

**UNIVERSITAT AUTÒNOMA DE BARCELONA**  
**FACULTAT DE BIOCÈNCIES**  
**Departament de Biologia Animal, de Biologia Vegetal i d'Ecologia**



**Universitat Autònoma de Barcelona**

**TESI DOCTORAL**

**APLICACIÓ DE LA CITOGÈNÈTICA, HIBRIDACIÓ *IN SITU*  
FLUORESCENT (FISH) I CARIOTIPAT ESPECTRAL (SKY) PER A LA  
CARACTERITZACIÓ GENÈTICA DELS LIMFOMES DE LA ZONA  
MARGINAL ESPLÈNICA**

**Memòria presentada per Cristina Baró Llàcer per a optar al grau de  
Doctora per la Universitat Autònoma de Barcelona**

**Director de Tesi: Dr. Francesc Solé Ristol**  
**Tutora: Dra. M<sup>a</sup>Rosa Caballín Fernández**

**Bellaterra, 2015**



El Dr. Francesc Solé Ristol, director científic de l'Institut de Recerca Contra la Leucèmia Josep Carreras, campus ICO-GTIP,

CERTIFICA:

Que Cristina Baró Llàcer ha realitzat, sota la seva direcció, el treball "Aplicació de la citogenètica, hibridació *in situ* fluorescent (FISH) i cariotipat espectral (SKY) per a la caracterització genètica dels limfomes de la zona marginal esplènica" per a optar al grau de Doctora.

Aquest treball ha estat realitzat al Laboratori de Citogenètica Molecular del Servei de Patologia de l'Hospital del Mar de Barcelona.

Bellaterra, 2015

Dr. Francesc Solé Ristol

Cristina Baró Llàcer



**Als meus pares,  
al Jaume**



## **AGRAÏMENTS**

“IF YOU CAN DREAM IT, YOU CAN DO IT”

--WALT DISNEY



Després de passar per infinits documents de l'estil "tesi.última.doc", "tesi.finalíssima.doc" etc.. arribo, ara sí! a la versió definitiva, que és la que inclou els agraïments. I per a mi es tracta de la més important, no només perquè serà la que es quedarà l'Escola de Doctorat i es publicarà en xarxa, sinó perquè en ella puc donar les gràcies a totes les persones que han estat al meu costat en aquest llarg, llarguíssim camí que ha estat la meva Tesi. Creieu-me, de debò, quan dic que ni una sola paraula d'aquest treball hauria estat possible sense vosaltres.

Què puc dir d'en **Kiko**? El dia que ens vam conèixer em va explicar que els cromosomes éren la seva vida, i amb el temps va aconseguir que també formessin part de la meva. Em vas donar l'oportunitat d'entrar a formar part del teu equip, i vas confiar en mi desde el primer moment. Sempre has estat disponible per a escoltar-me, aconsellar-me i ajudar-me quant ho he necessitat. Els cops que m'he esverat i ho he vist tot negre (ho faig molt jo això d'esverar-me..) has trobat solucions o simplement m'has calmat, que no és poc.. Gràcies! I recorda..menja que no saps quan tornaràs a fer-ho 😊.

**Blanca**, gràcies per motivar-me constantment i aconseguir que em superi a mi mateixa cada vegada. Per tot el que he après amb tu i de tu. Com agrair-te els teus ànims, temps i energia? T'admiro per ser una gran científica i sobretot millor amiga.

**Marta**, companya esplènica, ha estat un plaer col·laborar amb tu i tenir-te a prop. M'encanta la teva obstinació taure per tirar endavant amb tot. Gràcies per totes les estones a última hora de la tarda intentant resoldre els misteris dels LZME.

Gràcies **Lourdes**, perquè tot i anar sempre atabalada, mai m'has negat un moment, escoltant-me quan he tingut un dubte, una pregunta..i perquè el carinyo que transmeties quan ens dèies "doctorettes" no té preu.

A les citòlogues: **Encarna**, porque aún pienso en ti cada vez que oigo “sideroblastos en anillo” y de dónde sacas los bolis con goma??. **Leo** porque das vida a la citología con tu alegría. **Anna**, una altra sofrerta companya esplènica, gràcies per la teva ajuda amb la citometria de flux i per fer-me veure que no és tan avorrida com sembla.. I com no, a la **Dra. Woessner**, Dra en majúscules, que els seus brillants comentaris a les sessions valen un imperi.

Gràcies al **dr. Serrano**, perquè sempre m’ha rebut al seu despatx quan ho he necessitat, per cedir-me valuoses imatges per als meus treballs i per tot el que he après..a les sessions d’hematopatologia no donava abast per a pendre notes!.

Gràcies **Lluís Colomo**, que has patit els meus dubtes existencials amb les melses. Per les estones que has dedicat a explicar-me tots els patrons normals i variants dels esplènics. Pel teu ajut amb la IHQ i per la agradable conversa els cops que ens hem trobat als FGC.

Gràcies també a totes les tècnics que m’han ajudat o simplement han estat a prop tots aquests anys. A la **Carme**, per ser la meva mestra en les tècniques de citogenètica i FISH. A la **Maria**, companya en el projecte més friki que he dut a terme, el dels ratolins. A la **Rosa Mari**, perquè tot el que sé de cultius és gràcies a ella, ni un dubte va quedar al tinter. A la **Judith**, pel seu ajut incondicional en qualsevol moment, sempre amb un somriure al llavis. A la **Rosa Navarro**, que és la xispa i vidilla del laboratori i a la **Montse** que és com la mama de totes les becàries.

Gràcies al dr. **Luís Pérez-Jurado**, per deixar-nos utilitzar el seu laboratori quan començàvem a experimentar per obtenir sondes de BAC. Mai em va posar cap traba tot i que sóc molt pesada quan vull. Faig extensiu l’agraïment a tot el grup de Genètica de la del UPF per fer-me sentir com una més. Especialment agrair a la **Raquel** i al **Jesús** la seva capacitat resolutiva en moments clau en que alguna cosa fallava. Jesús, que paciència tuviste! Pero venga, que nos reíamos un montón cuando estaba por allí!.

Vull agrair també l'amable acollida a Kiel per part del grup del dr. **Reiner Siebert**, on vaig anar a parar per perfeccionar la tècnica amb els BAC. Fantàstica l'experiència al lloc on es va fer la primera classificació dels limfomes!. Dake Schön, Reiner. Gracias también **Iñaki Martín-Subero** por tu compañía, consejos, conocimientos y casi lo más importante, gracias por tu actividad de traductor cuando mi alemán sufría deficiencias.

Pel que fa a les companyes, agrair a l'**Olaya**, la becària compartida d'en Kiko i el Luis, que comentés a Genètica que en Kiko buscava doctorant, ja que va ser així com vaig aterrar a l'H.Mar. Gràcies **Laia** i **Silvia**, les becàries d'Uro, la veritat no vaig saber mai ben bé en que treballàveu però tant és, la qüestió són les bones estones que em passat. **Laura** (Astier!) aish, quantes hores al final del dia, quan no quedava ningú al servei, vam estar a cultius perquè arribava una melsa? Aquelles melses pobres que treballavem a quatre mans..i aquelles xerrades del Rituximab "especials" per a les bequis limfoides? gràcies pels moments i confidències compartits. **Mar**, la companya dels displàsics, que et vas trasdallar amb mi al PRBB quan ningú volia anar-hi..gràcies per les llaaaaargues converses, els ànims i per la companyia mentre fèiem bases de dades i escoltàvem Brian Adams. Us trobo a faltar a totes.

Hi ha dues becàries que han estat i són dues amigues imprescindibles: l'**Eulàlia** i la **Roci**. Gràcies Eulàlia per les xocolates, les menjades d'olla, els assajos de comunicacions en llocs inverossímils, les sortides de festa, per compartir falta de son als congressos i un llarg etc..Roci, te permeto que digas eso de "Cris eres perveeeeeersa" porque eres un genio..contigo nunca sabes que va a pasar en las próximas horas, pero lo que está claro es que será contigo. Noies ens queda molt per fer juntes!!!

**Rebe!** vas estar poquet al Mar però el temps suficient per a consolidar una bona amistat. Gràcies per la teva positivitat, per la teva energia i perquè encara que no ens veiem tant com voldriem sé que hi ets.

Gràcies a la resta de gent del laboratori: **Bea Bellosillo** i **Gemma Navarro**, per posar llum a la vessant molecular dels limfomes sempre que he tingut un dubte. **Èrica** i **Mercè** per ajudar-me a buscar blocs i estar disposades a ajudar quan calia. Gràcies a les seces, **Asun**, ens fèies por, perdoneu però algú ho havia de dir!. **Juani**, tot el contrari de l'Asun...

