descris un grup de afecțiuni limfoproliferative cutanate secundare infecției HIV asemănătoare din multe puncte de vedere cu LCP-T (20). Toate aceste aspecte sugerează posibilă implicare a unui agent infecțios în etiologia bolii, pe fondul imunosupresiei. Dar imunosupresia poate fi de asemenea o consecință a bolii determinată de o depleție limfocitară relativă, prin îngustarea semnificativă a repertoriului celulelor T în raport cu clona malignă, depleție comparabilă cu cea observată la pacienții HIV (21).

2.2. Anomalii ale sistemului imun

Progresia lentă a MF stârnește câteva ipoteze privind biologia celulelor T maligne. Celulele T tumorale probabil nu dețin un potențial proliferativ autonom, ci creșterea lor este strict dependentă de microclimatul cutanat (22). Această ipoteză este susținută de observația că celulele T ale pacienților cu LCP-T necesită stimulare via CD28 pentru proliferare (23), răspund slab la factori de creștere in vitro și nu proliferază precum celulele T normale in vitro (24). O altă posibilă explicație a evoluției lente a bolii ar putea fi dată de rolul imunosupravegherii tumorale în modularea și supresia progresiei bolii. Histopatologia MF, care relevă în stadiile incipiente infiltrare cu celule T CD4+ maligne

și celule T CD8+ reactive, precum și un profil dominant al citokinelor de tip celule T helper 1 (Th1), urmate în stadiile avansate de o creștere graduală a proporției de celule T CD4+ și deviere către Th2, sugerează faptul că pierderea răspunsului imun mediat prin CD8 corespunde progresiei bolii. Mai mult, eficiența clinică a agenților terapeutici care modulează sistemul imun și reversează expresia citokinelor Th1 în MF și SS susține rolul important al imunității tumorale în evoluția clinică.

2.3. Anomalii ale citokinelor

În microclimatul local din MF, celulele T maligne sintetizează și răspund la citokine. Profilul citokinelor în interiorul leziunilor (pată vs. placă vs. tumoră) și în celulele mononucleare din sângele periferic al pacienților cu MF în diferite stadii furnizează indicii privind modificările dinamice din micromediul cutanat în timpul progresiei bolii (25,26). Analiza citokinelor în piele a permis identificarea unor modele specifice asociate cu stadiile incipiente și avansate. În MF incipient se detectează ARN-ul mesager (ARNm) al citokinelor de pattern Th1: interferon gamma (IF γ), interleukina (IL)12 și IL2 (27). În timpul progresiei spre stadiile mai avansate are loc o pierdere a citokinelor Th1, evidențiată de scăderea nivelurilor IF γ , IL12 și IL2, și creșterea nivelurilor ARN-ului mesager al citokinelor de tip Th2, respectiv IL4, IL5, IL10 și IL13 (25,28). Modificările din piele sunt de asemenea observate la analiza expresiei genice în sângele periferic (29).

Se presupune că în stadiile incipiente celulele T CD8+ contribuie la devierea către Th1, în timp ce în stadiile avansate, în care predomină celulele T CD4+ maligne, se observă o deviere către Th2. Dat fiind faptul că celulele T CD8+ manifestă un fenotip Th1 și au rol în imunitatea mediată celular, prezența lor în piele se corelează cu un răspuns imun antitumoral (30,31). De asemenea, citokinele proinflamatorii Th1 pot contribui la aspectul eczematos, caracterizat de infiltratul inflamator asociat în stadiile incipiente ale MF. Predominanța citokinelor Th2 în stadii avansate a fost asociată cu proliferarea celulelor tumorale, precum și cu răspunsul imun diminuat. În plus, expresia citokinelor Th2 poate explica și fenomenul imun al eozinofiliei cu creșterea producției IgE.

2.4. Restricții antigenice la nivelul celulelor T

Jumătate dintre pacienții în stadiile I și II și toți pacienții în stadiile III și IV manifestă o diminuare substanțială a diversității receptorilor limfocitelor T, în comparație cu repertoriul variat de receptori T exprimați de către limfocitele T normale din sângele periferic (21). Mai mult, concentrația serică a anumitor domenii ale receptorului TCR folosite pentru a măsura expansiunea clonală a celulelor T este scăzută la pacienții cu LCP-T în toate stadiile (32).

Diminuarea diversității limfocitelor T în stadiile incipiente are o semnificație importantă. O îngustare a repertoriului celular T este observată în mod obișnuit după infecții specifice cu virusuri precum HIV-1 (33). Îngustarea repertoriului celulelor T s-ar putea datora reactivității încrucișate, de exemplu prin mimetism molecular, între un epitop viral care este recunoscut după infectarea cu anumite virusuri și un autoantigen din piele care stimulează activarea celulelor T. Această ipoteză ar putea explica inabilitatea detectării unui patogen viral specific în leziunile cutanate de MF, patogenul viral inițial

fiind deja eradicat în momentul în care boala limfoproliferativă este deja simptomatică.

2.5. Celulele prezentatoare de antigen

În afară de producția de chemokine, celulele dendritice pot avea și alte funcții în patogenia MF. De exemplu, acestea ar putea juca un rol în dezvoltarea MF conform ipotezei stimulării antigenice. Microabcesele Pautrier, patognomonice pentru MF, reprezintă în fapt colecții intraepidermice de limfocite tumorale aderente la procesele dendritice ale celulelor Langerhans, celulele dendritice prezentatoare de antigen ale epidermului (34,35). Indiferent de localizarea intraepidermică sau intradermică a infiltratelor limfomatoase, acestea includ celule dendritice uniform dispersate (36), ceea ce indică o implicare a lor în stimularea celulelor tumorale. Citokinele produse de către celulele Langerhans ar putea atrage în epiderm celulele T CD4+ maligne, comunicarea încrucișată între celulele Langerhans și celulele T fiind probabil un eveniment important pentru progresia bolii. Teoria aceasta este susținută și de faptul că celulele tumorale ale pacienților cu LCP-T pot supraviețui pe termen lung în culturi celulare numai după stimulare cu celule dendritice imature (22). Acestea din urmă au capacitatea de a ingera celulele T apoptotice, inclusiv pe cele tumorale, și pot prezenta antigene care stimulează dezvoltarea celulelor T reglatorii imunosupresoare FoxP3+, CD25+. După ingestia celulelor apoptotice, celulele dendritice determina celulele tumorale să exprime un fenotip caracteristic de celule reglatorii imunosupresoare. Această activitate de reglare și inhibare a celulelor T ar putea explica imunosupresia observată la pacienții în stadii avansate de boală.

2.6. Genetică moleculară

Studiile de expresie genică în MF au obținut rezultate heterogene între pacienți și chiar o diversitate semnificativă a expresiei genice în cazul aceluiași pacient. De exemplu, expresia PLS3, gena raportată cel mai frecvent ca fiind supraexprimată în SS, a fost identificată la 38% dintre pacienții cu MF care aveau diseminare în sângele periferic, dar cu heterogenitate de expresie în cadrul populațiilor de celule maligne recoltate de la același pacient (37). Spre deosebire de limfoamele B și leucemiile mieloide, în MF nu au fost identificate translocății cromozomiale patognomonice sau distinctive până la momentul actual. Dar analiza genetică a celulelor tumorale este dificilă, mai ales în stadiile inițiale în care predomină celulele T reactive. În interpretarea rezultatelor obținute în urma analizei preparatelor din leziuni de MF incipient trebuie să se țină cont de alterările genetice cauzate direct de prezența infiltratului inflamator cronic. S-a acordat atenție și potențialului rol pe care l-ar putea juca microARN-urile în expresia genică (38) ceea ce indică faptul că microARN-urile sunt importante în patogeniza limfoamelor cutanate, iar strategiile terapeutice centrate pe țintirea microARN-urilor sau a efectoarelor lor ar putea determina o creștere a eficienței tratamentelor chimioterapice actuale.

Capitolul 3 – Aspecte clinice, patologie și diagnostic

3.1. Prezentare clinică

MF se manifestă din punct de vedere clinic prin leziuni cutanate de forme și dimensiuni variabile, persistente sau lent progresive, cu aspect de **pete eritematoase**, **plăci** și, mai rar, **tumori** sau **eritrodermie generalizată**. Leziunile sunt adesea pruriginoase, cu afectarea profundă a calității vieții pacientului (39). În general, distribuția leziunilor se suprapune peste ariile fotoprotejate, însă oricare zonă anatomică poate fi afectată, inclusiv palmele și plantele (40,41). Petele și plăcile afectează sub 10% din suprafața corpului în aproximativ 30% din pacienți, în timp ce la aproximativ 35% din pacienți se observă o afectare mai generalizată (42). Douăzeci de procente, respectiv 15% dintre pacienți dezvoltă tumori sau ajung în stadiul eritrodermic.

Perioada “premicotică”

Un diagnostic definitiv de MF este adesea precedat de o perioadă “premicotică”, care poate dura de la câteva luni până la decade întregi, timp în care pacientul poate manifesta leziuni cutanate eritematoase, ușor scuamoase, nespecifice, cu biopsie neconcludentă (43). Aceste leziuni pot avea o evoluție fluctuantă peste ani, astfel că adesea este stabilit diagnosticul de dermatită nespecifică sau **parapsoriasis în plăci** (44). La unii pacienți cu asemenea manifestări nespecifice, chiar și dintre cei cu clonalitate dovedită a celulelor T (45), leziunile nu progresează niciodată suficient de mult pentru ca aceștia să primească un diagnostic definitiv de MF. În asemenea cazuri, erupțiile cutanate pot regresa fără un tratament specific sau după tratamente simple, ocazionale, cu corticosteroizi topici (46). Pentru diagnostic definitiv pot fi necesare biopsii repetate, mai ales atunci când biopsia inițială este neconcludentă.

Stadiul de pete

Aspectul clinic în stadiul de pete al MF constă din macule și pete de forme neregulate, asimetrice, cu scuame, telangiectazii și atrofie, adesea cu dimensiuni mai mari de 5 cm (40,47). Leziunile afectează în mod obișnuit ariile fesiere, pectorale și flexurile extremităților și pot fi asimptomatice și tranzitorii, dispărând spontan fără cicatrici reziduale. Supraviețuirea la 30 ani este similară cu cea a grupului control, alcătuit dintr-o populație de subiecți de sex, vârstă și rasă similare. Mai puțin de 10% dintre pacienți progresează către un stadiu mai avansat, și foarte puțini decedază datorită bolii (48).

Stadiul de plăci

În stadiul de plăci, pacienții prezintă în mod caracteristic plăci brun-roșietice bine demarcate, palpabile, infiltrate, cu scuame. Plăcile pot fuziona și afecta suprafețe întinse, iar mai apoi pot regresa spontan și parțial, rezultând arii lezionale cu margini serpigionase, inelare sau arcuate. În acest stadiu pot fi observate și pete cu aspect tipic, în continuitate cu leziunile de tip placă sau localizate în alte zone cutanate (49,50).

De multe ori, leziunile de tip pată și placă sunt acoperite de scuame, de obicei mai fine ca cele observate la pacienții cu psoriazis. Uneori, leziunile sunt atrofice și depigmentate în varianta poikilodermică a bolii. Petele și plăcile pot deveni hipo- sau hiperpigmentate, sau pot dezvolta peteșii pe suprafață. Pacientul tipic cu MF prezintă

multiple leziuni de lungă durată, luni sau ani, localizate cel mai adesea în arii infrecvent expuse la lumină. Fața este o regiune rar afectată, excluzând stadiul tumoral sau varianta foliculotropă a bolii (51).

Stadiul tumoral

O dată cu progresia bolii, petele evoluează către plăci infiltrate cu distribuție mai generalizată, iar pacienții cu istoric de plăci pot dezvolta tumori exofitice sau ulcerate. Tumora este definită ca fiind o leziune cutanată solidă, în formă de dom, cu diametrul mai mare de 1 cm. Majoritatea pacienților în stadiile de pată sau placă nu progresează însă niciodată către stadii avansate (48).

Stadiul eritrodermic

Uneori, pielea pacienților cu MF dezvoltă eritem pe o suprafață mai mare de 80%, situație denumită MF eritrodermic (52). Această fază poate fi însoțită de leziuni atrofice sau lichenificate, plăci și tumori (43). Acești pacienți sunt aproape întotdeauna simptomatici, cu prurit și descuamare, și manifestă frecvent limfadenopatie datorită leziunilor cutanate difuze și severe.

3.2. Histopatologie

Modificările microscopice observate în biopsiile cutanate din leziuni incipiente de MF, fără creștere verticală (pete, plăci) sunt discrete și adesea dificil de diferențiat de multitudinea de condiții inflamatorii care mimează LCP-T din punct de vedere histopatologic (40). Au fost concepuți numeroși algoritmi care își propun stabilirea unui diagnostic obiectiv de MF incipient (40,53-56), dar niciunul nu a fost inclus în clasificarea WHO până în prezent, ceea ce confirmă faptul că diagnosticul precoce al MF este în continuare un domeniu deschis dezbaterii, dificil de încorporat în algoritmi simpli. În mod caracteristic, infiltratele tumorale în MF sunt alcătuite din celule mononucleare atipice de dimensiuni mici-medii, cu nuclei cerebriformi și sunt localizate în porțiunea superioară a dermului și la nivelul epidermului, între keratinocite. Această din urmă caracteristică se numește **epidermotropism** și reprezintă un criteriu principal de diagnostic în MF.

Termenul epidermotropism îmbracă diferite aspecte morfologice (57): celule intraepidermice izolate fără tendință la agregare, celule izolate aranjate liniar de-a lungul stratului bazal al epidermului, împrăștiere de tip pagetoid a limfocitelor în epiderm, mici colecții de 3-4 limfocite și grupuri mari de celule limfoide atipice localizate intraepidermic, denumite **microabcese Pautier**. Microabcesele Pautrier sunt definite ca grupuri bine delimitate de celule limfoide atipice, fără acumulare de plasmă sau fibrină și fără modificări citopatice semnificative în keratinocitele adiacente. Deși microabcesele Pautrier sunt considerate patognomonice pentru MF, acestea sunt observate relativ rar, fiind un indicator puțin sensibil (54,57,58). Un alt criteriu important de diagnostic în MF incipient este identificarea **limfocitelor aliniate în stratul bazal al epidermului** de-a lungul a câtorva creste interpapilare, în strânsă apozitie cu keratinocitele bazale (59).