A totes aquelles persones que han estat a prop meu com l'**Esme**, la **Noe** i la **Rosa**, gràcies noies per donar-me suport en moments molt durs, quan he estat a punt de tirar la tovallola.

Gracias **José M. Sahuquillo**, por tu insistencia desde que nos conocemos, ya que has sido el catalizador para que acabara la Tesis cuando la tenia olvidada.

I finalment, gràcies **Jaume**, per la teva paciència de sant, per fer-me veure ja a la carrera que la genètica pot ser maca (segueixo essent escèptica en quant a la molecular.. ☺) i perquè si he arribat fins aquí és gràcies a tu. No puc expressar en paraules la sort que tinc de tenir-te al meu costat, és un regal la vida amb tu.

## ÍNDEX



## ÍNDEX

### GLOSSARI D'ABREVIATURES

### RELACIÓ DE TAULES

### RELACIÓ DE FIGURES

## I INTRODUCCIÓ

<b>1. Les neoplàsies limfoides de cèl·lula B.....</b>	<b>1</b>
1.1 Origen cel·lular dels limfomes de cèl·lula B.....	1
1.1.1 La medul·la òssia.....	3
1.1.2 Els fol·licles limfoides.....	6
1.1.3 La zona marginal esplènica.....	11
1.2 Les síndromes limfoproliferatives B.....	12
<b>2. Tècniques citogenètiques per a l'estudi de les síndromes limfoproliferatives B.....</b>	<b>14</b>
2.1 La citogenètica convencional en l'estudi de les síndromes limfoproliferatives B.....	14
2.1.1 Alteracions cromosòmiques estructurals.....	17
2.1.1.1 Translocacions cromosòmiques.....	18
2.1.1.2 Altres alteracions estructurals.....	20
2.1.2 Alteracions cromosòmiques numèriques.....	21
2.2 Tècniques de citogenètica molecular.....	22
2.2.1 Hibridació <i>in situ</i> fluorescent (FISH).....	22
2.2.2 Cariotipat espectral ( <i>Spectral karyotyping</i> , SKY).....	23
<b>3. El limfoma de la zona marginal esplènica.....</b>	<b>25</b>
3.1 Característiques clíniques.....	28
3.2 Característiques histològiques i citològiques de la melsa.....	33
3.3 Característiques de la medul·la òssia i la sang perifèrica.....	37
3.3.1 Medul·la òssia.....	37
3.3.2 Sang perifèrica.....	39
3.4 Diagnòstic diferencial.....	41
<b>4. Alteracions citogenètiques en els limfomes de la zona marginal esplènica.....</b>	<b>46</b>
4.1 Alteracions cromosòmiques numèriques.....	48

4.1.1	Trisomia 3.....	48
4.2	Alteracions cromosòmiques estructurals.....	49
4.2.1	Deleció de 7q.....	50
4.2.2	Translocacions dels gens de les immunoglobulines. ....	52
4.2.3	Altres translocacions.....	54
<b>5.</b>	<b>Alteracions moleculars en els limfomes de la zona marginal esplènica</b> .....	<b>54</b>
5.1	Hipermutacions somàtiques de les immunoglobulines.....	54
5.2	Altres alteracions moleculars.....	56

## II HIPÒTESI DE TREBALL I OBJECTIUS

1.	Hipòtesi de treball.....	61
2.	Objectius.....	61

## III MATERIAL I MÈTODES

1.	Pacients.....	65
2.	Mètodes.....	65
2.1	Tècniques de citogenètica convencional.....	65
2.1.1	Extracció i conservació de les mostres.....	66
2.1.2	Composició del medi de cultiu.....	67
2.1.3	Cultiu de sang perifèrica.....	68
2.1.4	Cultiu de medul·la òssia.....	70
2.1.5	Cultiu de gangli limfàtic.....	71
2.1.6	Extensions cromosòmiques.....	73
2.1.7	Tècniques d'identificació cromosòmica.....	74
2.1.8	Anàlisi microscòpica i nomenclatura de la citogenètica convencional.....	75
2.2	Tècniques d'hibridació <i>in situ</i> fluorescent (FISH).....	75
2.2.1	Obtenció d'ADN de <i>Bacterial Artificial Chromosome</i> per a la síntesi de sondes no comercials.....	77
2.2.2	Marcatge directe de la sonda amb fluorescència mitjançant <i>nick translation</i> .....	80



2.2.3 Hibridació <i>in situ</i> fluorescent per a sondes centromèriques i específiques de <i>locus</i> per a cèl·lules en suspensió (Carnoy).....	82
2.2.4 Hibridació <i>in situ</i> fluorescent sobre teixit parafinat.....	85
2.2.5 Hibridació <i>in situ</i> fluorescent per a sondes de pintat cromosòmic.....	87
2.2.6 Cariotipat espectral ( <i>Spectral Karyotyping</i> , SKY).....	89
2.2.7 Criteris de valoració de la hibridació <i>in situ</i> fluorescent i establiment dels nivells de tall per a cada tipus de sonda.....	93
2.3 Tècniques d'Immunohistoquímica.....	94

#### **IV RESULTATS**

1. Primer treball.....	99
2. Segon treball.....	106
3. Tercer treball.....	120

#### **V DISCUSSIÓ**

1. La t(9;14)(p13;q32) en LZME.....	131
2. Noves alteracions cromosòmiques en LZME detectades per cariotipat espectral (SKY).....	133
3. El gen FOXP1 en LZME: estudi de la t(3;14)(p14;q32) per FISH i de l'expressió de la proteïna FOXP1 per IHQ.....	138

#### **VI CONCLUSIONS**

.....	143
-------	-----

#### **VII BIBLIOGRAFIA**

.....	147
-------	-----

#### **VIII ANNEX**

1. Solucions per a les tècniques de citogenètica convencional i hibridació <i>in situ</i> fluorescent (FISH).....	165
2. Publicacions relacionades amb la Tesi Doctoral.....	169



## **GLOSSARI D'ABREVIATURES**



## GLOSSARI D'ABREVIATURES

ADN	Àcid desoxirribonucleic
ADNc	ADN còpia
aHGC	<i>array</i> d'hibridació genòmica comparada
ARN	Àcid ribonucleic
ARNc	ARN còpia
BAC	<i>Bacterial artificial chromosome</i>
BCR	<i>B cell receptor</i>
CCD	<i>Charge-coupled device</i>
CHOP	Ciclofosfamida, doxorubicina, vincristina i prednisona
CHORI	<i>Children's Hospital Oakland Research Institute</i>
CO <sub>2</sub>	Diòxid de carboni
DAB	5'-3' Diaminobenzidina
DAPI	4',6 Diamidino-2-fenilindol diclorhidrat
dATP	<i>deoxy-adenosin triphosphate</i>
dCTP	<i>deoxy-cytosine triphosphate</i>
DEPC	<i>Diethylpyrocarbonate</i>
dGTP	<i>deoxy-guanine triphosphate</i>
DMSO	<i>Dimethyl sulfoxide</i>
dNTP	<i>deoxy-nucleotide triphosphate</i>
dTTP	<i>2'-deoxythymidine 5'-triphosphate</i>
ECOG	<i>Eastern Cooperative Oncologic Group</i>
EDTA	<i>Ethylene diamine tetraacetic acid</i>
FISH	<i>Fluorescence in situ hybridization</i>
HCl	Àcid clorhídric
HE	Hematoxilina-eosina
HGC	Hibridació genòmica comparada
Ig	Immunoglobulina
IgH	Immunoglobulina de cadena pesada
IgK	Immunoglobulina de cadena lleugera kappa
IgL	Immunoglobulina de cadena lleugera lambda
ILSG	<i>International Lymphoma Study Group</i>
ISCN	<i>International System for Human Cytogenetic Nomenclature</i>

Kb	Kilobase
KCl	Clorur de potassi
LDH	Lactat deshidrogenasa
LCM	Limfoma de cèl·lules del mantell
LCP	Leucèmia de cèl·lules peludes
LDCG	Limfoma difús de cèl·lula gran
LELV	Limfoma esplènic amb limfòcits vellosos circulants
LF	Limfoma fol·licular
LLC	Leucèmia limfàtica crònica
LLP	Limfoma limfoplasmacític
LMC	Leucèmia mieloide crònica
LNH	Limfoma no Hodgkin
LOH	<i>Loss of Heterozygosity</i>
LPL	Leucèmia prolimfocítica
LZM	Limfoma de la zona marginal
LZME	Limfoma de la zona marginal esplènica
M	Molar
MAKA	<i>Major Karyotypic Abnormalities</i>
MALT	<i>Mucose Associated Lymphoid Tissue</i>
Mb	Megabase
Mg	Miligram
MgCl <sub>2</sub>	Clorur de magnesi
MIKA	<i>Minor Karyotypic Abnormalities</i>
mL	Mililitre
MM	Mieloma múltiple
mM	Milimolar
µg	Microgram
µL	Microlitre
NaAc	Acetat sòdic
NaCl	Clorur de sodi
NFW	<i>Nuclease Free Water</i>
ng	Nanogram
NK	<i>Natural Killer</i>
OMS	Organització Mundial de la Salut

ON *Overnight*  
PAC *Plasmid Artificial Chromosome*  
PBS *Phosphate Buffered Saline*  
Ph' Cromosoma filadèlfia  
PHA Fitohemaglutinina  
pmol Picomol  
RC Remissió completa  
R-CHOP Rituximab-CHOP  
REAL *Revised European-American classification of lymphoid neoplasms*  
Rpm Revolucions per minut  
SCDR *Small Commonly Deleted Region*  
SLP-B Síndromes limfoproliferatives B  
SMD Síndromes mielodisplàsiques  
SKY *Spectral Karyotyping*  
TA Temperatura ambient  
TPA Acetat de miristat de tetraforbol  
VHC Virus de la hepatitis C





## **RELACIÓ DE TAULES**



<b>Taula 1.</b> Classificació actual de les neoplàsies limfoides de cèl·lula B madura segons la OMS.....	13
<b>Taula 2.</b> Principals translocacions cromosòmiques de les SLP-B que afecten els <i>loci</i> de les Ig.....	19
<b>Taula 3.</b> Alteracions cromosòmiques més freqüents i rellevants a nivell diagnòstic a les SLP-B.....	20
<b>Taula 4.</b> Alteracions cromosòmiques numèriques més freqüents i rellevants per al diagnòstic a les SLP-B.....	21
<b>Taula 5.</b> Esquema dels diferents marcadors utilitzats per al diagnòstic diferencial del LZME versus altres SLP-B.....	37
<b>Taula 6.</b> Diagnòstic diferencial en sang perifèrica entre el LZME i la LCP.....	43
<b>Taula 7.</b> Immunofenotip per al diagnòstic diferencial de les SLP-B cròniques. 7A Immunofenotip per histologia i 7B Immunofenotip per citologia.....	45
<b>Taula 8.</b> Volums dels reactius necessaris per a la reacció de <i>nick translation</i> ..	81
<b>Taula 9.</b> Nivells de tall establerts per a les sondes d'hibridació <i>in situ</i> fluorescent comercials.....	93
<b>Taula 10.</b> Nivells de tall establerts per a les sondes d'hibridació <i>in situ</i> fluorescent dissenyades a partir de BAC.....	94
<b>Taula 11.</b> Característiques clíniques dels tres pacients diagnosticats de LZME amb t(9;14)(p13;q32).....	101
<b>Taula 12.</b> Característiques citogenètiques (mitjançant SKY) dels tres pacients diagnosticats de LZME amb t(9;14)(p13;q32).....	102
<b>Taula 13.</b> Resultats dels estudis per FISH de la t(9;14)(p13;q32) i la t(14;19)(q32;q13).....	103
<b>Taula 14.</b> Característiques clíniques i de laboratori dels 23 pacients amb LZME al moment del diagnòstic.....	108

<b>Taula 15.</b> Cariotips per citogenètica convencional i SKY de 23 pacients amb LZME.....	112-113
<b>Taula 16.</b> Reinterpretació de les dades obtingudes per citogenètica convencional després de l'anàlisi per SKY (punts de trencament basats en el bandeig G).....	114-115
<b>Taula 17.</b> Estudi per FISH de les alteracions identificades per SKY.....	118
<b>Taula 18.</b> Resultats de citogenètica, FISH i immunohistoquímica (IHQ) dels LZME estudiats.....	126-128

## **RELACIÓ DE FIGURES**



<b>Figura 1.</b> Esquema de les Ig.....	2
<b>Figura 2.</b> Representació dels diferents estadis de maduració de les cèl·lules B i la correspondència amb els diferents tipus de neoplàsies.....	3
<b>Figura 3.</b> Esquema dels diferents segments gènics que codifiquem per a les Ig de cadena pesada i cadena lleugera.....	4
<b>Figura 4.</b> A) Esquema del reordenament VDJ dels gens de la regió V de les cadenes pesades de les Ig.....	5
B) Esquema del reordenament VJ dels gens de la regió V de les cadenes lleugeres de les Ig.....	5
<b>Figura 5.</b> Tall histològic de melsa tenyit amb hematoxilina-eosina (HE) en el que es poden observar les polpes blanca i vermella així com els diferents tipus de fol·licles limfoides.....	6
<b>Figura 6.</b> Mecanisme de canvi d'isotip de cadena pesada.....	7
<b>Figura 7.</b> Estadis de diferenciació dels limfòcits B al centre germinal.....	9
<b>Figura 8.</b> Principals neoplàsies de cèl·lula B en relació amb els estadis de diferenciació de les cèl·lules B dins del centre germinal.....	10
<b>Figura 9.</b> Processat dels espectres fluorescents per a l'obtenció d'imatges espectrals.....	24
<b>Figura 10.</b> Cariotip en colors de cromosomes humans.....	24
<b>Figura 11.</b> Esquema de les diferents opcions terapèutiques en el tractament dels LZME proposat pel <i>Splenic B-cell Lymphoma Group</i> .....	33
<b>Figura 12.</b> Microfotografia a baix augment de la melsa amb patró nodular característic d'un pacient diagnosticat de LZME.....	34
<b>Figura 13.</b> Microfotografia amb augment 200X de la melsa d'un pacient diagnosticat de LZME amb patró d'infiltració difús.....	35
<b>Figura 14A.</b> Microfotografia a gran augment d'una medul·la òssia amb un patró d'infiltració intrasinusoidal característic de LZME.....	38
<b>Figura 14B.</b> Microfotografia a baix augment d'una medul·la òssia de LZME amb un patró d'infiltració nodular intertrabecular.....	39
<b>Figura 15.</b> Limfòcits vellosos característics de la infiltració en sang perifèrica dels LZME.....	40
<b>Figura 16.</b> Esquema de la superposició dels LZME amb altres SLP-B.....	42
<b>Figura 17.</b> Noves unitats transcripcionals degudes a la t(9;14)(p13;q32).....	100

<b>Figura 18.</b> SKY del cas 1 com a imatge representativa de la possible t(9;14)(p13;q32).....	104
<b>Figura 19.</b> A) Reordenament de <i>PAX-5</i> al cromosoma derivatiu 14 (cas 2). B) El reordenament d' <i>IGH</i> confirma la translocació recíproca t(9;14)(p13;q32) (cas 3).....	104
<b>Figura 20.</b> El senyal de trencament de <i>BCL3</i> confirma la implicació d'aquest gen en la t(14;19)(q32;q13).....	105
<b>Figura 21.</b> Esquema dels BAC escollits per a la elaboració de la sonda del gen <i>CDK6</i> .....	110
<b>Figura 22.</b> Imatges de la citogenètica convencional versus l'SKY dels pacients 13 (A) i 21 (B).....	116
<b>Figura 23.</b> Esquema dels BAC escollits per a la elaboració de la sonda del gen <i>FOXP1</i> .....	122
<b>Figura 24.</b> A) Secció de melsa tenyida del pacient 8 (tinció HE) augment 200X. B) Expressió de <i>FOXP1</i> del mateix fol·licle limfoide.....	124