Deoarece MF este o boală limfoproliferativă, criteriul de diagnostic “sine qua non” ar fi evidențierea **atipiilor citologice**. Acest deziderat este uneori dificil de obiectivat pe secțiunile microscopice convenționale. Infiltratul cu celule atipice este adesea însoțit și

diluat de prezența a numeroase limfocite reactive, non-neoplazice, și histiocite distribuite perivascular și interstițial sau în bandă, pe fondul unui derm papilar îngroșat, fibros. Atipiile citologice pot fi apreciate studiind forma și dimensiunile nucleilor celulelor limfoide. Membranele nucleare sunt de obicei neregulate, cu aspect hiperconvolut sau cerebriform, iar dimensiunea nucleilor este mai mare de 7 μ (diametrul unui eritrocit este de maxim 5 μ). Aceste limfocite au o cantitate scăzută de citoplasmă care adesea formează un halou în jurul nucleului, modificare considerată tipică pentru MF (54). Atipiile limfoide sunt cel mai lesne de evaluat la nivelul epidermului, spre deosebire de derm unde acestea sunt uneori strivite între fibrele colagene ale țesutului conjunctiv. Evidențierea atipiilor citologice are un rol pivotal în algoritmi de diagnostic ai MF incipient concepuți până în prezent (40,53-56).

3.3. Imunofenotip

Leziunile tipice de MF sunt alcătuite din limfocite cu imunofenotip de celulă T-helper matură, cu expresie CD3 și CD4 și absența CD8 (60). Uneori poate fi observat un imunofenotip aberant, reprezentat de pierderea unui marker de suprafață exprimat de celulele T în condiții fiziologice, precum CD2, CD5, CD7 și lanțul β al TCR (β F1), care semnifică o celulă mai imatură și sugerează proliferarea limfomatoasă (61). Este posibilă chiar o atenuare evidentă sau diminuare a expresiei CD3 în celulele tumorale epidermotrope în comparație cu celulele T reactive intradermice (62). Trebuie ținut cont însă de faptul că pierderea expresiei CD7 este mai puțin specifică pentru MF, fiind frecvent observată și în dermatoze inflamatorii (63).

O scădere a expresiei acestor markeri poate fi estimată și prin evaluarea comparativă a celulelor limfoide de la nivel dermic și epidermic. Se poate observa o discordanță a expresiei imunofenotipice între cele două compartimente, în sensul în care expresia antigenelor este deficitară în celulele limfoide restricționate în epiderm. Discordanța dermo-epidermică pentru CD2, CD3, CD5 și/sau CD7 sugerează diagnosticul de MF.

Imunofenotiparea secțiunilor biopsice cu CD8, marker de celulă T citotoxică, și CD4, marker de celulă T helper, permite estimarea raportului între cele două populații. Dermatozele inflamatorii sunt întotdeauna alcătuite dintr-un mix de celule T CD4+ și CD8+, cu un raport CD4/CD8 de cca. 3-4/1 (64). În consecință, un număr foarte scăzut de celule T CD8+ sau absența completă a expresiei CD8 în celulele T intradermice sau intraepidermice poate fi un indiciu important pentru diagnosticul de MF. Uneori celulele tumorale din MF sunt pozitive pentru CD8, astfel că se observă un raport inversat, în favoarea CD8 (65).

Expresia CD30 este prezentă în 40-50% dintre cazurile de MF transformat (66). Un grad crescut de expresie a CD30 se poate observa la toți pacienții cu MF, nu numai la cei cu MF transformat.

3.4. Anomalii moleculare

Rearanjările clonale ale genei receptorului T (TCR) pot fi detectate folosind metoda de amplificare PCR sau secvențierea de înaltă performanță (high-throughput sequencing, HTS) (67). Testele de rearanjare clonală sunt folosite în principal atunci când examenul histologic și imunofenotiparea determină rezultate neconcludente, la pacienți cu tablou

clinic înalt sugestiv pentru MF, de exemplu în cazul pacienților eritrodermici, la care morfologia este de obicei non-diagnostică. Acuratețea metodei crește dacă sunt examinate mai multe biopsii recoltate de la același pacient, simultan sau la distanță de timp, din zone anatomice distincte, situație în care poate fi demonstrată aceeași rearanjare clonală a TCR (68,69).

Trebuie ținut cont de faptul că prezența rearanjării clonale a genei TCR la nivelul clonelor celulelor T nu este specifică diagnosticului de MF. Această anomalie este mai degrabă un criteriu în plus care favorizează diagnosticul de MF. Există situații, neasociate cu o proliferare limfoidă malignă, în se poate observa o clonalitate a celulelor T (50,70). De exemplu, în anumite afecțiuni cutanate benigne sau premaligne se poate identifica proliferarea unei clone limfocitare T: dermatoza purpurică pigmentată, paniculita lobulară limfocitară atipică, hiperplazia siringolimfoidă cu alopecie, mucinoza foliculară idiopatică și pitiriazisul lichenoid, printre altele (45,71). De asemenea, clone ale celulelor T citotoxice pot fi detectate ocazional în sângele periferic al pacienților vârstnici (72).

Un prim test de clonalitate cu rezultat negativ nu exclude neapărat diagnosticul de MF. Rezultate fals negative pot fi obținute atunci când celulele T neoplazice sunt în minoritate și sunt însoțite de un infiltrat bogat în limfocite T reactive, astfel încât clona tumorală nu poate fi izolată (73). De asemenea, trebuie ținut cont de faptul că primerii PCR nu au capacitatea de a amplifica toate rearanjările posibile ale genei TCR. În funcție de stadiul bolii, în numai 50-90% dintre cazurile de MF se poate identifica o populație clonală de celule T (74,75). Rezultate fals pozitive, respectiv detectarea unei populații de celule T clonale în leziuni inflamatorii, pot fi observate în până la 17% dintre afecțiunile cutanate reactive (75).

Fig 10. Algoritmul ISCL pentru diagnosticul MF incipient: A. Criterii clinice. B. Criterii histopatologice. C. Criteriul biomolecular D. Criterii imunohistochimice. Pentru diagnosticul pozitiv de MF este necesară cumularea a cel puțin 4 puncte.

3.5. Diagnostic pozitiv

ISCL în colaborare cu EORTC au propus un algoritm pentru diagnosticul și stadializarea MF incipient, bazat pe criterii clinice, histopatologice, moleculare și imunopatologice (40,76). Conform algoritmului, se acordă câte un anumit număr de puncte pentru fiecare categorie de date: clinice, histopatologice, biomoleculare și imunopatologice. Diagnosticul de MF poate fi formulat atunci când sunt întrunite cel puțin 4 puncte.

3.6. Diagnostic diferențial

Din punct de vedere microscopic, un infiltrat cu celule limfoide epidermotrope nu este specific MF, ci poate fi observat în diferitele dermatoze inflamatorii. Printre acestea se numără pitiriazisul lichenoid, pitiriazisul rozat Gibert, dermatozele lichenoidale în general, erupții postmedicamentoase, lichen scleroatrofic, vitiligo în stadiul inflamator, reticuloidul actinic și eritrodermia de natură reactivă (77).

Un criteriu important pentru MF este prezența epidermotropismului fără modificări epidermice concomitente. Singura modificare epidermică observată în mod uzual pe biopsiile din pete sau plăci de MF este prezența unor benzi de parakeratoză sau scuamocruste, alte manifestări precum spongioza marcată, un aspect de dermatită de interfață lichenoidă cu keratinocite apoptotice, vacuolizare a keratinocitelor de la joncțiunea dermo-epidermică sau hiperplazia epidermică marcată fiind mai degrabă rare (77). Modificările epidermice hiperplazice reprezentate de acantoză și hiperkeratoză marcate sunt neobișnuite pentru MF și se observă mai degrabă în psoriazis vulgar sau pitiriazis rubra pilaris. Când se observă extravazare a eritrocitelor, pot fi luate în discuție pitiriazisul rozat și pitiriazisul lichenoid. O altă modificare în defavoarea MF în stadiile incipiente este prezența unui număr crescut de eozinofile în infiltrat, criteriu considerat un indicator al naturii inflamatorii a afecțiunii (78).

Alinierea bazală a celulelor T se observă foarte rar în afecțiuni inflamatorii, de obicei în acelea în care celule T autoreactive atacă keratinocitele bazale sau melanocitele, ca în vitiligo sau lichen scleroatrofic (77,79). Demarcarea acestor dermatoze este posibilă dacă modificările histopatologice sunt evaluate în contextul tabloului clinic. Microabcese Pautrier pot fi și ele simulate de agregate intraepidermice sub formă de mici grupuri de celule Langerhans CD1a pozitive, care formează microabcese pseudopautrier, descrise în dermatita de contact (80,81). Acestea reprezintă colecții de celule mononucleare non-limfoide cu histologie histiocitară.

3.7. Relația dintre mycosis fungoides și parapsoriazis

În afară de dermatoze inflamatorii pentru care există criterii clinice și histopatologice pentru diferențierea de MF, cum sunt diferitele reacții eczematoase, dermatozele cu pattern lichenoid de inflamație, pitiriazisul lichenoid și erupțiile postmedicamentoase (77), principala condiție care ridică dileme reale de diagnostic și prognostic dermatologilor și anatomopatologilor în evaluarea pacienților cu suspiciune de MF incipient este așa numitul **parapsoriazis în plăci**, entitate a cărie demarcare clinică și histomorfologică nu este în totalitate înțeleasă. Din punct de vedere clinic, atât

parapsoriasisul cât și MF incipient se prezintă cu leziuni de tip pată sau placă ușor scuamoase, refractare, cu evoluție de lungă durată (49). Parapsoriasisul este definit de unii autori ca fiind o boală inflamatorie reactivă diferită de MF, în timp ce alții consideră parapsoriasisul o fază inițială de MF. A fost descrisă în mai multe instanțe o tranziție clinico-patologică clară între aceste două condiții (82-85), ceea ce este în acord cu teoria care sugerează existența unei zone de gri din punct de vedere biologic între dermatozele inflamatorii non-neoplazice și MF (50).

Unii autori folosesc termenul de parapsoriasis exclusiv pentru o afecțiune cutanată în care nu sunt prezente criterii solide de limfom cutanat, ca de exemplu clonalitate, imunofenotip aberant, microabcese Pautrier, infiltrate neoplazice epidermotrope. Majoritatea pacienților cu parapsoriasis definiți pe baza acestor criterii nu dezvoltă niciodată un limfom cu manifestări inechivoce (82). Cu toate acestea, la o mică parte dintre acești pacienți cu parapsoriasis, pentru care nu se poate emite un diagnostic cert de MF folosind metodele de diagnostic disponibile și în acord cu criteriile de diagnostic existente, caracterele de malignitate ale bolii vor deveni manifeste odată cu progresia bolii (86).

Capitolul 4 – Stadializare și prognostic

4.1. Stadializarea TNMB

Sistemul standard de clasificare a MF și SS este sistemul TNMB, care se bazează pe evaluarea tegumentelor (T), ganglionilor limfatici (N), organelor viscerale (M) și sângelui periferic (B) (76). Evaluarea standard a pacienților include o examinare amănunțită a pielii (inclusiv scalp, palme, tălpi, perineu) cu biopsie cutanată din leziuni, hemograma completă cu numărarea celulelor Sézary, biochimie de rutină ce include măsurarea nivelului de lactat dehidrogenază și radiografie toracică. Biopsia de ganglion limfatic este necesară doar la pacienții cu limfadenopatie.

La examinarea completă a pielii, leziunile cutanate se clasifică în pete, papule, plăci sau tumori, după cum urmează (87):

- Pată – leziune de orice dimensiune, fără indurație sau elevație semnificativă în raport cu tegumentul adiacent.
- Placă – orice leziune elevată sau indurată; pot fi prezente cruste, ulceratie sau poikilodermie.
- Tumoră – Orice leziune solidă sau nodulară cu diametrul mai mare de 1 cm, cu infiltrare profundă și/sau creștere pe verticală.

4.2. Prognostic

Evoluția MF este variabilă. Unii pacienți suferă doar afectare cutanată care fluctuează ca intensitate în timp, inclusiv cu perioade de remisiune completă. Cei cu afectare mai generalizată sau multiple tumori sunt mai predispuși la diseminarea extracutanată a bolii și au un prognostic prost. Cel mai important predictor este stadiul clinic, definit prin criteriile TNMB. Alți factori care determină un prognostic prost includ transformarea în

variantele cu celularitate mare și varianta foliculotropică a MF.

Factorii cei mai importanți care influențează stadializarea clinică sunt tipul, extensia leziunilor cutanate și afectarea extracutanată. Majoritatea factorilor de prognostic în MF nu au fost evaluați prin studii prospective. Am sumarizat concluziile studiilor retrospective și de cohortă care au urmărit evaluarea evoluției pacienților cu MF (48,88-93):

- Pacienții în stadiul de pată/placă cu afectare <10% din suprafața corporală (stadiul IA) au un prognostic excelent, cu speranța de viață pe termen lung similară cu a populației de aceeași vârstă, rasă și sex. Riscul de progresie al bolii către stadii mai avansate este scăzut.
- Pacienții cu erupție în pete/plăci mai mai extinsă, fără afectare extracutanată (stadiul IB sau IIA) au o durată medie de supraviețuire mai mare de 11 ani. Aproximativ un sfert vor progresa către stadii mai avansate și cca. 20% decedează din cauza bolii.
- Pacienții cu tumori cutanate și cei cu eritrodermie generalizată, fără afectare extracutanată (stadiul IIB sau III) au o durată medie de supraviețuire de 4 până la 6 ani. Majoritatea acestor pacienți decedează din cauza bolii.
- Pacienții cu afectare extracutanată la prezentare ce interesează ganglionii limfatici sau organele viscerale (stadiul IVA sau IVB) au un prognostic prost cu durată medie de supraviețuire mai mică de 4 ani.