## **I INTRODUCCIÓ**

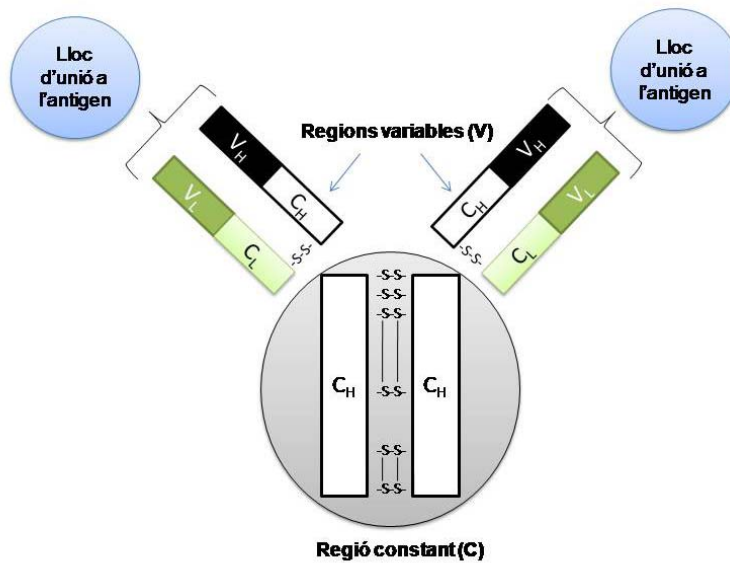


## **1. LES NEOPLÀSIES LIMFOIDES DE CÈL·LULA B**

Els limfomes són neoplàsies malignes degudes a la proliferació clonal de cèl·lules B, T o NK (*Natural Killer*) en algun dels estadis del procés de diferenciació cel·lular (Swerdlow i col., 2008). Aproximadament un 95% dels limfomes són d'origen B i el 5% restant d'origen T/NK. Tenint en compte que en el cos humà existeix una proporció similar de limfòcits B i T, la diferència en la freqüència de llurs neoplàsies només es pot explicar en funció dels factors específics que influeixen en la patogènesi dels limfomes de cèl·lula B (Küppers, 2005). La majoria de les neoplàsies de cèl·lula B tendeixen a mimetitzar estadis de la diferenciació normal dels limfòcits B (on factors crucials per al desenvolupament normal són també essencials per al creixement maligne), de manera que poden ser classificades tenint en compte aquesta correspondència (Swerdlow i col., 2008).

### **1.1 ORIGEN CEL·LULAR DELS LIMFOMES DE CÈL·LULA B**

El desenvolupament dels limfòcits B està estrictament associat a la selecció d'un receptor de cèl·lula B específic (BCR, de l'anglès *B cell receptor*), de manera que al final de llur maduració seran cèl·lules programades genèticament per a reconèixer de forma pràcticament exclusiva un únic antígen mitjançant el seu BCR. Del reconeixement antígen-BCR se'n deriva la producció d'anticossos d'alta afinitat mitjançant els quals el sistema immunitari du a terme llur activitat defensiva. Els anticossos de les cèl·lules B reben el nom d'immunoglobulines (Ig) i presenten una regió constant (C) constituïda per cadenes pesades i una regió variable (V) constituïda per cadenes pesades i lleugeres (Figura 1). La regió V s'encarrega del reconeixement de l'antígen, mentre que la regió C s'encarrega d'iniciar les funcions efectores contra aquest (Abbas i col., 1999).

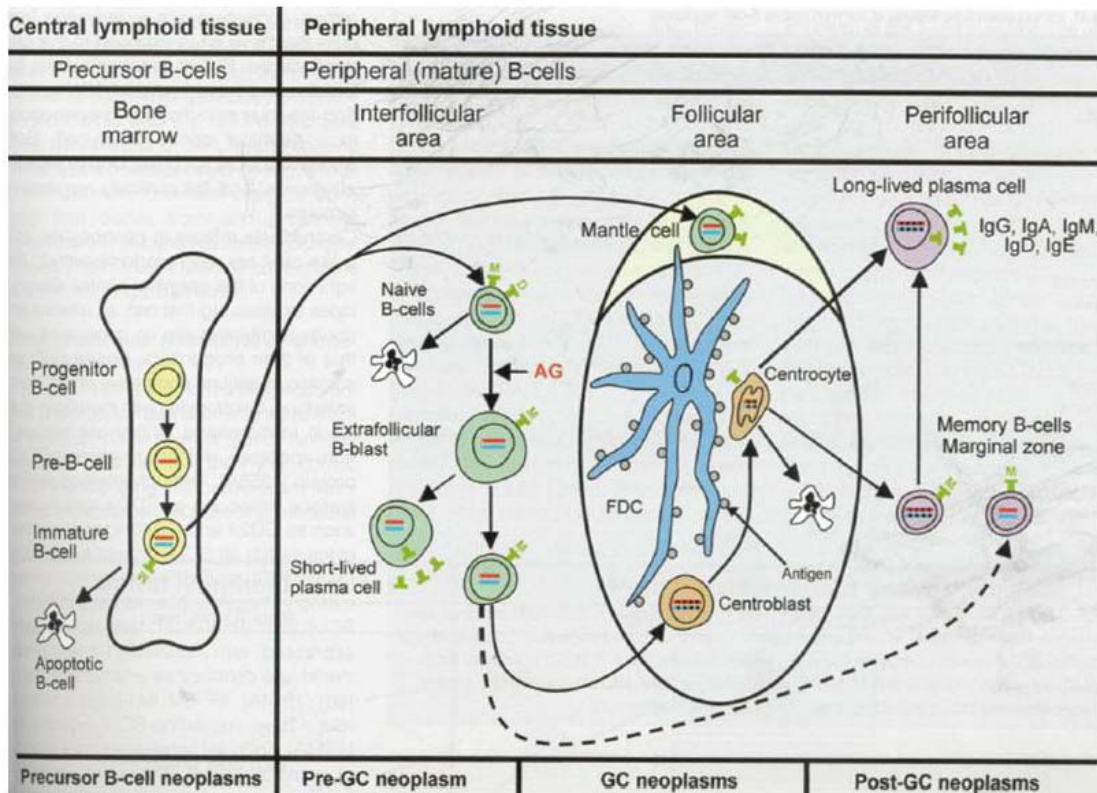


**Figura 1.** Esquema de les Ig, on es troben representades les regions constants (C) i variables (V) així com els llocs d'unió a l'antigen (adaptat d'Abbas i col., 1999).

El BCR canvia la seva estructura al llarg dels processos de maduració cel·lular en els quals la cèl·lula expressa marcadors de diferenciació específics. D'altra banda, els receptors de superfície s'encarreguen de modular el BCR de manera que segons les necessitats immunològiques les cèl·lules proliferaran amb especificitat per a un antígen en concret o bé continuaran llur desenvolupament fins a limfòcits B de memòria o cèl·lules plasmàtiques efectores (Abbas i col., 1999, Küppers, 2005, Swerdlow i col., 2008).

La gran majoria dels limfomes de cèl·lula B s'originen per la disrupció d'alguna de les fases del desenvolupament normal d'aquests limfòcits i ha estat demostrat que factors crucials per al desenvolupament normal de les cèl·lules B són també necessaris per a la proliferació maligna (Stevenson i col., 1998, Küppers i col., 1999, Natkunam, 2007, Klein i col., 2008). D'altra banda, cal esmentar que de la mateixa manera que a la resposta immune, als limfomes existeix BCR-dependència per a la supervivència cel·lular: si el BCR s'inactiva, les cèl·lules B no sobreviuen i perden llur identitat B de manera que no pot desenvolupar-se un tumor (Küppers, 2005).

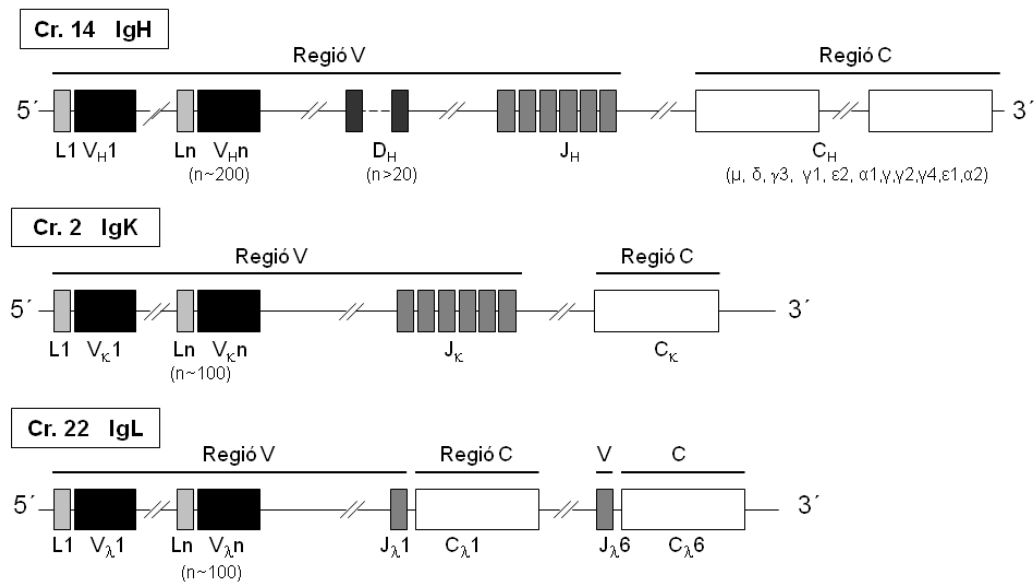
Els diferents estadis de desenvolupament dels limfòcits B es donen en estructures histològiques específiques, de manera que analitzant conjuntament el lloc de diferenciació i l'estructura del BCR es pot determinar l'origen de les cèl·lules B i dels limfomes corresponents (Figura 2).



**Figura 2.** Representació dels diferents estadis de maduració de les cèl·lules B i la correspondència amb els diferents tipus de neoplàsies (Swerdlow i col., 2008).

### 1.1.1 LA MEDULLA ÒSSIA

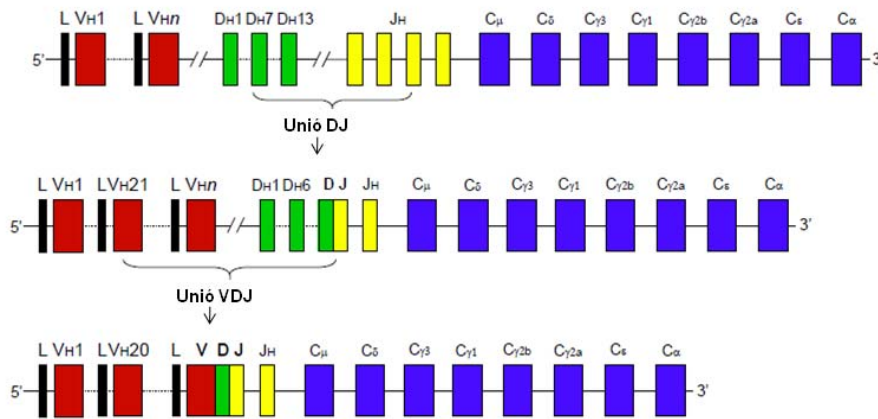
El repertori d'antígens als quals s'han d'enfrontar els limfòcits B és molt elevat, de manera que per a generar tal quantitat de receptors diferents a partir d'un genoma comú i finit és necessari que es produeixin reordenaments de determinats segments gènics de les Ig, tant de les de cadena pesada (H, *heavy*) com de les de cadena lleugera (K, kappa o L, lambda). La figura 3 representa un esquema de l'organització multigènica d'aquests gens.



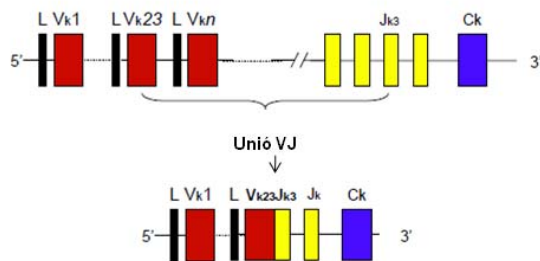
**Figura 3.** Esquema dels diferents segments gènics que codifiquem per a les Ig de cadena pesada (IgH) localitzats al cromosoma 14 i de les cadenes lleugeres IgK i IgL localitzats als cromosomes 2 i 22 respectivament.

El procés de reordenament té lloc a la medul·la òssia, on comença la diferenciació de les cèl·lules B a partir dels anomenats progenitors B (cèl·lules blàstiques precussors de tota la línia cel·lular B). En aquestes cèl·lules pro-B té lloc la recombinació dels gens de la IgH de les futures Ig de membrana (Figura 4A). Aquest reordenament dona lloc a un pre-BCR (cèl·lula pre-B) que estimula el reordenament de les cadenes lleugeres kappa i lambda de la mateixa manera que a les cadenes pesades (Figura 4B).

El resultat d'aquest procés, necessari per tal d'originar un BCR funcional per a la interacció antigènica, és una cèl·lula B primària *naïve* (verge, perquè no ha entrat en contacte amb un antigen) amb Ig de superfície madures (IgM+, IgD+) (Abbas i col., 1999, Küppers, 2005).



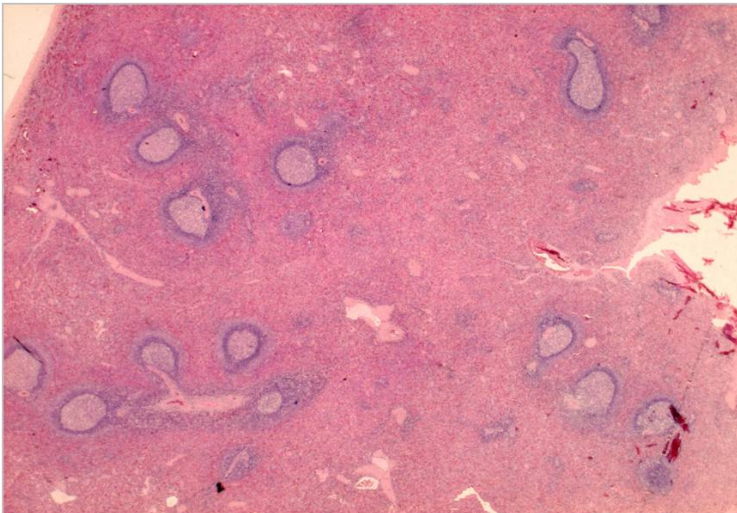
**Figura 4A.** Esquema del reordenament VDJ dels gens de la regió V de les cadenes pesades de les Ig. Existeix una gran diversitat de segments V, D i J i el reordenament té lloc de forma ordenada: primer es seleccionen els segments DJ i al segment reordenat se li afegeix una versió V (adaptat d'Abbas i col., 1999).



**Figura 4B.** Esquema del reordenament VJ dels gens de la regió V de les cadenes lleugeres de les Ig (adaptat d'Abbas i col., 1999).

### 1.1.2 ELS FOL·LICLES LIMFOIDES

Els fol·licles limfoides són estructures esfèriques constituïdes inicialment per l'agrupació de limfòcits B arribats del moll de l'òs i per cèl·lules dendrítiques fol·liculars. Es tracta d'estructures dinàmiques, essencials per a la proliferació, diferenciació i apoptosi de les cèl·lules B (Küppers, 2005). Els fol·licles limfoides poden mostrar una regió central més clara anomenada centre germinal, i una zona perifèrica denominada mantell. Els fol·licles limfoides que no presenten centre germinal ni regió del mantell s'anomenen fol·licles primaris i, els que en tenen, fol·licles secundaris (Figura 5).



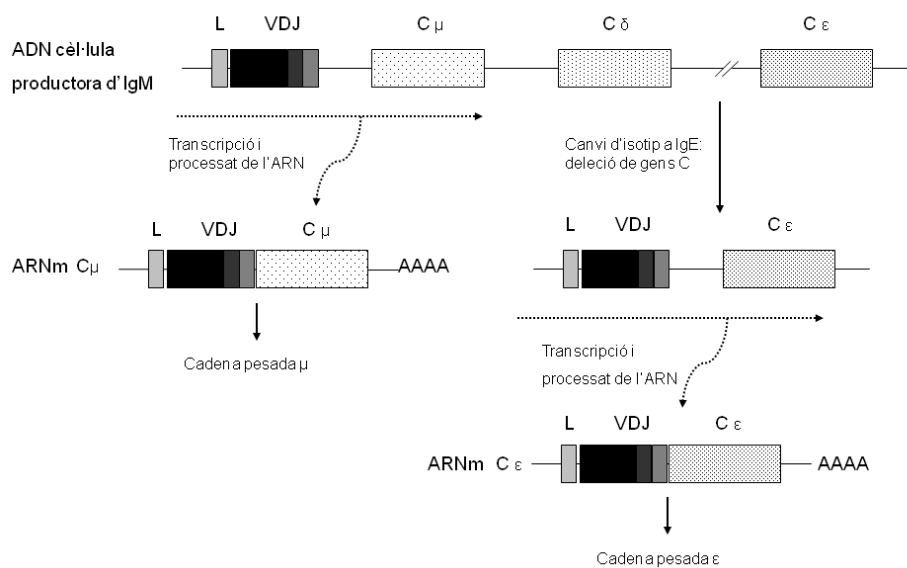
**Figura 5.** Tall histològic de melsa teixit amb hematoxilina-eosina (HE) en el que es poden observar les polpes blanca i vermella així com els diferents tipus de fol·licles limfoides. Fotografia realitzada pel Servei de Patologia de l'Hospital del Mar (Barcelona).

#### **El centre germinal**

El centre germinal és l'àrea de l'interior dels fol·licles limfoides secundaris en la que té lloc el procés de maduració de les cèl·lules B.