Capitolul 5 – Ipoteza de lucru și obiectivele generale

Diagnosticul de Mycosis fungoides în fazele incipiente este complex, fiind un proces care necesită o interpretare integrată a datelor obținute din investigații clinice, histopatologice, imunohistochimice și biomoleculare. Incertitudinea diagnosticului la evaluarea biopsiilor obținute din leziunile suspecte de MF incipient este o problemă frecvent întâlnită în dermatopatologie. Nu de puține ori, în practica histopatologică, atunci când sunt evaluate biopsii obținute din leziuni suspecte clinic ca fiind de MF incipient, lipsa modificărilor specifice determină incertitudini asupra rezultatului histopatologic final (Ex. „Aspect inflamator nespecific, sugerăm repetarea biopsiei” sau „Dermatită spongiotică, fără a putea exclude o leziune de MF” sau „Aspect sugestiv pentru parapsoriasis sau MF. Modificările vor fi interpretate în context clinic adecvat...” etc).

Din punct de vedere clinic, pacienții cu MF se prezintă în general la dermatolog cu leziuni cutanate de forme și dimensiuni variate, de obicei cu aspect de pete care progresează gradual, se transformă în plăci și eventual tumori. În aceste stadii incipiente de pete și plăci prognosticul este în general favorabil, însă unele cazuri suferă diseminare sistemică cu afectarea ganglionilor limfatici și a organelor interne (94).

Deoarece morfologia leziunilor cutanate este variabilă, acestea pot fi eronat considerate dermatoze benigne, ceea ce poate duce la întârzierea instituirii măsurilor terapeutice sau instituirea unor tratamente neadecvate. Mai multe studii au indicat MF drept un imitator al unei pleiade de afecțiuni inflamatorii cutanate, cu caractere eczematoase, psoriaziforme și lichenoidale (95,96). În asemenea situații, incertitudinea

diagnosticului se menține inclusiv la nivel microscopic deoarece infiltratul reactiv este în cantitate mai mare ca populația de celule limfomatoase.

În acest studiu am urmărit caracterizarea modificărilor histopatologice și imunohistochimice în MF incipient, prin analiza biopsiilor cutanate prelevate de la o serie de pacienți români cu MF, diagnosticați într-un centru terțiar, cu scopul de a cataloga frecvența și semnificația diferiților parametri folosiți pentru diagnosticul MF. Biopsiile au fost obținute retrospectiv din leziuni incipiente de tip pete și plăci, iar modificările au fost comparate cu cele observate pe biopsii prelevate din leziuni de dermatoze inflamatorii care mimează MF incipient din punct de vedere histopatologic. Studiul s-a axat pe 3 linii mari:

1. Studiul modificărilor histomorfologice induse de prezența infiltratului limfomatos la nivelul cutanat, respectiv caracterizarea modificărilor cutanate microanatomice induse de prezența infiltratului limfoid în compartimentele dermic și epidermic.
2. Studiul imunohistochimic al infiltratului limfoid și caracterizarea expresiei imunofenotipice a celulelor tumorale limfomatoase, respectiv a populației de limfocite reactive.
3. Identificarea particularităților histopatologice și imunofenotipice ale cazurilor cu progresie.

De asemenea, prin folosirea unui lot de control reprezentat de pacienți cu afecțiuni non-linfomatoase care mimează MF, am urmărit identificarea elementelor cu potențial discriminatoriu între leziunile de MF incipient și diferitele dermatoze inflamatorii reactive care apar în diagnosticul diferențial al MF incipient.

Capitolul 6 – Materiale și metodă

Pacienți și controale

În vederea realizării studiului am efectuat o căutare avansată în arhivele Spitalului Clinic Colentina, prin care am urmărit identificarea tuturor biopsiilor diagnosticate cu MF în Serviciul de Anatomie Patologică. Intervalul de căutare a fost Septembrie 2009 – August 2014. Pentru studiu au fost selectate doar cazurile care au întrunit un diagnostic definitiv de MF în concordanță cu criteriile recomandate de Societatea Internațională pentru Limfoame Cutanate (ISCL) (40). Fiecare caz inclus în studiu a necesitat prezența în arhiva Serviciului de Anatomie Patologică a unei biopsii dintr-o leziune de tip placă sau pată. Cazurile selectate au fost urmărite în evoluție între 1 și 6 ani, datele fiind extrase din foile de observație ale pacienților. Au fost excluse biopsiile din leziuni tumorale de MF și din variante particulare de MF precum MF foliculotrop, MF granulomatos sau MF cu imunofenotip neobișnuit (CD8+, transformare CD30+ etc.) Datorită naturii controversate a diagnosticului de parapsoriasis, au fost excluse toate cazurile de parapsoriasis în plăci mici returnate în urma căutării în dosarele electronice. Cazurile de parapsoriasis în plăci mari au fost asimilate lotului de studiu dacă au întrunit scorul minim ISCL (40).

Ca regulă, în fiecare caz studiat, diagnosticul final de MF a fost stabilit prin corelarea modificărilor histopatologice cu aspectul clinic și evoluția manifestărilor cutanate. Informațiile au fost obținute din foile de observație, în urma discuțiilor cu medicul dermatolog curant și folosind fotografiile ale leziunilor obținute în timpul examenului clinic. În cazurile în care au fost disponibile mai multe biopsii cutanate recoltate la intervale diferite de timp de la același pacient, toate au fost incluse în studiu.

Pentru comparație, a fost alcătuit un grup de control care a inclus biopsii recoltate de la pacienți cu diferite afecțiuni dermatologice cu caractere spongiotice, lichenoidale sau psoriaziforme. Ca regulă, toate cazurile control au inclus în descrierea histopatologică, conform rezultatului biopsiei, elemente sugestive pentru MF incipient, însă în toate aceste cazuri diagnosticul de MF a fost exclus pe baza tabloului clinic și a evoluției ulterioare. De asemenea, pentru niciunul dintre aceste cazuri nu au fost îndeplinite criteriile ISCL de diagnostic (40) la momentul biopsiei sau ulterior. Am selectat preponderent entități care se manifestă prin reacție epidermotropă (mimetism histologic), dar și dermatoze psoriaziforme și eczematoase (mimetism clinic):

- *dermatita atopică*
- *dermatita de contact limfomatoasă*
- *erupții postmedicamentoase limfomatoase*
- *erupții postmedicamentoase lichenoidale*
- *dermatoze purpurice pigmentare*
- *lichen sclero-atrofic*
- *lichen simplex cronic*
- *reticuloid actinic (dermatită actinică cronică)*
- *pitiriazis lichenoid cronic*
- *psoriazis vulgar*
- *pitiriazis rubra pilar.*

Analiza criteriilor de diagnostic histopatologic

Toate preparatele histopatologice colorate HE au fost randomizate și examinate aleatoriu, în orb, folosind un microscop Olympus BX43. Am urmărit multiple criterii histopatologice, grupate în 5 categorii, după cum urmează:

A. Reacția epidermului

- *spongiotica*
- *psoriaziforma*
- *dermatita de interfata*
- *atrofie epidermica*
- *parakeratoza*

B. Epidermotropismul

- *limfocite izolate*
- *alinieră bazală*
- *epidermotropism pagetoid*
- *colecții Pautrier*

- *exocitoza disproportionata*

C. Atipiile limfocitare

- *limfocite cerebriforme*
- *halou limfocitar*
- *hipercromazie nucleara*
- *hipertrofie nucleara*
- *atipii limfocitare dermice*

D. Reacția dermică

- *fibroză dermică superficială*
- *edem dermic*
- *extravazari hematice*
- *depozite de pigment*

E. Infiltratul limfoid dermic

- *lichenoid*
- *perivascular*
- *prezența eozinofilelor*
- *prezența plasmocitelor*

Fiecare criteriu a fost evaluat semicantitativ și înregistrat ca fiind absent (-) sau prezent (+), dacă s-a putut observa pe o întindere de minim 25% din suprafața epidermică a unei secțiuni. Dacă un criteriu histopatologic a fost prezent doar focal sau în multiple focare care au totalizat mai puțin de 25% din suprafața epidermică a secțiunii, criteriul respectiv a fost considerat absent (-). Am folosit un sistem diferit pentru cuantificarea prezenței unor anumite componente celulare la nivelul infiltratelor dermice, și anume eozinofile și plasmocite. Acestea au fost considerate prezente (+) când au putut fi identificate minim 5 celule într-o secțiune tisulară.

Analiza statistică a datelor a fost realizată folosind Microsoft Office Excel 2013 și un claculator online (<http://www.socscistatistics.com>) pentru calcularea scorului z aferent fiecărui criteriu. Scorul z a fost convertit ulterior la valoarea p, iar rezultatele au fost considerate statistic semnificative pentru $p < 0,05$.

Analiza expresiei imunofenotipice a infiltratelor tumoral și reactiv

Am analizat expresia următorilor markeri imunofenotipici de linie limfoidă pe biopsiile din cele două loturi, țintă și control: CD2, CD3, CD4, CD5, CD7, CD8, CD20 și CD30. De asemenea, am analizat distribuția celulelor Langerhans în derm și epiderm folosind markerii S100, CD1a și Langerin. Pentru dezvoltare am folosit anticorpi secundari și complex straptavidină din kitul Leica Novolink, cu cromogen DAB lichid (Leica). Colorațiile IHC au fost efectuate manual, respectând prevederile Ghidurilor de practică medicală pentru specialitatea Anatomie Patologică (Ordinul Ministrului Sănătății nr. 1217/2010).

Algoritmi de investigare a expresiei imunofenotipice

Am investigat separat expresia semicantitativă a markerilor de linie limfoidă în infiltratul dermic, și respectiv la nivelul epidermului, în limfocitele epidermotrope. În acest scop am folosit următoarea scară de raportare: absența expresiei (-), expresie în celule izolate (-/+), expresie difuză în mai puțin de jumătate din celulele din infiltrat (+) și expresie difuză în peste jumătate din celulele din infiltrat (++). Au fost analizați markerii pan-T (CD5, CD2 și CD3), markerii de subset CD4 și CD8 și markerul CD7, exprimat de majoritatea celulelor T. Semicuantificarea expresiei antigenice a fost efectuată pentru fiecare dintre compartimentele epidermic (**E**), dermic (**D**) și global (**E+D**). Am urmărit astfel să cuantific **discordanța expresiei antigenice** între compartimentele **D** și **E**, la o diferență prag de expresie de minim 30% între cele două. De asemenea, am definit **restricția antigenică** ca fiind expresia unui marker în mai puțin de 50% dintre celulele infiltratului și am cuantificat acest parametru. În cazul markerilor de subset CD4 și CD8, a căror sumă este în mod normal egală cu numărul total al limfocitelor T, am folosit suma expresiei lor pentru cuantificarea discordanței, respectiv a restricției. De asemenea, am cuantificat subseturile de celule T intraepidermice, CD4+ și CD8+, pentru a obține un raport între cele două populații de celule T helper și T citotoxice și a investiga dacă există vreo corelație între raportul expresiei markerilor de subset și diagnosticul de MF. Pentru compararea datelor derivate din cele două populații am utilizat testul t-Student clasic.

În ceea ce privește celulele prezentatoare de antigen, am examinat distribuția și densitatea celulelor Langerhans la nivelul infiltratelor limfoide din grupul țintă, respectiv din grupul control. Celulele Langerhans sunt celule prezentatoare de antigen cu rol imunomodulator împotriva patogenilor și tumorilor cutanate, iar expresia acestora ar putea avea rol discriminator între procesele limfomatoase incipiente și dermatozele inflamatorii sau reactive. Pentru identificarea celulelor Langerhans am folosit anticorpi anti-S100 și CD1a. Am gradat prezența și numărul celulelor Langerhans astfel: **a. Compartimentul epidermic:** celule izolate (+), celule izolate cu distribuție continuă (++) și agregate confluențe (+++). **b. Compartimentul dermic:** celule izolate (+), grupuri celulare cu aspect nodular (++) și grupuri celulare cu aspect arahnoid (+++).

Analiza statistică a expresiei imunofenotipice a fost făcută după același procedeu descris pentru evaluarea criteriilor histopatologice.

Identificarea factorilor implicați în progresia bolii

La un an distanță de la data limită de selecție a cazurilor pentru studiu, respectiv în septembrie 2015, am obținut date privind situația clinico-evolutivă a pacienților din grupul țintă, cu scopul de a identifica potențiali factori tisulari de progresie. Datele privind evoluția au fost culese direct de la medicul dermatolog curant sau prin consultarea foilor de observație din arhiva Spitalului Clinic Colentina.

Am comparat modificările histologice și imunofenotipice ale progresorilor cu cele prezente în grupul de cazuri staționare clinic, în încercarea de a alcătui un model prognostic care să permită identificarea pacienților cu leziuni incipiente de MF cu risc de progresie.

Capitolul 7 – Rezultate

7.1. Componenta loturilor țintă și control

Căutarea inițială în baza de date a Serviciului de Anatomie Patologică folosind termenii “mycosis fungoides”, “micozis fungoides”, “parapsoriasis” și “limfom cutanat” a generat **146 de cazuri** înregistrate pe o durată de 5 ani, în perioada septembrie 2009 – august 2014. După ce au fost excluse cazurile de parapsoriasis în plăci mici și cazurile care nu s-au încadrat în definiția MF incipient (leziuni tumorale, eritrodermie, MF foliculotrop, mucinoză foliculară, “granulomatous slack skin” și alte tipuri de discrazii și limfoame cutanate cu celule T), a rezultat un **lot inițial de 73 pacienți** cu suspiciune de MF histopatologică. Dintre aceștia, prin aplicarea criteriilor ISCL pentru diagnosticul MF incipient, a rezultat un **lot final de 37 pacienți** care au întrunit criteriile de incluziune în grupul țintă, de la care au fost disponibile **47 biopsii** obținute din leziuni de tip pată/placă. Tot din același interval de timp au fost selectate 30 de biopsii obținute de la 30 pacienți cu diferite afecțiuni care mimează MF incipient atât clinic, cât și histopatologic, care au întrunit criteriile de incluzie în grupul control, așa cum au fost descrise mai sus. Grupul control a fost astfel alcătuit din următoarele entități cu diferite modificări histopatologice întâlnite și MF incipient: diferite dermatite eczematoase, inclusiv dermatita atopică (13 cazuri, 44%), dermatita de contact limfomatoidă (1 caz, 3%), erupția postmedicamentoasă limfomatoidă (1 caz, 3%), dermatita purpurică pigmentată (1 caz, 3%), lichen scleros (3 cazuri, 10%), lichen simplex cronic (3 cazuri, 10%), reticuloid actinic (1 caz, 3%), pitiriazis lichenoid cronic (3 cazuri, 10%), pitiriazis rubra pilar (1 caz, 3%) și psoriazis vulgar (3 cazuri, 10%) (Tabelul 8).

7.2. Date demografice

Vârsta medie a pacienților cu MF a fost 56,4 ani, iar mediana 60 ani. Extremele de vârstă ale acestor pacienți în grupul țintă au fost de 25, respectiv 81 ani. Dintre aceștia, 19 pacienți (51,3%) aveau o vârstă de peste 60 ani la momentul biopsiei. Vârsta medie a pacienților cu afecțiuni care imită MF a fost 54,1 ani, cu o mediană de 57,5 ani și un interval cuprins între 24-82 ani.

Spre comparație, procentul de vârstnici (peste 60 ani) în România, conform recensământului din 2002, este de 19,4%. În aceste condiții, ponderea crescută a persoanelor vârstnice în grupul țintă este semnificativă statistic ($p < 0,05$).

Grupul țintă a fost alcătuit din 24 pacienți de sex masculin (65%) și 13 pacienți de sex feminin (35%), în timp ce grupul control a fost format din 14 bărbați (47%) și 16 femei (53%). Sex ratio în grupul țintă este M:F=1,84:1 (aproape cu 85% mai mulți bărbați afectați). În România, raportul dintre bărbați și femei (stabilit la recensământul din 2002) este de 1000 bărbați la 1051 femei. În aceste condiții, diferența identitificată este semnificativă statistic ($p < 0,05$). În schimb, se observă o pondere mai crescută a pacienților de sex feminin în grupul dermatozelor inflamatorii care mimează MF.

7.3. Modificări histopatologice în leziunile incipiente

7.3.1. Reacția epidermului

Au fost observate modificări histopatologice la nivelul epidermului în ambele loturi de biopsii. Cea mai frecvent întâlnită modificare este prezența parakeratozei, manifestată ca o bandă fină de keratină cu reținerea nucleilor keratinocitelor exfoliate. Parakeratoza semnifică un proces de reînnoire accelerată a epidermului și a fost observată în 40 de biopsii de MF, din totalul de 47 examinate (85,1%). Din totalul de 30 biopsii de dermatoze inflamatorii, parakeratoza a fost prezentă în doar 19 cazuri (63,3%, $p=0,02$).

Reacția epidermului				
	MF N = 47	Cazuri control N = 30	z value (nivel de confidență 95%)	P value
Spongioză	17 (36.1%)	12 (40%)	-0.33	0.72
Hiperplazie psoriaziformă	14 (29.7%)	20 (66.6%)	-3.17	0.001
Dermatită de interfață	11 (23.4%)	6 (20%)	0.35	0.72
Atrofia epidermului	6 (12.7%)	2 (6.6%)	0.85	0.39
Parakeratoză	40 (85.1%)	19 (63.3%)	2.2	0.02

Spongioza, modificare definită ca acumulare de lichid în spațiul extracelular la nivelul epidermului, care determină întinderea punților intercelulare dintre keratinocite și obiectivarea acestora (desmozomi) la microscopul optic, este în mod normal o caracteristică a dermatitelor eczematoase și un pattern histopatologic observat într-o multitudine de afecțiuni dermatologice inflamatorii. În studiul nostru, spongioza a fost observată într-o proporție similară în ambele grupuri, 17 biopsii de MF (36,1%), respectiv 12 biopsii din dermatoze inflamatorii (40%, $p=0,72$). Rezultatul este oarecum surprinzător și semnifică faptul că acest criteriu nu este unul discriminator între leziunile incipiente de MF și afecțiunile inflamatorii care mimează MF, preponderent de natură eczematoasă.

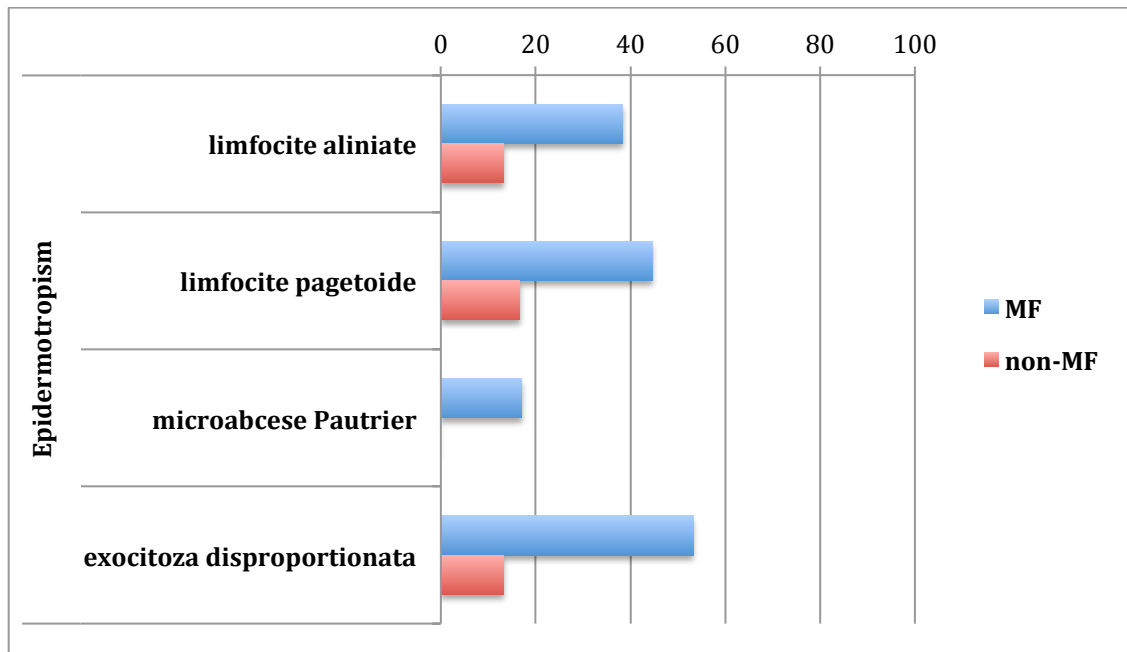
În anumite situații, epidermul reacționează la modificări patologice sau factori de agresiune externi printr-o capacitate rapidă de reînnoire. Diziviuirea accelerată a keratinocitelor determină îngroșarea epidermului, cu alungirea secundară a creștelor epidermice, protoripul acestei modificări fiind psoriazisul. Hiperplazia psoriaziformă nu este caracteristică psoriazisului și poate fi observată și în alte situații. În studiul nostru, hiperplazia psoriaziformă a fost observată în majoritatea cazurilor din grupul control (20 din 30 cazuri, 66,6%) și doar în 1 din 3 leziuni de MF incipient (14 biopsii din 47, 29,7%, $p=0,001$).

Alte modificări epidermice care pot fi observate în MF incipient sunt modificările de interfață manifestate prin vacuolizări ale keratinocitelor de la nivelul stratului bazal și

eventual necroză keratinocitară cu prezența de corpi coloizi, similari corpurilor Civatte din lichenul plan. Această modificare a fost întâlnită în procente relativ egale în cele două grupuri (23,4% dintre biopsiile de MF, 20% dintre cazurile control, $p=0,72$). Atrofia epidermică, specifică leziunilor de lupus eritematos cutanat cronic și lichen sclero-atrofic, a fost întâlnită într-o minoritate din biopsiile studiate (12,7% din biopsiile de MF, respectiv 6,6% din biopsiile de control, $p=0,39$), fără semnificație statistică. În general, aceste modificări au fost prezente pe suprafață limitată și au avut mai degrabă un caracter focal.

7.3.2. Epidermotropismul

Tabelul 10. Forme de epidermotropism				
	MF N = 47	Cazuri control N = 30	z value (nivel de confidență 95%)	P value
Limfocite aliniat bazal	18 (38.3%)	5 (16.6%)	2.02	0.04
Limfocite pagetoide	21 (44.7%)	6 (20%)	2.21	0.02
Microabcese Pautrier	8 (17%)	0 (0%)	2.38	0.01
Exocitoză disproporționată	25 (53.2%)	5 (16.6%)	3.2	0.001



Epidermotropismul semnifică unui număr crescut de limfocite la nivelul epidermului, fără alte modificări specifice induse în mod normal de prezența lor în acest compartiment, precum spongioza sau necroza keratinocitară. Limfocitele epidermotrope se pot alinia la nivelul stratului bazal, pot fi dispersate aleatoriu în toată grosimea stratului spinos (epidermotropism de tip pagetoid), pot fi grupate în colecții de minim 3-5 limfocite (microabcese Pautrier) sau pot fi însoțite de spongioză, dar într-un grad relativ scăzut comparativ cu numărul de limfocite exocitate (exocitoză disproporționată). În studiul nostru, toate formele de epidermotropism au fost observate în proporții mai mici sau mai mari în cadrul grupului țintă: limfocite bazale - 18 biopsii (38,3%), limfocite pagetoide - 21 biopsii (44,7%), microabcese Pautrier - 8 biopsii (17%) și exocitoză disproporționată - 25 biopsii (53,2%). Nicio formă de epidermotropism nu a fost observată cu o frecvență mai mare de 20% în biopsiile din grupul control, iar diferența între cele două grupuri este semnificativă statistic pentru toate formele de epidermotropism (Tabelul 10).

Prezența epidermotropismului, indiferent de subtipul identificat, a fost observată în 44 biopsii din grupul MF (93,6%), față de 14 din 30 biopsii control (46,6%, $p < 0,0001$). Microabcese Pautrier au fost observate numai în biopsii de MF, fiind astfel 100% specifice pentru MF în studiul nostru. Sensibilitatea lor pentru diagnostic este însă scăzută, acestea fiind observate în numai 8 biopsii dintr-un total de 47 (17%).

7.3.3. Atipii limfocitare

În general atipiile citologice sunt modificări specifice care permit identificarea microscopică a proceselor neoplazice sau precanceroase (displazice). În cazul MF incipient, capacitatea observatorului de a identifica modificări morfologice de formă și dimensiuni ale nucleilor limfocitelor din infiltratul dermic sau epidermotrop at putea permite în mod teoretic susținerea diagnosticului de limfom cutanat.

În această categorie au fost urmărite mai multe tipuri de modificări citologice: aspectul cerebriform, convolut al nucleilor limfocitelor, hipercromazia nucleară, hipertrofia nucleară și prezența de limfocite atipice inclusiv la nivelul infiltratelor din derm. Sub niciuna dintre aceste forme frecvența cu care s-au observat atipii nu a depășit un sfert din totalul cazurilor de MF. Cea mai utilă modificare cu rol discriminatoriu între biopsiile din grupul țintă și grupul control a fost prezența de limfocite hipertrofice,

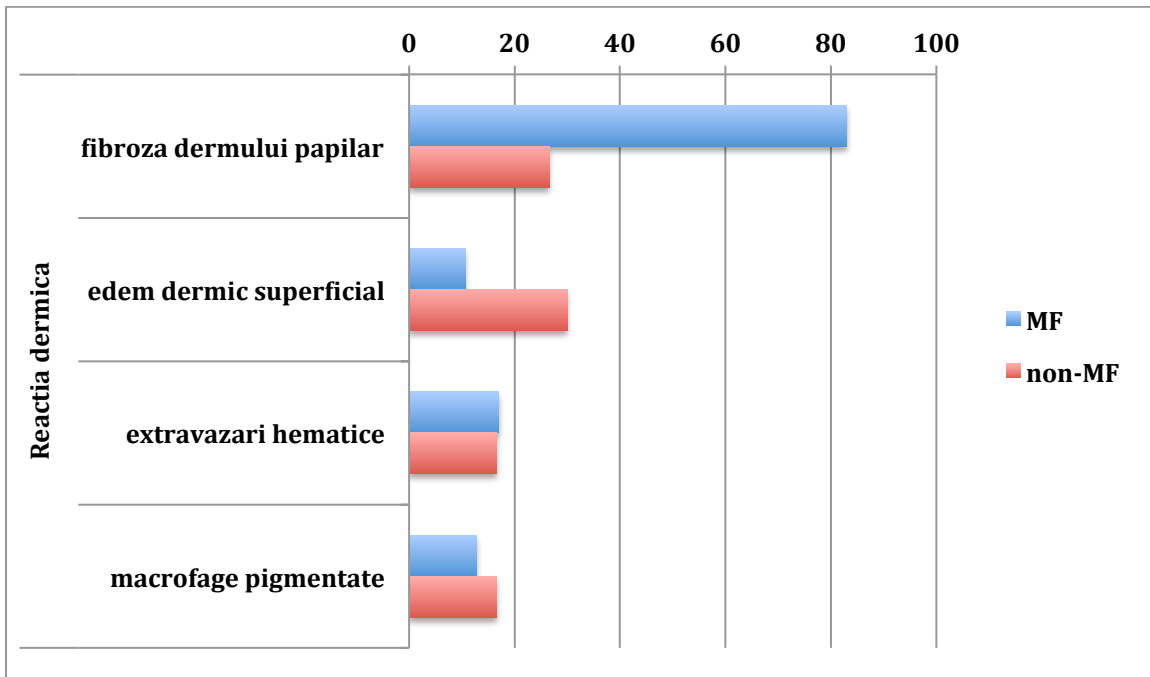
Tabelul 11. Atipii citologice limfocitare

	MF N = 47	Cazuri control N = 30	z value (nivel de confidență 95%)	P value
Nuclei cerebriformi	2 (4.2%)	0 (0%)	1.12	0.25
Limfocite cu halou	12 (25.5%)	7 (23.3%)	0.21	0.82
Hipercromazie	3 (6.4%)	0 (0%)	1.41	0.15
Hipertrofie limfocitară	12 (25.5%)	1 (3.3%)	2.53	0.01
Limfocite atipice dermice	1 (2.1%)	0 (0%)	0.8	0.42

observată în 12 din 47 biopsii MF (25,5%) vs. 1 din 30 biopsii din grupul control (3,3%), $p=0,01$. Limfocitele cu halou nu au constituit o modificare specifică MF, acestea fiind observate cu frecvențe relativ similare în ambele grupuri (25,5% vs. 23,3%, $p=0,82$). Hiperchromazia nucleară și prezența de limfocite atipice la nivel dermic au fost apreciate în doar 3 cazuri de MF (6,4%), respectiv 1 caz MF (2,1%), însă aceste modificări nu au fost decelate în cazurile de dermatoze inflamatorii.