Els centres germinals experimenten un procés d'evolució-involució al llarg de la resposta immune, que conclou amb la formació de limfòcits B de memòria i de cèl·lules plasmàtiques efectores. Amb aquesta finalitat, té lloc als centres germinals la hipermutació somàtica i canvi d'isotip (per augmentar la variabilitat de la resposta immune) dels gens que codifiquen respectivament per a les regions V i C de les Ig. La hipermutació somàtica és un procés de mutació programada que afecta principalment els exons de les regions V de les IgH, IgK i IgL. Les mutacions puntuals generen canvis d'aminoàcids que acaben afectant els llocs d'unió a l'antigen, de manera que augmenta l'afinitat antigen-anticòs. Pel que fa al canvi d'isotip, és un procés en el que els segments VDJ reordenats es recombinen amb un gen de la regió C. Com les cadenes variables es mantenen igual, l'especificitat d'unió a l'antigen no varia però com la regió constant és diferent un mateix anticòs podrà interactuar amb diferents molècules efectores (Figura 6) (Abbas i col., 1999).

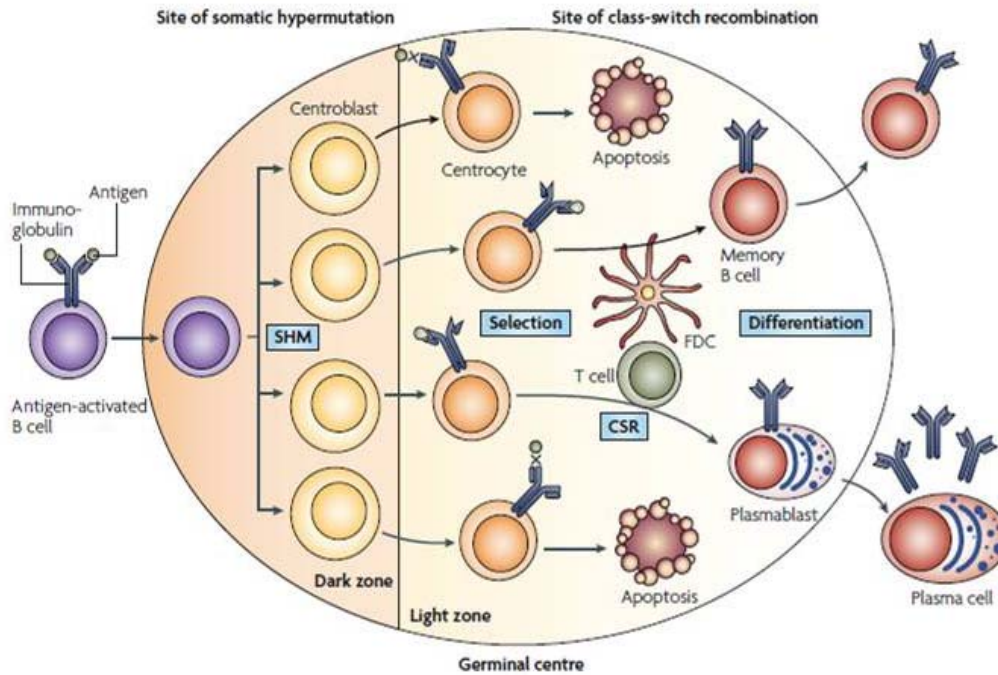


**Figura 6.** Mecanisme de canvi d'isotip de cadena pesada (adaptat d'Abbas i col., 1999).

Gràcies a aquests processos durant la resposta immunològica es generen anticossos d'alta afinitat (MacLennan i col., 1986, Berek i col., 1991, Jacob i col., 1991, Abbas i col., 1999, Klein i col., 2008, Tracey i col., 2008).

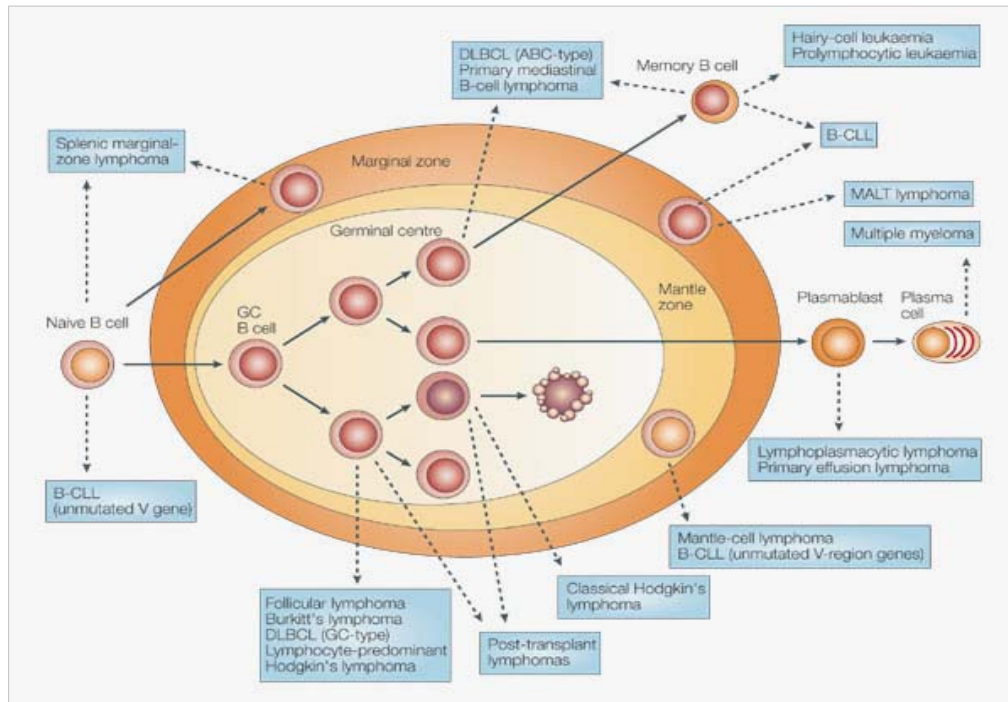
Els limfòcits B primaris verges procedents de la medul·la òssia entren en contacte amb els antigens per mitjà de les cèl·lules dendrítiques fol·liculars (o cèl·lules presentadores d'antigen) i aleshores els seus BCR són activats pels limfòcits T CD4+. Les cèl·lules B activades entren al centre germinal on es diferencien a centroblastes que s'expandeixen de forma clonal (Figura 7). Durant el procés de proliferació té lloc la hipermutació somàtica de les cadenes variables de les Ig (canvis de bases a la regió que codifica per al lloc d'unió de l'antigen) per tal de generar un repertori divers d'anticossos. A mesura que avancen pel centre germinal, els centroblastes es diferencien a centròcits que són seleccionats en funció de la seva capacitat immune enfront l'antigen (Küppers, 2005, Klein i col., 2008). Per la seva banda, als centròcits es reordena la regió C de la cadena H de les Ig (la regió V queda igual) de manera que experimenten un canvi d'isotip. Mitjançant aquest procés, s'augmenta el nombre de molècules efectores amb les que l'anticòs pot interaccionar sense quedar afectada la seva especificitat antigènica (Abbas i col., 1999).

De les cèl·lules B seleccionades per la seva capacitat de resposta immunològica, una part evolucionarà a cèl·lules B de memòria mentre que l'altra es diferencia a cèl·lules plasmàtiques efectores (Klein i col., 2008).



**Figura 7.** Estadis de diferenciació dels limfòcits B al centre germinal (Klein i col., 2008).

La resposta immune que té lloc al centre germinal es troba en un equilibri en el que qualsevol factor que afecti l'homeòstasi en el desenvolupament de les cèl·lules B pot derivar en una lesió oncogènica (Shaffer i col., 2002, Küppers, 2005). L'origen cel·lular de les neoplàsies limfoides B de cèl·lula madura té a veure doncs amb l'estadi en que els limfòcits B han quedat "aturats" al centre germinal (Figura 8).



**Figura 8.** Principals neoplàsies de cèl·lula B en relació amb els estadis de diferenciació de les cèl·lules B dins del centre germinal (Küppers, 2005).

Les translocacions citogenètiques balancejades constitueixen el marcador genètic de la gran majoria dels limfomes no Hodgkin (LNH) als que pertanyen les neoplàsies de cèl·lula B. L'expressió dels gens translocats, generalment protooncogens, queda disregulada com a conseqüència principalment de la seva juxtaposició amb els *loci* de les Ig (Küppers i col., 2001, Küppers, 2005). Al llarg del desenvolupament de les cèl·lules B, existeixen diferents estadis que poden afavorir l'aparició de translocacions cromosòmiques i genotips aberrants:

- El reordenament de les Ig per formar el BCR.
- Hipermutació somàtica.
- Canvi d'isotip.