7.3.4. Reacția dermului

Tabelul 12. Reacția dermului				
	MF N = 47	Cazuri control N = 30	z value (nivel de confidență 95%)	P value
Fibroza dermului papilar	39 (82.9%)	8 (26.6%)	4.94	<0.0001
Edem dermic superficial	5 (10.6%)	9 (30%)	-2.14	0.03
Extravazări hematice	8 (17%)	5 (16.6%)	0.04	0.96
Macrofage pigmentate	6 (12.7%)	5 (16.6%)	-0.47	0.63



Prezența infiltratelor limfoide la nivelul dermului superficial poate determina modificări ale morfologiei și structurii dermice, reprezentate de fibroză a dermului papilar, edem al dermului papilar, purpură care semnifică extravazarea hematiilor în spațiul interstițial și prezența de macrofage pigmentate în infiltrat, fie ele siderofage sau melanofage. În studiul nostru am observat modificări fibrotice dermice superficiale în 39

de cazuri dintre cele 47 biopsii de MF (82,9%), față de doar 8 biopsii din grupul control (26,6%), $p < 0,0001$. Modificările fibrotice au fost cel mai adesea caracterizate de îngroșare a fibrelor de collagen, care în mod normal sunt subțiri și delicate, fibrilare, la nivelul compartimentului superficial al dermului. Din contră, edemul dermic a fost mai prevalent în cazul biopsiilor din grupul control, fiind observat în proporție de 30%, față de doar 10,6% dintre biopsiile MF ($p = 0,03$). Prezența extravazărilor hemactice și a macrofagelor pigmentate sunt evenimente observate cu o frecvență similară în cele două loturi (Tabelul 12).

7.3.5. Infiltratul dermic

Infiltratul dermic poate fi evaluat în funcție de arhitectură sau dispoziție (pattern), apreciat cel mai bine la magnificații de ordinul zecilor (low-power), precum și în funcție de componentele celulare, aspect care necesită examinare microscopică la magnificații de ordinul sutelor (high-power). În MF incipient și dermatozele inflamatorii, infiltratul este prezent în porțiunea superioară a dermului și se dispune perivascular sau sub forma unei benzi continue subepidermice (lichenoid). În studiul nostru am observat o dispoziție predominant lichenoidă a infiltratului în majoritatea biopsiilor din grupul țintă (34 din 47 biopsii, 72,3%), în timp ce în dermatozele benigne dispoziția lichenoidă a fost prezentă doar în 6 cazuri din totalul de 30 (20%), $p < 0,0001$. Din contră, organizarea predominant perivasculară a fost o caracteristică a dermatozelor inflamatorii, cu 24 biopsii din 30 manifestând acest pattern (80%), pe când în cazurile de MF incipient dispoziția perivasculară a fost observată în numai 42,5% din cazuri (20 biopsii din 47), $p = 0,001$.

În ceea ce privește compoziția infiltratului, prezența atipiilor limfocitare a fost descrisă mai sus. În acest subgrup de criterii a fost evaluată prezența altor elemente inflamatorii, și anume eozinofile și plasmocite. Eozinofilele au reprezentat constituenți ale infiltratului în ambele grupuri, ele fiind prezente în 6 cazuri de MF (12,7%), respectiv 7 cazuri de dermatoze inflamatorii (23,3%), fără diferență statistică între grupuri ($p = 0,22$). Prezența de plasmocite a reprezentat un eveniment excepțional, acestea fiind observate în doar 2 cazuri de MF (4,2%) și 0 cazuri control ($p = 0,25$).

Tabelul 13. Infiltratul dermic

	MF N = 47	Cazuri control N = 30	z value (nivel de confidență 95%)	P value
Dispoziție lichenoidă	34 (72.3%)	6 (20%)	4.48	<0.0001
Dispoziție perivasculară	20 (42.5%)	24 (80%)	-3.23	0.001
Eozinofile	6 (12.7%)	7 (23.3%)	-1.2	0.22
Plasmocite	2 (4.2%)	0 (0%)	1.14	0.25

7.4. Expresia imunofenotipică a infiltratelor tumoral și reactiv

Rezultatele analizei comparative de expresie imunofenotipică între grupurile țintă și control sunt sumarizate în Tabelul 14. Nu am observat discordanță dermo-epidermică în grupul dermatozelor inflamatorii pentru niciunul dintre markerii studiați. Trei dintre biopsiile din grupul control (10%) au prezentat restricție antigenică pentru CD7, acest marker fiind pozitiv în mai puțin de 50% din totalul limfocitelor T din infiltrat. Toate cele 3 cazuri au fost reprezentate de dermatite spongiotice. Spre comparație, am observat restricție antigenică pentru cel puțin unul dintre markerii pan-T (CD5 și/sau CD7) în 15 biopsii din grupul țintă (31,9%, $p=0,03$). Trei biopsii de MF (6,3%) au relevat dublă restricție CD5 și CD7, cu expresie pentru fiecare marker în mai puțin de 50% dintre celulele din infiltrat. Nu am observat în niciunul din cazurile țintă restricție antigenică pentru CD3, CD2 și CD4+CD8.

	GRUP ȚINTĂ (N=47)	GRUP CONTROL (N=30)	P value
RESTRICȚIE ANTIGENICĂ	CD7 = 14 cazuri CD5 = 4 cazuri CD5+CD7 = 3 cazuri	CD7 = 3 cazuri	$p = 0.03$
	Total = 15 cazuri, 31,9%	Total = 3 cazuri, 10%	
DISCORDANȚĂ DERMO- EPIDERMICĂ	CD7 = 5 cazuri CD5 = 4 cazuri CD5+CD7 = 2 cazuri		$p = 0.05$
	Total = 7 cazuri, 14.9%	0 cazuri	

Tabelul 14: Expresia imunofenotipică a markerilor de linie T

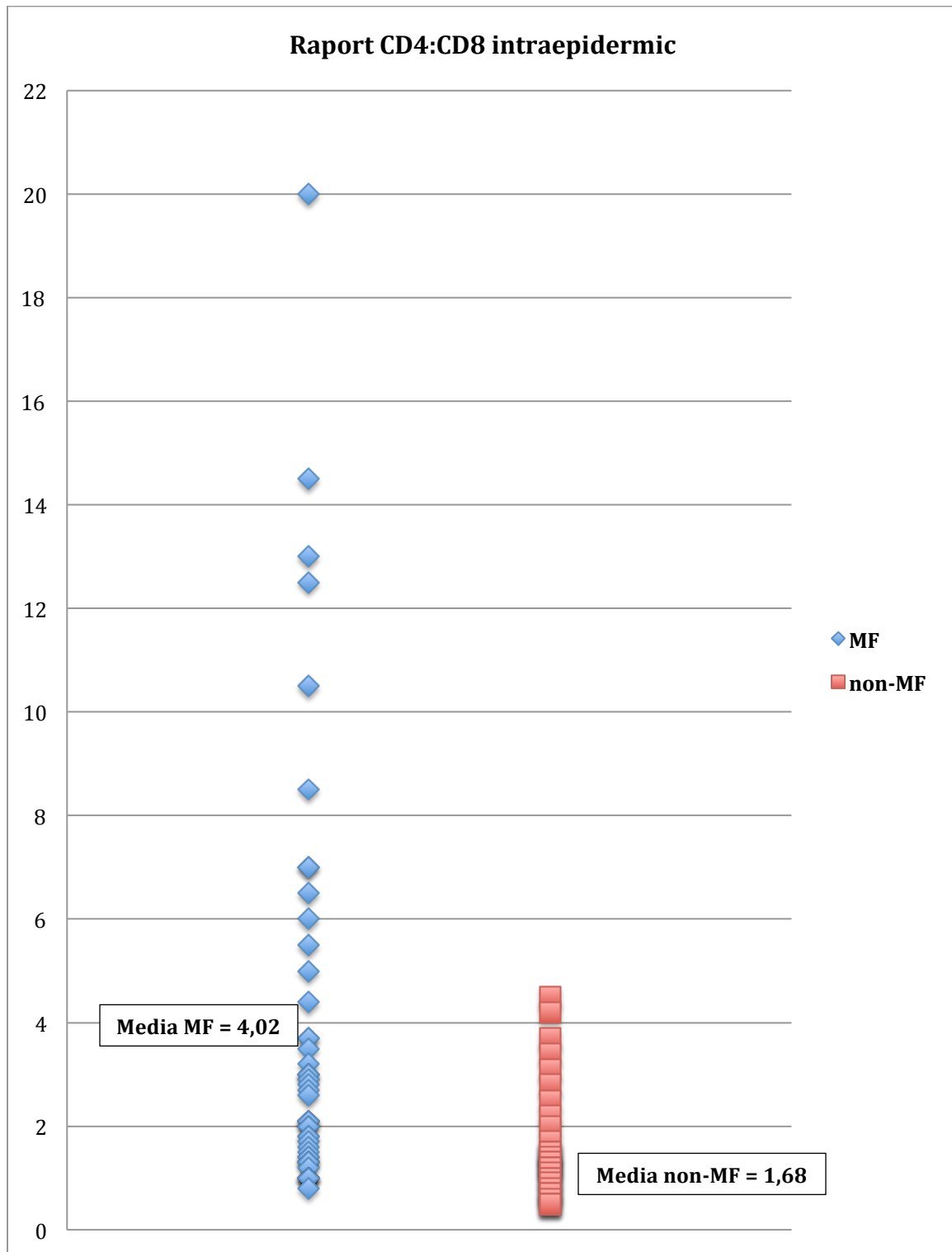
Discordanța dermo-epidermică a fost pusă în evidență într-un total de 7 cazuri de MF (14,9%, $p=0,05$). Cinci cazuri au fost discordante pentru CD7, iar două dintre acestea au fost discordante inclusiv pentru CD5. Alte două cazuri separate au manifestat discordanță numai pentru CD5, însă acestea au prezentat restricție antigenică pentru CD7 (absența imunomarcajului în ambele compartimente: epidermic și dermic). Astfel, discordanța dermo-epidermică este semnificativă statistic ($p=0,05$) și s-a observat cu specificitate de 100% în cadrul grupului țintă. Absența expresiei CD5 sau CD7 în cadrul cazurilor cu discordanță dermo-epidermică a fost întâlnită numai la nivelul limfocitelor epidermotrope. Nu s-a înregistrat discordanță de sens opus în niciunul dintre cazurile

examine (limfocite de la nivelul infiltratului dermic cu restricție clonală discordantă). Nu am observat discordanță de expresie dermo-epidermică a markerilor CD2, CD3 și CD4+CD8.

În urma cuantificării markerilor de subset T, am observat faptul că biopsiile din cazurile de MF au inclus mai multe limfocite CD4+ și mai puține limfocite CD8+ la nivelul epidermului, precum și un raport CD4:CD8 intraepidermic mai crescut, în comparație cu biopsiile din leziuni inflamatorii (Tabelul 15). Cazurile de MF au arătat o medie de 12,2 celule CD4+ per mm de epiderm, în timp ce biopsiile din leziuni inflamatorii au relevat o medie de 3,9 celule CD4+ ($p=0,004$). În ceea ce privește expresia CD8, acesta a fost pozitiv în 4,8 celule per mm de epiderm în biopsiile din MF și exprimat într-o proporție mai mare, de 10,4 celule per mm epiderm în afecțiunile inflamatorii ($p=0,02$). Numărul de celule CD4+ și CD8+ de la nivelul dermului nu a fost semnificativ diferit în MF față de afecțiunile inflamatorii, însă cuantificarea a fost dificil de realizat datorită densității crescute a infiltratului dermic și unității de măsură în două dimensiuni (mm^2). Raportul intraepidermic mediu CD4:CD8 în cazurile de MF a fost egal cu 4, valoare semnificativ crescută față de media de 1,68 observată în dermatozele inflamatorii ($p=0,001$). În 30 dintre cele 47 biopsii MF am obținut un raport intraepidermic CD4:CD8 mai mare sau egal cu 2. În schimb, numai 9 din cele 30 de biopsii din dermatoze inflamatorii au relevat o valoare peste 2. Pe de altă parte, doar una dintre cele 47 biopsii a avut o rație intraepidermică CD4:CD8 mai mică de 1, în timp ce acest fapt a fost observat în 8 biopsii din cele 30 din grupul dermatozelor benigne.

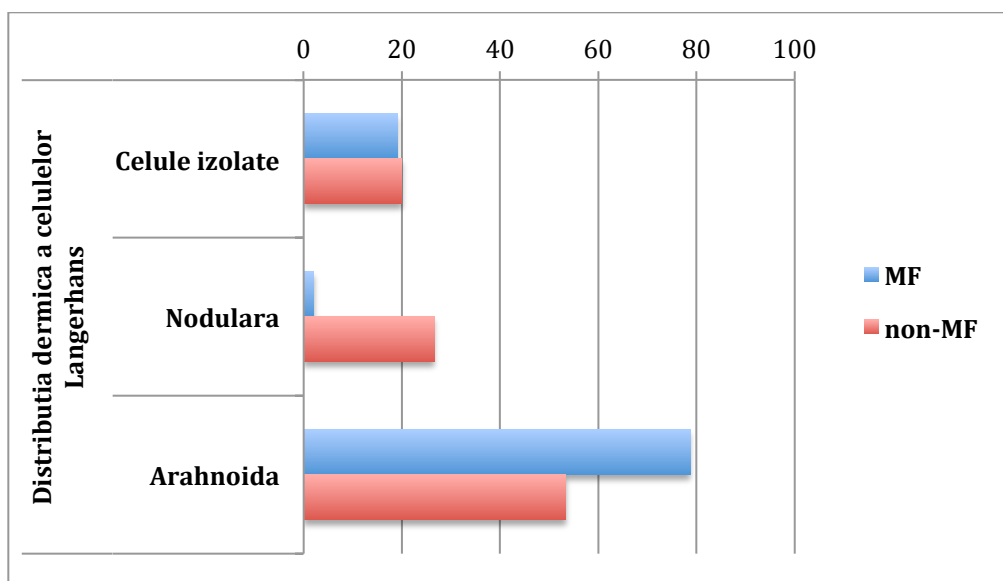
EXPRESIE EPIDERMICĂ	GRUP ȚINTĂ (N=47)	GRUP CONTROL (N=30)	P value
CELULE CD4+/mm	Min. 2 Max. 30 Media = 12,2	Min. 1 Max. 17 Media 3,9	P=0,004
CELULE CD8+/mm	Min. 1 Max 27 Media = 4,8	Min. 1 Max. 35 Media = 10,4	P=0,02
RAPORT CD4:CD8	Min. 0,8 Max. 20 Media = 4,02	Min. 0,5 Max. 4,5 Media = 1,68	P=0,001

Tabelul 15: Expresia imunofenotipică a markerilor T de subset la nivelul epidermului.



EXPRESIA DERMICĂ a CD1a / S100	GRUP ȚINTĂ (N=47)	GRUP CONTROL (N=30)	P value
Celule izolate (+)	9 (19,1%)	6 (20%)	p=0,003
Distribuție nodulară (++)	1 (2,1%)	8 (26,6%)	
Distribuție arahnoidă (+++)	37 (78,7%)	16 (53,3%)	

Tabelul 16: Distribuția celulelor Langerhans CD1a+ la nivelul dermului



Studiul asupra distribuției celulelor Langerhans, prin examinarea preparatelor colorate imunohistochimic cu S100 și CD1a a relevat o distribuție predominant arahnoidiană a acestor celule în infiltratele dermice din MF: 37 din 47 cazuri MF (78,7%) față de 16 din 30 cazuri control (53,3%). Acest fapt contrastează cu distribuția predominant nodulară a celulelor Langerhans în dermatozele inflamatorii: 1 din 47 cazuri MF (2,1%) față de 8 din 30 cazuri control (26,6%), rezultatul fiind semnificativ statistic ($p=0,05$).

Nu am observat diferențe semnificative statistic între cazurile din grupul țintă și grupul control privind expresia celulelor CD1a+ la nivelul epidermului (Tabelul 17).

În ceea ce privește expresia CD20, antigen exprimat în mod normal de limfocitele B, am observat o expresie izolată a sa în celule dispersate (-/+) în 16 din 47 cazuri țintă și expresie difuză în mai puțin de 50% dintre celulele din infiltrat (+) în 7 cazuri (total 23 cazuri, 48,9%). Prin comparație, în dermatozele reactive CD20 a fost exprimat într-o

manieră izolată în 17 din 30 cazuri (56,6%, $p>0.1$). Nu au fost identificate celule epidermotrope pozitive pentru CD20, fapt care, în absența dublei colorații în imunofluorescență, face imposibilă stabilirea naturii celulelor pozitive din cazurile de MF cu expresie difuză (limfocite B reactive sau celule limfomatoase cu expresie aberantă).

CD30 este un antigen exprimat în mod normal de un subset de celule T activate, precum și de celule tumorale de origine limfoidă sau limfocite infectate viral. Am observat o expresie a CD30 în celule izolate în 4 cazuri de MF incipient, inclusiv în celule epidermotrope. CD30 a fost absent în toate cazurile de dermatoze inflamatorii testate. Transformarea CD30 poate reprezenta un eveniment nefavorabil în evoluția MF și este de obicei observată în stadiul tumoral al bolii.

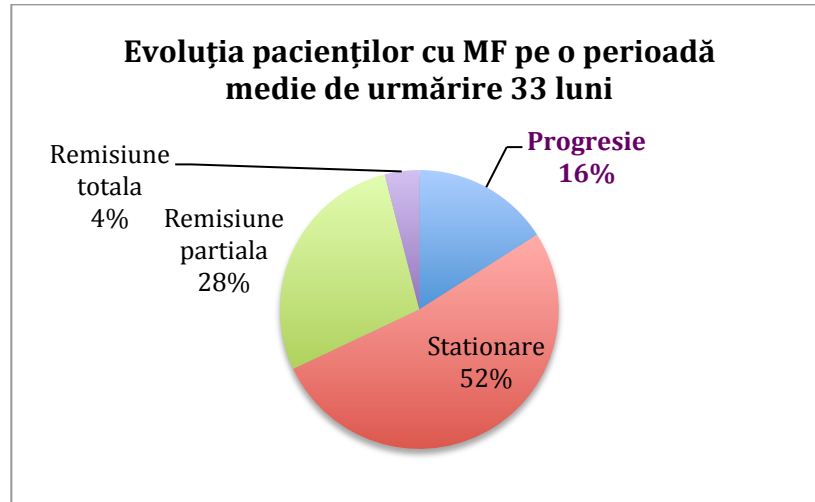
7.5. Factori asociați cu progresia bolii

Au fost disponibile date clinice de urmărire pentru 25 de pacienți din totalul de 37 din grupul țintă (67,5%). Intervalul de urmărire a fost cuprins între 12 și 72 luni, cu o perioadă medie de urmărire care a totalizat 33 ani. Dintre cazurile urmărite, 4 pacienți (16%) au prezentat progresie din stadiul I în stadiul II, respectiv leziuni cutanate noi care interesează >10% din suprafața corporală (76) (Fig. 12). Restul cazurilor în care au fost disponibile date de urmărire clinică au manifestat staționare (13 cazuri, 52%) sau remisiune parțială (7 cazuri, 28%) ori totală (1 caz, 4%) a leziunilor sub tratament. În subsetul studiat, nu s-au produs evenimente adverse cu impact asupra prognosticului vital (transformare tumorală, afectare limfoganglionară sau viscerală).

Dintre cei 4 pacienți progresori, 2 au fost de sex masculin și 2 de sex feminin (sex ratio 1:1). Vârsta medie a progresorilor la momentul diagnosticului a fost de 54 ani (35, 39, 64, respectiv 78 ani). Spre comparație, sex ratio în grupul non-progresorilor este M:F = 13:8, cu predominanța bărbaților, iar vârsta medie la momentul diagnosticului este de 54,8 ani (interval de vârstă 23-80 ani).

Caracteristicile cazurilor urmărite în evoluție

	Total pacienți	Progresori	Non-progresori
Număr	N=25	N=4 (16%)	N=21 (84%)
Vârsta medie la diagnostic (ani, interval)	54,6 (23-80)	54 (35-78)	54,8 (23-80)
Sex ratio (M:F)	1,5:1 (15:10)	1:1 (2:2)	1,6:1 (13:8)
Perioada medie de urmărire (luni)	33 (12-72)	46 (35-61)	33 (12-72)



Am comparat modificările histopatologice și imunofenotipice ale progresorilor cu cele ale biopsiilor pacienților din grupul de non-progresori. Folosind criteriile descrise anterior, am identificat diferențe notabile între cele două grupuri privind următorii parametri:

- **prezența de microabcese Pautrier:** 2 cazuri cu progresie (50%) vs. 0 cazuri staționare (0%), $p\text{ value} = 0,006$;
- **prezența de limfocite atipice** cu nuclei hipercromatici sau cerebriformi în infiltratul dermic: 2 cazuri cu progresie (50%) vs. 1 caz staționar (4,7%), $p = 0,05$;
- **peste 10% celule CD30+** în infiltratul dermic: 2 cazuri cu progresie (50%) vs. 2 cazuri staționare (9,4%), $p\text{ value} = 0,04$.

Nu au fost observate diferențe semnificative statistic între grupul progresorilor și grupul non-progresorilor în ceea ce privește restul criteriilor histopatologice (de arhitectură și citologice) sau imunofenotipice studiate (restricție, discordanță dermo-epidermică de expresie a markerilor pan-T, raport CD4:CD8 și distribuția celulelor Langerhans).

Concluzii

Concluzii generale

În vederea realizării studiului asupra factorilor tisulari de diagnostic și progresie în Mycosis fungoides, am analizat un total de 47 biopsii prelevate de la 37 pacienți cu leziuni de MF într-un stadiu incipient, diagnosticați consecutiv pe o perioadă de 5 ani în Departamentul de Anatomie Patologică al Spitalului Clinic Colentina. Lotul control a inclus 30 de cazuri de dermatoze inflamatorii care mimează MF, diagnosticate în același interval de timp.

1. Din datele pe care le avem, acesta reprezintă primul studiu de anvergură pe pacienți români și ar putea fi considerat în oarecare măsură reprezentativ pentru populația din România.

2. Distribuția pe sexe a cazurilor de MF (M:F = 1,84:1) a fost semnificativ diferită față de distribuția pe sexe a populației României (M:F = 0,95:1), ceea ce arată o predispoziție la boală a pacienților de sex masculin. Cea mai mare pondere a cazurilor de MF s-a întâlnit la pacienții mai vârstnici de 60 ani și este semnificativă statistic în intervalul 60-75 ani.

Eficacitatea unui singur criteriu histologic sau imunofenotipic de diagnostic este în general scăzută, pentru diagnosticul histopatologic pozitiv fiind necesară o întreagă constelație de criterii citoarhitecturale. În acest studiu am demonstrat faptul că modificările histopatologice care pot fi întâlnite în stadiile inițiale de MF sunt variabile și chiar mai cuprinzătoare ca cele descrise în literatură. De exemplu, am descris modificări microscopice care în mod tradițional nu sunt asociate cu MF, cum sunt spongioza, prezența eozinofilelor în infiltrat, prezența extravazărilor hematice.

Concluzii privind criteriile histopatologice de diagnostic

Modificări epidermice arhitecturale

3. Hiperplazia psoriaziformă nu este o caracteristică a leziunilor incipiente de MF. Atunci când este întâlnită, este de tip psoriaziform neregulat (asemănătoare leziunilor de lichen simplex cronic), se asociază mai degrabă cu un infiltrat lichenoid realizând un pattern mixt psoriaziform-lichenoid și se corelează cu leziuni palpabile de tip placă.

4. Spongioza se întâlnește cu aproximativ aceeași frecvență în leziunile incipiente de MF și în dermatozele inflamatorii care mimează MF. Astfel, prezența unui grad scăzut sau moderat de spongioză nu exclude diagnosticul de MF.

5. Parakeratoza este întâlnită frecvent în leziunile de MF, însă nu reprezintă un criteriu discriminatoriu, specificitatea sa fiind scăzută.

Epidermotropismul, criteriu arhitectural pivot în diagnosticul MF incipient

6. Toate subtipurile de epidermotropism au o specificitate ridicată pentru MF, dar manifestă o sensibilitate scăzută.

7. Anumite modificări, precum microabcesele Pautrier, au fost observate numai în biopsiile de MF (specificitate 100%). Colecțiile de celule Langerhans din dermatite eczematoase pot însă mima aspectul microabceselor Pautrier, astfel că este necesară examinarea citologică detaliată a agregatelor intraepidermice de celule mononucleare, eventual cu testare imunohistochimică complementară.

8. Exocitoza disproporționată este criteriul discriminator cu cea mai mare semnificație statistică. Acest tip de epidermotropism implică și prezența unui grad scăzut de spongioză, observat de noi cu frecvență similară în leziuni de MF incipient și dermatoze reactive.

Atipiile limfocitare, manifestare citologică directă a caracterului neoplazic

9. Atipiile limfocitare au o specificitate apropiată de 100%, dar o sensibilitate scăzută pentru diagnosticul MF. Obiectivarea limfocitelor atipice, cu nucleu hipertrofici, hiper cromatici și cu contur cerebriform este singurul criteriu independent de diagnostic.

10. Observarea limfocitelor hipertrofice este modificarea cu cea mai bună reproductibilitate, în speță criteriul cel mai facil de diagnostic în MF incipient.

11. Limfocitele cu morfologie nucleară cerebriformă sunt un criteriu clasic pentru diagnosticul MF, însă în studiul nostru acestea au fost întâlnite rar.

12. Hiper cromazia și haloul perinuclear sunt criterii fără valoare practică în studiul nostru. Identificarea acestor criterii depinde în mod direct de calitatea preparatelor histopatologice și protocoalele de lucru folosite (impregnare, colorare, etc), care pot influența tinctorialitatea, diametrul celulelor, citomorfologia lor nucleară și relația cu keratinocitele.

Reacția dermică secundară prezenței infiltratului limfoid

13. Prezența unei reacții dermice manifestată prin fibroză dermică papilară cu fibre colagene îngroșate este conform studiului nostru unul dintre cele mai importante și reproductibile criterii de diagnostic pozitiv în MF incipient. Prezența fibrozei dermice se corelează cu durata îndelungată a infiltratului limfoid dermic și persistența leziunilor din punct de vedere clinic.

14. Edemul dermului papilar este neobișnuit pentru MF. În rare instanțe poate fi întâlnit, iar prezența sa se corelează cu modificările de tip spongiotic și/sau prezența unei cruste în suprafață.

15. Extravazările hematice, traduse prin purpură, au fost întâlnite cu aceeași frecvență în MF și dermatoze reactive, astfel că nu constituie o marcă de benignitate a afecțiunii cutanate. Cel mai adesea, extravazările eritrocitare din leziunile de MF se corelează în general cu leziuni de tip poikilodermic.

Distribuția și compoziția infiltratului limfoid la nivelul dermului

16. Distribuția arhitecturală a infiltratului dermic poate aduce indicii privind natura procesului limfoid. Un infiltrat dens, lichenoid (în bandă), este înalt sugestiv pentru MF și se corelează mai degrabă cu leziunile de tip placă palpabilă. De asemenea, infiltratul lichenoid poate fi parte a pattern-ului de inflamație mixt, psoriaziform-lichenoid sau spongiotic-lichenoid, descris pentru biopsiile cutanate din MF incipient.

17. Distribuția predominant perivasculară a infiltratului este o modificare asociată mai degrabă cu dermatozele inflamatorii. Poate fi observată și în MF, situație în care diagnosticul pozitiv necesită obiectivarea unei forme de epidermotropism sau a atipiilor limfocitare.

18. Prezența eozinofilelor în infiltratul dermic se observă mai frecvent în dermatozele inflamatorii. Când sunt observate în număr mic, acestea nu exclud diagnosticul de MF (maxim 2-3 eozinofile per secțiune histologică, în studiul nostru).

Concluzii privind anomaliile imunohistochimice

Anomaliile imunofenotipice pot fi caracterizate prin prisma mai multor direcții: restricții ale expresiei antigenice a markerilor de limfocit T matur, discordanță de expresie a antigenelor pan-T între compartimentele dermic și epidermic, raportul între celulele T helper și T citotoxice din infiltrat, prezența și distribuția celulelor dendritice.