El resultat són múltiples depenent de l'estadi on s'ha produït la lesió. Pot existir bloqueig en la diferenciació, bloqueig de l'apoptosi o bé proliferació cel·lular descontrolada (Küppers i col., 2001, Shaffer i col., 2002, Küppers, 2005).

Shen i col·laboradors (2004) van descriure un patró d'expressió gènica per als diferents compartiments dels òrgans limfoides el qual identifica els gens relacionats amb la proliferació, supervivència i maduració de les cèl·lules B i que és de molta ajuda en l'estudi de les neoplàsies limfoides.

### 1.1.3 LA ZONA MARGINAL ESPLÈNICA

La zona marginal dels fol·licles limfoides va ser descrita inicialment a la melsa, com a una zona perifèrica dels fol·licles primaris i del mantell fol·licular als secundaris, formada per cèl·lules de tamany mig amb citoplasma clar. Es tracta d'una regió que conté sinus venosos petits orientats circularment al voltant de la polpa blanca on va a parar la sang arterial (Wheater i col., 1987). La zona marginal esplènica és doncs una àrea situada en la zona límit entre les polpes blanca i vermella de la melsa constituïda principalment per cèl·lules B i en menor quantitat limfòcits T. Mitjançant l'anàlisi de les mutacions somàtiques de les Ig, es va poder determinar que les cèl·lules B són majoritàriament cèl·lules de memòria. A part d'aquests limfòcits B i T, es troben en aquesta àrea les cèl·lules marginals pròpiament dites, així com una barreja de limfòcits petits, blastes grans, macròfags, granulòcits, cèl·lules plasmàtiques, i una subpoblació de cèl·lules B monocitoides (Arcaini i col., 2003, Mollejo i col., 2005). Per llur composició cel·lular, la zona marginal està especialment capacitada per a actuar en la resposta immunològica ràpida contra antígens circulants en sang i d'altra banda ha estat demostrat que la resposta tímica a antígens de tipus 2 també depèn del funcionament normal de la zona marginal esplènica (Stamatopoulos i col., 2004).

La zona marginal, defineix *strictu sensu* una àrea microanatòmica de la melsa, però també ha estat descrita en noduls limfàtics, especialment en aquells que drenen les mucoses, amb fenotip i topografia similar a l'esplènica tot i que normalment és tracta d'una zona poc desenvolupada (s'associa a limfadenopaties reactives) (Arcaini i col., 2003).

Immunohistoquímicament les cèl·lules de la zona marginal esplènica poden caracteritzar-se per ser CD20+, CD79a+, IgM+, CD21+, fosfatasa alcalina+, CD23-, BCL6- i IgD- o dèbilment positiu i no expressar CD5, CD10, CD23 ni CD43 (Mollejo i col., 2005). L'únic marcador que sembla ser específic per aquest tipus cel·lular és l'anticòs monoclonal IRTA1, el qual reacciona selectivament amb un subtipus de cèl·lules B de la zona marginal, però que no existeix de forma comercial (Arcaini i col., 2003). Les cèl·lules de la zona marginal tenen a més a més, un paper important en el transport de complexes immunològics circulants cap a l'interior dels fol·licles limfoides, depositant-los a la superfície de les cèl·lules dendrítiques fol·liculars. (Mollejo i col., 2005).

## 1.2 LES SÍNDROMES LIMFOPROLIFERATIVES B

Les síndromes limfoproliferatives (SLP) constitueixen una sèrie de malalties que tenen en comú l'existència d'una proliferació clonal de cèl·lules limfoides B o T. Antigament el seu diagnòstic es basava fonamentalment en llurs característiques clíniques, morfològiques i immunofenotípiques. L'aparició de les tècniques de citogenètica i biologia molecular va esdevenir el detonant per a que L'*International Lymphoma Study Group* (ILSG) creés una nova classificació de les síndromes limfoproliferatives que tingués en compte les aportacions d'aquestes tecnologies. Posteriorment, el consens de la ILSG va resultar en l'aparició de la classificació REAL (*Revised European-American Classification of Lymphoid Neoplasms*, Harris i col., 1994), amb els seus avantatges i inconvenients. Des del 1995, els membres de les societats europea i americana d'hematopatologia han estat col·laborant en l'elaboració d'una nova classificació, la classificació de l'Organització Mundial de la Salut (OMS) (*World Health Organization Classification for Hematologic Malignancies*). Aquesta classificació, recull de manera sistemàtica els avenços en la caracterització de les neoplàsies limfoides.

Actualment, l'aparició de noves tècniques d'anàlisi com els *arrays* d'hibridació genòmica comparada (aHGC) o els *microarrays* d'expressió han permès un estudi més acurat d'aquestes patologies, amb la conseqüent revisió de la versió del 2001 (Jaffe i col., 2001) i l'aparició d'una altra més actual (Swerdlow i col., 2008).

Cal esmentar que aquesta classificació no només és important a nivell de patogènesi sinó que també és rellevant a nivell terapèutic. La taula 1 representa esquemàticament aquesta última actualització.

**Taula 1.** Classificació actual de les neoplàsies limfoides de cèl·lula B madura segons la OMS.

---



---

Leucèmia limfàtica crònica
Leucèmia promielocítica de cèl·lula B
Limfoma de la zona marginal esplènica
Leucèmia de cèl·lules peludes
Limfoma/leucèmia esplènica de cèl·lula B no classificable
Limfoma esplènica de cèl·lula B petita difús de polpa vermella
Leucèmia de cèl·lules peludes variant
Limfoma limfoplasmacític
Macroglobulinèmia de Waldenström
Malalties de cadena pesada
Malaltia de cadena pesada alfa
Malaltia de cadena pesada gamma
Malaltia de cadena pesada mu
Mieloma de cèl·lules plasmàtiques
Plasmacitoma solitari de l'òs
Plasmacitoma extraòssi
Limfoma de la zona marginal extranodal de teixit limfoide associat a mucosa (Limfoma MALT)
Limfoma de la zona marginal nodal
Limfoma de la zona marginal nodal pediàtric
Limfoma folicular
Limfoma folicular pediàtric
Limfoma de centre folicular primari cutani
Limfoma de cèl·lules del mantell
Limfoma difús de cèl·lula gran
Limfoma de cèl·lula gran ric en cèl·lules T/histiòcits
Limfoma difús de cèl·lula gran primari del sistema nerviós central
Limfoma difús de cèl·lula primari cutani tipus cames
Limfoma difús de cèl·lula Epstein-Barr positiu de la gent gran
Limfoma difús de cèl·lula gran associat a inflamacions cròniques
Granulomatosi limfomatoide
Limfoma de cèl·lula gran primari mediastínic (tímic)
Limfoma de cèl·lula gran intravascular
Limfoma de cèl·lula gran ALK positiu
Limfoma plasmablàstic
Limfoma de cèl·lula gran que apareix en la malaltia de Castleman multicèntrica associada a HHV8
Limfoma primari de vessament
Limfoma de Burkitt
Limfoma de cèl·lula B no classificable, amb característiques intermitges entre limfoma difús de cèl·lula gran i limfoma de Burkitt
Limfoma de cèl·lula B no classificable, amb característiques intermitges entre limfoma difús de cèl·lula gran i limfoma de Hodgkin clàssic

---



---

Actualment, els exàmens morfològic de sang perifèrica i histològic de medul·la òssia o gangli, combinats amb tècniques serològiques, immunofenotípiques, ultraestructurals, citogenètiques i de biologia molecular, permeten caracteritzar la majoria de les SLP-B.

Cadascuna d'elles presenta característiques clínicopatològiques diferenciades i gràcies a l'aparició constant de noves tècniques d'anàlisi s'identifiquen i descriuen progressivament alteracions genètiques específiques implicades en la seva etiologia.

## **2. TÈCNIQUES CITOGENÈTIQUES PER A L'ESTUDI DE LES SÍNDROMES LIMFOPROLIFERATIVES B**

### **2.1 LA CITOGENÈTICA CONVENCIONAL EN L'ESTUDI DE LES SÍNDROMES LIMFOPROLIFERATIVES B**

L'any 1914, Boveri va ser el primer en suggerir que les anomalies cromosòmiques podien ser les responsables del càncer (Boveri, 1914), però no va ser fins que es va aconseguir visualitzar els cromosomes (Tjio i Levan, 1956) que la hipòtesi va ser acceptada. La primera alteració cromosòmica associada directament a un càncer (concretament a la leucèmia mieloide crònica, LMC) va ser descrita l'any 1960 per Nowell i Hungerford en forma d'un petit cromosoma al que van anomenar "Cromosoma Filadèlfia" (Ph'). Gràcies a ells es va poder afirmar que les cèl·lules tumorals són portadores d'alteracions cromosòmiques i amb la posterior aparició de les tècniques de bandeig cromosòmic (Caspersson i col., 1970) es van anar detectant anomalies associades a diferents neoplàsies. L'anàlisi per citogenètica convencional va esdevenir clau en la detecció d'alteracions recurrents i va contribuir considerablement a la comprensió dels mecanismes de patogènesi resultants d'aquestes (Rabbitts, 1994).