Restricția antigenică

19. Obiectivarea restricției antigenice reprezintă dovada faptului că limfocitele de la nivelul procesului limfoid sunt imature, anormale. Restricțiile antigenice sunt observate în până la 32% dintre cazurile de MF, de obicei pe markerii CD5 și CD7, individual sau dublă restricție. Nu am identificat cazuri cu restricție pentru markerii pan-T CD2 și CD3.

20. Expresia CD7 poate fi restricționată inclusiv în dermatoze inflamatorii (până la 10% din cazuri în studiul nostru).

Discordanța de expresie între compartimentele dermic și epidermic

21. Spre deosebire de restricția antigenică, discordanța de expresie dermo-epidermică are o sensibilitate de două ori mai scăzută pentru diagnosticul MF, însă specificitatea sa este de 100%. Cu alte cuvinte, absența expresiei limfocitelor epidermotrope pentru markerii pan-T semnifică imaturitatea acestora și implicit natura lor tumorală.

Raportul între celulele T helper și T citotoxice

22. Raportul CD4:CD8 poate furniza indicii privind natura infiltratului limfoid în MF și dermatoze inflamatorii. În studiul nostru, un raport crescut (peste 4:1) a fost caracteristic leziunilor incipiente de MF, pe când un raport sub 2:1 a fost observat mai degrabă în afecțiunile reactive.

Prezența și distribuția celulelor dendritice

23. Distribuția intradermică în rețea (arahnoidă) a celulelor dendritice prezentatoare de antigen este mai frecvent observată în MF, pe când o organizare predominant nodulară, discontinuă, sugerează natura reactivă a infiltratului limfocitar dermic. Distribuția celulelor Langerhans la nivelul compartimentului epidermic nu a fost diferită între cele două grupuri studiate.

Concluzii privind factorii asociați cu progresia bolii

24. Pe o perioadă medie de urmărire de 33 luni, numai 16% dintre cazurile urmărite au prezentat evoluție către un stadiu clinic superior (din stadiul I în stadiul II). Deși perioada de urmărire este relativ scurtă, procentul scăzut de cazuri cu progresie și absența progresiei către un stadiu clinic cu implicații sistemice confirmă natura mai degrabă staționară sau lent progresivă a bolii.

25. Elementele semnificativ asociate cu progresia bolii din stadiul I în stadiul II sunt: prezența abceselor Pautrier, prezența limfocitelor atipice la nivel dermic și expresia CD30 în proporție de peste 10% în infiltratul limfoid.

În practica anatomopatologică curentă, diferențierea între leziunile de MF în stadiu incipient și dermatoze inflamatorii care mimează MF este probabil unul dintre cele mai dificile subiecte. Absența criteriilor tradiționale de diagnostic considerate specifice pentru MF și/sau prezența unor criterii neobișnuite în mod tradițional pentru MF nu trebuie să determine excluderea acestui diagnostic. Examenul imunohistochimic poate fi util pentru diagnostic, prin obiectivarea anomaliilor fenotipice ale limfocitelor implicate în procesul limfoid. Dacă tabloul clinic sugerează diagnostic de MF, care însă nu se confirmă histologic, datorită variabilității modificărilor histopatologice care pot fi observate în MF se recomandă o atitudine de urmărire clinică periodică și/sau rebiopsiere.

Bibliografie selectivă

1. Groves FD, Linet MS, Travis LB, Devesa SS. Cancer surveillance series: non-Hodgkin's lymphoma incidence by histologic subtype in the United States from 1978 through 1995. *J Natl Cancer Inst.* 2000 Aug 2;92(15):1240–51.
2. Willemze R, Jaffe ES, Burg G, Cerroni L, Berti E, Swerdlow SH, et al. WHO-EORTC classification for cutaneous lymphomas. *Blood.* 2005 May 15;105(10):3768–85.
3. Bradford PT, Devesa SS, Anderson WF, Toro JR. Cutaneous lymphoma incidence patterns in the United States: a population-based study of 3884 cases. *Blood.* American Society of Hematology; 2009 May 21;113(21):5064–73.
4. Criscione VD, Weinstock MA. Incidence of cutaneous T-cell lymphoma in the United States, 1973-2002. *Arch Dermatol.* American Medical Association; 2007 Jul;143(7):854–9.
5. Willemze R, Meijer CJLM. Classification of cutaneous T-cell lymphoma: from Alibert to WHO-EORTC. *J Cutan Pathol.* Munksgaard International Publishers; 2006 Feb;33 Suppl 1(s1):18–26.
6. Burg G, Braun-Falco O. Cutaneous Lymphomas, Pseudolymphomas, and Related Disorders. Berlin, Heidelberg: Springer Science & Business Media; 2013. 1 p.
7. Weinstock MA. A registry-based case-control study of mycosis fungoides. *Ann Epidemiol.* 1991 Nov;1(6):533–9.
8. Weinstock MA, Horm JW. Mycosis fungoides in the United States. Increasing incidence and descriptive epidemiology. *JAMA.* 1988 Jul 1;260(1):42–6.
9. Weinstock MA, Gardstein B. Twenty-year trends in the reported incidence of mycosis fungoides and associated mortality. *Am J Public Health.* American Public Health Association; 1999 Aug;89(8):1240–4.
10. Morales Suárez-Varela MM, Llopis-Gonzalez A, Marquina Vila A, Bell J. Mycosis fungoides: review of epidemiological observations. *Dermatology (Basel).* 2000;201(1):21–8.
11. Morton LM, Wang SS, Devesa SS, Hartge P, Weisenburger DD, Linet MS. Lymphoma incidence patterns by WHO subtype in the United States, 1992-2001. *Blood.* American Society of Hematology; 2006 Jan 1;107(1):265–76.
12. Fischmann AB, Bunn PA, Guccion JG, Matthews MJ, Minna JD. Exposure to

chemicals, physical agents, and biologic agents in mycosis fungoides and the Sézary syndrome. *Cancer Treat Rep.* 1979 Apr;63(4):591–6.

13. Vonderheid EC, Bigler RD, Hou JS. On the possible relationship between staphylococcal superantigens and increased Vbeta5.1 usage in cutaneous T-cell lymphoma. *Br J Dermatol.* Blackwell Science Ltd; 2005 Apr;152(4):825–6–authorreply827.
14. Jackow CM, Cather JC, Hearne V, Asano AT, Musser JM, Duvic M. Association of erythrodermic cutaneous T-cell lymphoma, superantigen-positive *Staphylococcus aureus*, and oligoclonal T-cell receptor V beta gene expansion. *Blood.* 1997 Jan 1;89(1):32–40.
15. Nguyen V, Huggins RH, Lertsburapa T, Bauer K, Rademaker A, Gerami P, et al. Cutaneous T-cell lymphoma and *Staphylococcus aureus* colonization. *Journal of the American Academy of Dermatology.* Elsevier; 2008 Dec;59(6):949–52.
16. Talpur R, Bassett R, Duvic M. Prevalence and treatment of *Staphylococcus aureus* colonization in patients with mycosis fungoides and Sézary syndrome. *Br J Dermatol.* Blackwell Publishing Ltd; 2008 Jul;159(1):105–12.
17. Ravat FE, Spittle MF, Russell-Jones R. Primary cutaneous T-cell lymphoma occurring after organ transplantation. *Journal of the American Academy of Dermatology.* 2006 Apr;54(4):668–75.
18. Pomerantz RG, Campbell LS, Jukic DM, Geskin LJ. Posttransplant cutaneous T-cell lymphoma: case reports and review of the association of calcineurin inhibitor use with posttransplant lymphoproliferative disease risk. *Arch Dermatol.* American Medical Association; 2010 May;146(5):513–6.
19. Beylot-Barry M, Vergier B, Masquelier B, Bagot M, Joly P, Souteyrand P, et al. The Spectrum of Cutaneous Lymphomas in HIV infection: a study of 21 cases. *The American Journal of Surgical Pathology.* 1999 Oct;23(10):1208–16.
20. Wilkins K, Turner R, Dolev JC, LeBoit PE, Berger TG, Maurer TA. Cutaneous malignancy and human immunodeficiency virus disease. *Journal of the American Academy of Dermatology.* Elsevier; 2006 Feb;54(2):189–206–quiz207–10.
21. Yawalkar N, Ferenczi K, Jones DA, Yamanaka K, Suh K-Y, Sadat S, et al. Profound loss of T-cell receptor repertoire complexity in cutaneous T-cell lymphoma. *Blood.* American Society of Hematology; 2003 Dec 1;102(12):4059–66.
22. Berger CL, Tigelaar R, Cohen J, Mariwalla K, Trinh J, Wang N, et al. Cutaneous T-cell lymphoma: malignant proliferation of T-regulatory cells. *Blood.* American Society of Hematology; 2005 Feb 15;105(4):1640–7.
23. McCusker ME, Garifallou M, Bogen SA. Sezary lineage cells can be induced to

- proliferate via CD28-mediated costimulation. *J Immunol.* 1997 May 15;158(10):4984–91.
24. Gazdar AF, Carney DN, Russell EK, Schechter GP, Bunn PA. In vitro growth of cutaneous T-cell lymphomas. *Cancer Treat Rep.* 1979 Apr;63(4):587–90.
 25. Vowels BR, Lessin SR, Cassin M, Jaworsky C, Benoit B, Wolfe JT, et al. Th2 cytokine mRNA expression in skin in cutaneous T-cell lymphoma. *J Invest Dermatol.* 1994 Nov;103(5):669–73.
 26. Dummer R, Heald PW, Nestle FO, Ludwig E, Laine E, Hemmi S, et al. Sézary syndrome T-cell clones display T-helper 2 cytokines and express the accessory factor-1 (interferon-gamma receptor beta-chain). *Blood.* 1996 Aug 15;88(4):1383–9.
 27. Saed G, Fivenson DP, Naidu Y, Nickoloff BJ. Mycosis fungoides exhibits a Th1-type cell-mediated cytokine profile whereas Sezary syndrome expresses a Th2-type profile. *J Invest Dermatol.* 1994 Jul;103(1):29–33.
 28. Asadullah K, Döcke WD, Haeussler A, Sterry W, Volk HD. Progression of mycosis fungoides is associated with increasing cutaneous expression of interleukin-10 mRNA. *J Invest Dermatol.* 1996 Dec;107(6):833–7.
 29. Chong BF, Wilson AJ, Gibson HM, Hafner MS, Luo Y, Hedgcock CJ, et al. Immune function abnormalities in peripheral blood mononuclear cell cytokine expression differentiates stages of cutaneous T-cell lymphoma/mycosis fungoides. *Clin Cancer Res. American Association for Cancer Research;* 2008 Feb 1;14(3):646–53.
 30. Wood GS, Edinger A, Hoppe RT, Warnke RA. Mycosis fungoides skin lesions contain CD8+ tumor-infiltrating lymphocytes expressing an activated, MHC-restricted cytotoxic T-lymphocyte phenotype. *J Cutan Pathol.* 1994 Apr;21(2):151–6.
 31. Hoppe RT, Medeiros LJ, Warnke RA, Wood GS. CD8-positive tumor-infiltrating lymphocytes influence the long-term survival of patients with mycosis fungoides. *Journal of American Dermatology.* 1995 Mar;32(3):448–53.
 32. Yamanaka K-I, Yawalkar N, Jones DA, Hurwitz D, Ferenczi K, Eapen S, et al. Decreased T-cell receptor excision circles in cutaneous T-cell lymphoma. *Clin Cancer Res. American Association for Cancer Research;* 2005 Aug 15;11(16):5748–55.
 33. Kharbanda M, McCloskey TW, Pahwa R, Sun M, Pahwa S. Alterations in T-cell receptor Vbeta repertoire of CD4 and CD8 T lymphocytes in human immunodeficiency virus-infected children. *Clin Diagn Lab Immunol. American Society for Microbiology (ASM);* 2003 Jan;10(1):53–8.

34. Matejka M, Konrad K. Epidermal Langerhans cells in mycosis fungoides and Sézary syndrome. *Wien Klin Wochenschr*. 1983 Dec 9;95(23):847–52.
35. Rowden G, Phillips TM, Lewis MG, Wilkinson RD. Target role of Langerhans cells in mycosis fungoides: transmission and immuno-electron microscopic studies. *J Cutan Pathol*. 1979 Oct;6(5):364–82.
36. Chu A, Berger CL, Kung P, Edelson RL. In situ identification of Langerhans cells in the dermal infiltrate of cutaneous T cell lymphoma. *Journal of American Dermatology*. 1982 Mar;6(3):350–4.
37. Jones CL, Ferreira S, McKenzie RCT, Tosi I, Caesar JA, Bagot M, et al. Regulation of T-plastin expression by promoter hypomethylation in primary cutaneous T-cell lymphoma. *J Invest Dermatol*. Elsevier; 2012 Aug;132(8):2042–9.
38. Garzon R, Marcucci G, Croce CM. Targeting microRNAs in cancer: rationale, strategies and challenges. *Nat Rev Drug Discov*. 2010 Oct;9(10):775–89.
39. Demierre M-F, Gan S, Jones J, Miller DR. Significant impact of cutaneous T-cell lymphoma on patients' quality of life: results of a 2005 National Cutaneous Lymphoma Foundation Survey. *Cancer*. 2006 Nov 15;107(10):2504–11.
40. Pimpinelli N, Olsen EA, Santucci M, Vonderheid E, Haeffner AC, Stevens S, et al. Defining early mycosis fungoides. *Journal of the American Academy of Dermatology*. 2005 Dec;53(6):1053–63.
41. Kazakov DV, Burg G, Kempf W. Clinicopathological spectrum of mycosis fungoides. *J Eur Acad Dermatol Venereol*. Blackwell Science Ltd; 2004 Jul;18(4):397–415.
42. Kim YH, Liu HL, Mraz-Gernhard S, Varghese A, Hoppe RT. Long-term outcome of 525 patients with mycosis fungoides and Sezary syndrome: clinical prognostic factors and risk for disease progression. *Arch Dermatol*. American Medical Association; 2003 Jul;139(7):857–66.
43. Morales MM, Olsen J, Johansen P, Kaerlev L, Guénel P, Arveux P, et al. Viral infection, atopy and mycosis fungoides: a European multicentre case-control study. *European Journal of Cancer*. 2003 Mar;39(4):511–6.
44. Zackheim HS, McCalmont TH. Mycosis fungoides: the great imitator. *Journal of American Dermatology*. Elsevier; 2002 Dec;47(6):914–8.
45. Guitart J, Magro C. Cutaneous T-cell lymphoid dyscrasia: a unifying term for idiopathic chronic dermatoses with persistent T-cell clones. *Arch Dermatol*. American Medical Association; 2007 Jul;143(7):921–32.
46. Smoller BR, Bishop K, Glusac E, Kim YH, Hendrickson M. Reassessment of

histologic parameters in the diagnosis of mycosis fungoides. *The American Journal of Surgical Pathology*. 1995 Dec;19(12):1423–30.

47. Deeths MJ, Chapman JT, Dellavalle RP, Zeng C, Aeling JL. Treatment of patch and plaque stage mycosis fungoides with imiquimod 5% cream. *Journal of the American Academy of Dermatology*. Elsevier; 2005 Feb;52(2):275–80.
48. Kim YH, Jensen RA, Watanabe GL, Varghese A, Hoppe RT. Clinical stage IA (limited patch and plaque) mycosis fungoides. A long-term outcome analysis. *Arch Dermatol*. 1996 Nov;132(11):1309–13.
49. Kikuchi A, Naka W, Harada T, Sakuraoka K, Harada R, Nishikawa T. Parapsoriasis en plaques: its potential for progression to malignant lymphoma. *Journal of American Dermatology*. 1993 Sep;29(3):419–22.
50. Burg G, Dummer R, Haeffner A, Kempf W, Kadin M. From inflammation to neoplasia: mycosis fungoides evolves from reactive inflammatory conditions (lymphoid infiltrates) transforming into neoplastic plaques and tumors. *Arch Dermatol*. 2001 Jul;137(7):949–52.
51. van Doorn R, Scheffer E, Willemze R. Follicular mycosis fungoides, a distinct disease entity with or without associated follicular mucinosis: a clinicopathologic and follow-up study of 51 patients. *Arch Dermatol*. 2002 Feb;138(2):191–8.
52. Vonderheid EC, Bernengo MG, Burg G, Duvic M, Heald P, Laroche L, et al. Update on erythrodermic cutaneous T-cell lymphoma: report of the International Society for Cutaneous Lymphomas. 2002. pp. 95–106.
53. Cerroni L, Fink-Puches R, El-Shabrawi-Caelen L, Soyer HP, LeBoit PE, Kerl H. Solitary skin lesions with histopathologic features of early mycosis fungoides. *Am J Dermatopathol*. 1999 Dec;21(6):518–24.
54. Santucci M, Biggeri A, Feller AC, Massi D, Burg G. Efficacy of histologic criteria for diagnosing early mycosis fungoides: an EORTC cutaneous lymphoma study group investigation. European Organization for Research and Treatment of Cancer. *The American Journal of Surgical Pathology*. 2000 Jan;24(1):40–50.
55. Stevens SR, Ke MS, Birol A, Terhune MH, Parry EJ, Ross C, et al. A simple clinical scoring system to improve the sensitivity and standardization of the diagnosis of mycosis fungoides type cutaneous T-cell lymphoma: logistic regression of clinical and laboratory data. *Br J Dermatol*. 2003 Sep;149(3):513–22.
56. Guitart J, Kennedy J, Ronan S, Chmiel JS, Hsiegh YC, Variakojis D. Histologic criteria for the diagnosis of mycosis fungoides: proposal for a grading system to standardize pathology reporting. *J Cutan Pathol*. 2001 Apr;28(4):174–83.
57. Massone C, Kodama K, Kerl H, Cerroni L. Histopathologic features of early (patch) lesions of mycosis fungoides: a morphologic study on 745 biopsy

- specimens from 427 patients. *The American Journal of Surgical Pathology*. 2005 Apr;29(4):550–60.
58. Swerdlow SH, Campo E, Pileri SA, Harris NL, Stein H, Siebert R, et al. The 2016 revision of the World Health Organization classification of lymphoid neoplasms. *Blood*. American Society of Hematology; 2016 May 19;127(20):2375–90.
 59. Sanchez JL, Ackerman AB. The patch stage of mycosis fungoides. Criteria for histologic diagnosis. *Am J Dermatopathol*. 1979;1(1):5–26.
 60. Hwang ST, Janik JE, Jaffe ES, Wilson WH. Mycosis fungoides and Sézary syndrome. *The Lancet*. 2008.
 61. Smoller BR, Santucci M, Wood GS, Whittaker SJ. Histopathology and genetics of cutaneous T-cell lymphoma. *Hematol Oncol Clin North Am*. 2003 Dec;17(6):1277–311.
 62. Michie SA, Abel EA, Hoppe RT, Warnke RA, Wood GS. Discordant expression of antigens between intraepidermal and intradermal T cells in mycosis fungoides. *Am J Pathol*. American Society for Investigative Pathology; 1990 Dec;137(6):1447–51.
 63. Wood GS, Hong SR, Sasaki DT, Abel EA, Hoppe RT, Warnke RA, et al. Leu-8/CD7 antigen expression by CD3+ T cells: comparative analysis of skin and blood in mycosis fungoides/Sézary syndrome relative to normal blood values. *Journal of American Dermatology*. 1990 Apr;22(4):602–7.
 64. Nuckols JD, Shea CR, Horenstein MG, Burchette JL, Prieto VG. Quantitation of intraepidermal T-cell subsets in formalin-fixed, paraffin-embedded tissue helps in the diagnosis of mycosis fungoides. *J Cutan Pathol*. 1999 Apr;26(4):169–75.
 65. Swerdlow SHCE, Harris NL. WHO classification of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues. France : IARC Press, 2008; 2008.
 66. Benner MF, Jansen PM, Vermeer MH, Willemze R. Prognostic factors in transformed mycosis fungoides: a retrospective analysis of 100 cases. *Blood*. American Society of Hematology; 2012 Feb 16;119(7):1643–9.
 67. Weng W-K, Armstrong R, Arai S, Desmarais C, Hoppe R, Kim YH. Minimal residual disease monitoring with high-throughput sequencing of T cell receptors in cutaneous T cell lymphoma. *Sci Transl Med*. American Association for the Advancement of Science; 2013 Dec 4;5(214):214ra171–1.
 68. Vega F, Luthra R, Medeiros LJ, Dunmire V, Lee S-J, Duvic M, et al. Clonal heterogeneity in mycosis fungoides and its relationship to clinical course. *Blood*. American Society of Hematology; 2002 Nov 1;100(9):3369–73.
 69. Thurber SE, Zhang B, Kim YH, Schrijver I, Zehnder J, Kohler S. T-cell clonality

analysis in biopsy specimens from two different skin sites shows high specificity in the diagnosis of patients with suggested mycosis fungoides. *Journal of the American Academy of Dermatology*. Elsevier; 2007 Nov;57(5):782–90.

70. Wood GS, Haeffner A, Dummer R, Crooks CF. Molecular biology techniques for the diagnosis of cutaneous T-cell lymphoma. *Dermatologic Clinics*. 1994 Apr;12(2):231–41.
71. Guitart J. Beyond clonal detection: defining the T-cell clone. *Arch Dermatol*. American Medical Association; 2005 Sep;141(9):1159–60.
72. Khan N, Shariff N, Cobbold M, Bruton R, Ainsworth JA, Sinclair AJ, et al. Cytomegalovirus seropositivity drives the CD8 T cell repertoire toward greater clonality in healthy elderly individuals. *J Immunol*. 2002 Aug 15;169(4):1984–92.
73. Langerak AW, Groenen PJTA, Brüggemann M, Beldjord K, Bellan C, Bonello L, et al. EuroClonality/BIOMED-2 guidelines for interpretation and reporting of Ig/TCR clonality testing in suspected lymphoproliferations. *Leukemia*. Nature Publishing Group; 2012 Oct;26(10):2159–71.
74. Massone C, Crisman G, Kerl H, Cerroni L. The prognosis of early mycosis fungoides is not influenced by phenotype and T-cell clonality. *Br J Dermatol*. 2008 Oct;159(4):881–6.
75. Zhang B, Beck AH, Taube JM, Kohler S, Seo K, Zwerner J, et al. Combined use of PCR-based TCRG and TCRB clonality tests on paraffin-embedded skin tissue in the differential diagnosis of mycosis fungoides and inflammatory dermatoses. *J Mol Diagn*. Elsevier; 2010 May;12(3):320–7.
76. Olsen E, Vonderheid E, Pimpinelli N, Willemze R, Kim Y, Knobler R, et al. Revisions to the staging and classification of mycosis fungoides and Sezary syndrome: a proposal of the International Society for Cutaneous Lymphomas (ISCL) and the cutaneous lymphoma task force of the European Organization of Research and Treatment of Cancer (EORTC). *Blood*. American Society of Hematology; 2007 Sep 15;110(6):1713–22.
77. Sundram UN. Epidermotropic Reactions. *Cutaneous Hematopathology*. 2014.
78. Dalton SR, Chandler WM, Abuzeid M, Hossler EW, Ferringer T, Elston DM, et al. Eosinophils in mycosis fungoides: an uncommon finding in the patch and plaque stages. *Am J Dermatopathol*. 2012 Aug;34(6):586–91.
79. Citarella L, Massone C, Kerl H, Cerroni L. Lichen sclerosus with histopathologic features simulating early mycosis fungoides. *Am J Dermatopathol*. 2003 Dec;25(6):463–5.
80. Candiago E, Marocolo D, Manganoni MA, Leali C, Facchetti F. Nonlymphoid intraepidermal mononuclear cell collections (pseudo-Pautrier abscesses): a

morphologic and immunophenotypical characterization. *Am J Dermatopathol*. 2000 Feb;22(1):1–6.

81. Burkert KL, Huhn K, Menezes DW, Murphy GF. Langerhans cell microgranulomas (pseudo-pautrier abscesses): morphologic diversity, diagnostic implications and pathogenetic mechanisms. *J Cutan Pathol*. 2002 Oct;29(9):511–6.
82. Ackerman AB. If small plaque (digitate) parapsoriasis is a cutaneous T-cell lymphoma, even an “abortive” one, it must be mycosis fungoides! *Arch Dermatol*. 1996 May;132(5):562–6.
83. Simon M, Flaig MJ, Kind P, Sander CA, Kaudewitz P. Large plaque parapsoriasis: clinical and genotypic correlations. *J Cutan Pathol*. 2000 Feb;27(2):57–60.
84. El-Darouti MA, Fawzy MM, Hegazy RA, Abdel Hay RM. Hypopigmented parapsoriasis en plaque, a new, overlooked member of the parapsoriasis family: a report of 34 patients and a 7-year experience. *Journal of the American Academy of Dermatology*. Elsevier; 2012 Dec;67(6):1182–8.
85. Burg G, Dummer R, Nestle FO, Doebbeling U, Haeffner A. Cutaneous lymphomas consist of a spectrum of nosologically different entities including mycosis fungoides and small plaque parapsoriasis. *Arch Dermatol*. 1996 May;132(5):567–72.
86. Wong HK, Mishra A, Hake T, Porcu P. Evolving insights in the pathogenesis and therapy of cutaneous T-cell lymphoma (mycosis fungoides and Sézary syndrome). *Br J Haematol*. 2011 Oct;155(2):150–66.
87. Olsen EA, Whittaker S, Kim YH, Duvic M, Prince HM, Lessin SR, et al. Clinical end points and response criteria in mycosis fungoides and Sézary syndrome: a consensus statement of the International Society for Cutaneous Lymphomas, the United States Cutaneous Lymphoma Consortium, and the Cutaneous Lymphoma Task Force of the European Organisation for Research and Treatment of Cancer. *American Society of Clinical Oncology*; 2011. pp. 2598–607.
88. Talpur R, Singh L, Daulat S, Liu P, Seyfer S, Trynosky T, et al. Long-term outcomes of 1,263 patients with mycosis fungoides and Sézary syndrome from 1982 to 2009. *Clin Cancer Res*. American Association for Cancer Research; 2012 Sep 15;18(18):5051–60.
89. Agar NS, Wedgeworth E, Crichton S, Mitchell TJ, Cox M, Ferreira S, et al. Survival outcomes and prognostic factors in mycosis fungoides/Sézary syndrome: validation of the revised International Society for Cutaneous Lymphomas/European Organisation for Research and Treatment of Cancer staging proposal. *J Clin Oncol*. American Society of Clinical Oncology; 2010 Nov 1;28(31):4730–9.
90. Ally MS, Pawade J, Tanaka M, Morris S, Mitchell T, Child F, et al. Solitary

mycosis fungoides: a distinct clinicopathologic entity with a good prognosis: a series of 15 cases and literature review. *Journal of the American Academy of Dermatology*. Elsevier; 2012 Oct;67(4):736–44.

91. Kim YH, Chow S, Varghese A, Hoppe RT. Clinical characteristics and long-term outcome of patients with generalized patch and/or plaque (T2) mycosis fungoides. *Arch Dermatol*. 1999 Jan;135(1):26–32.
92. Quaglino P, Pimpinelli N, Berti E, Calzavara-Pinton P, Alfonso Lombardo G, Rupoli S, et al. Time course, clinical pathways, and long-term hazards risk trends of disease progression in patients with classic mycosis fungoides: a multicenter, retrospective follow-up study from the Italian Group of Cutaneous Lymphomas. *Cancer*. Wiley Subscription Services, Inc., A Wiley Company; 2012 Dec 1;118(23):5830–9.
93. de Coninck EC, Kim YH, Varghese A, Hoppe RT. Clinical characteristics and outcome of patients with extracutaneous mycosis fungoides. *J Clin Oncol*. 2001 Feb 1;19(3):779–84.
94. Wernham AG, Shah F, Amel Kashipaz R, Cobbold M, Scarisbrick J. Stage I mycosis fungoides: frequent association with a favourable prognosis but disease progression and disease-specific mortality may occur. *Br J Dermatol*. 2015 Nov 1;173(5):1295–7.
95. Nashan D, Faulhaber D, Ständer S, Luger TA, Stadler R. Mycosis fungoides: a dermatological masquerader. *Br J Dermatol*. Blackwell Publishing Ltd; 2007 Jan;156(1):1–10.
96. Sarantopoulos GP, Palla B, Said J, Kinney MC, Swerdlow SM, Willemze R, et al. Mimics of cutaneous lymphoma: report of the 2011 Society for Hematopathology/European Association for Haematopathology workshop. The Oxford University Press; 2013. pp. 536–51.