Les anomalies cromosòmiques poden ser de diferents tipus. Els errors en la segregació mitòtica o meiótica de la divisió cel·lular originen alteracions de tipus numèric (aneuploïdies) les conseqüències genètiques de les quals són bàsicament (a nivell de neoplàsies hematològiques) un augment del número de còpies d'oncogens o bé la disminució del número de còpies de gens supressors de tumors. D'altra banda, les anomalies citogenètiques que afecten la integritat dels cromosomes reben el nom d'alteracions estructurals i són el resultat de trencaments i reordenaments anòmals entre cromosomes no homòlegs. Les alteracions estructurals més freqüents en les neoplàsies hematològiques són les translocacions, les quals poden ser de tipus balancejat (no hi ha pèrdua de material genètic) o no balancejat (amb pèrdua d'informació genètica) (O'Connor, 2008).

Actualment es coneixen més de 50.000 alteracions cromosòmiques clonals que han estat publicades en diferents articles i recollides en una base de dades: <http://cgap.nci.nih.gov/chromosomes/mitelman>.

Tot i que gairebé la meitat dels tumors sòlids també presenten alteracions citogenètiques, només una tercera part d'aquestes han estat caracteritzades, degut als problemes tècnics que presenten els seus cultius cel·lulars (Muñetón i Ramírez, 2002).

Pel que fa a les neoplàsies hematològiques, en la majoria dels casos les alteracions cromosòmiques recurrents són considerades l'esdeveniment genètic primari de l'oncogènesi, és a dir el mecanisme biològic responsable d'aquesta, així com també són indicadores del fenotip tumoral de i l'evolució clínica (Taki i Taniwaki, 2006). Les alteracions estructurals en forma de translocacions balancejades i els efectes patogènics derivats dels reordenaments són deguts a la producció de proteïnes de fusió o a la disregulació gènica deguda a la juxtaposició de determinats gens (Taki i Taniwaki, 2006). Així per exemple, el cromosoma Ph' origina una proteïna quimèrica BCR-ABL1 amb activitat tirosin-quinasa incrementada que transforma les cèl·lules hematopoiètiques a la LMC (Shteper i Ben-Yehuda, 2001). En el cas de les leucèmies, moltes vegades les teràpies òptimes són aquelles que comporten la erradicació total o parcial del gen de fusió (Goldman, 2009).

Tot i això, el càncer és una malaltia multigènica rarament deguda a un únic canvi genètic, en la que poden donar-se factors de predisposició heretables (Croce, 2008) i els tumors són un compendi de diferents clones que s'han anat desenvolupant, procés que es coneix amb el nom d'evolució clonal. Les alteracions presents en una neoplàsia poden ser doncs moltes i variades, entenent-se que els reordenaments cromosòmics balancejats no constitueixen les úniques anomalies de la patologia (Nowell, 1976, Heim i col., 1988, Nowell, 2002, Croce, 2008).

En referència als canvis cromosòmics, es coneix com a canvi primari al responsable de la transformació maligna (en aquesta categoria trobem les translocacions balancejades recurrents) mentre que els canvis cromosòmics secundaris són els que confereixen agressivitat a la malaltia (Mitelman, 2007). D'altra banda, la presència de molts canvis de tipus secundari (*major karyotypic abnormalities*, MAKA) confereix pitjor pronòstic que la presència de pocs (*minor karyotypic abnormalities*, MIKA). Les síndromes mielodisplàsiques (SMD) són les hematopaties on aquest fenomen ha estat més estudiat (Greenberg i col., 1997, Haase, 2008).

Abans de realitzar qualsevol anàlisi cromosòmic cal tenir en compte el tipus de material necessari ja que aquest s'ha de correspondre amb les cèl·lules implicades en la patologia. En el cas de la majoria de leucèmies i SMD per exemple, s'estudiarà la medul·la òssia i en aquells pacients en els que sigui necessari descartar si una alteració observada a la medul·la òssia és o no constitucional es procedirà a sembrar també un cultiu de sang perifèrica estimulat amb fitohemaglutinina (PHA) per tal d'estudiar-ne els limfòcits T, que no pertanyen a la clona afectada. Pel que fa als limfomes s'analitzaran mostres de gangli limfàtic o bé de sang perifèrica. Degut al baix grau de proliferació cel·lular és necessari estimular els cultius amb un mitògen. Depenent de la naturalesa B o T de la patologia aquest serà l'acetat de miristat de tetraforbol (TPA) o la fitohemaglutinina respectivament. Un cop obtingut el cariotip, els cromosomes i les seves alteracions s'identifiquen d'acord amb les recomanacions de l'*International System for Human Cytogenetic Nomenclature* (ISCN) (Shaffer i col., 2013).

Degut a la relativa facilitat per a obtenir metafases de les cèl·lules cultivades, existeix gran quantitat d'informació referent no només a les alteracions associades als diferents tipus de neoplàsies hematològiques sinó també al seu valor pronòstic. La llista completa de les alteracions cromosòmiques i els gens implicats en aquestes pot ser consultada al web <http://www.ncbi.nlm.gov/CCAP>. A les hemopaties malignes, la citogenètica constitueix un marcador de clonalitat i forma part del diagnòstic clínic integrat, aportant també informació de la malaltia a nivell de pronòstic. Per tots aquests motius, els estudis citogenètics han esdevingut una eina de gran valor en oncohematologia. Cal esmentar, que la interpretació dels cariotips s'ha de realitzar sempre tenint en compte la història clínica del pacient així com els resultats de laboratori (morfologia i immunofenotip). És necessària una estreta col·laboració entre clínics, patòlegs, citòlegs i citogenetistes per tal d'interpretar el valor que una determinada alteració cromosòmica confereix a un pacient en concret.

En el cas de les SLP-B tenint en compte llur heterogeneïtat biològica i clínica així com el relativament fàcil accés a les mostres biològiques, no sorprèn la gran quantitat d'alteracions cromosòmiques descrites. L'any 1976 es va identificar la primera translocació cromosòmica associada a un limfoma maligne, la t(8;14)(q24;q32) en un limfoma de Burkitt (Zech i col., 1976) i des d'aleshores no ha fet més que augmentar el nombre d'alteracions descrites i caracteritzades a nivell molecular (Heim i Mitelman, 2009).

### 2.1.1 ALTERACIONS CROMOSÒMIQUES ESTRUCTURALS

La classificació actual de la OMS posa de manifest la importància dels estudis citogenètics en el coneixement biològic de les SLP-B. Tenint en compte les diferents fases del desenvolupament dels limfòcits B podem dir que aquestes es caracteritzen freqüentment per presentar translocacions cromosòmiques (Heim i Mitelman, 2009).

La inestabilitat genòmica que confereix el procés de formació de receptors antigènics específics mitjançant els reordenaments V(D)J, hipermutació somàtica i canvi d'isotip dels gens de les Ig contribueix a que la gran majoria de les translocacions de les SLP-B impliquin els *loci* de les Ig. La freqüència en la implicació d'aquests *loci* és un reflex de la importància dels reordenaments que pateixen aquests gens al llarg del desenvolupament dels limfòcits B (Küppers, 2005). Podriem dir que es tracta de patologies on les translocacions dels gens de les Ig amb diferents parelles constitueixen l'esdeveniment primari en l'oncogènesi conferint la resta d'alteracions un paper més destacat en la transformació maligna i la progressió (Heim i Mitelman, 2009).

### 2.1.1.1 TRANSLOCACIONS CROMOSÒMIQUES

#### **Translocacions dels gens de les immunoglobulines**

Els *loci* de les Ig, que inclou el *locus* de la cadena pesada *IGH* (14q32) i els *loci* de les cadenes lleugeres kappa (*IGK* a 2p12) i lambda (*IGL* a 22q11) es troben implicats de forma recurrent en les translocacions de les SLP-B i el resultat dels reordenaments acostuma a provocar una disregulació d'oncogens, per trobar-se aquests sota el control de llurs promotors. La seva freqüència és variable, ja que en alguns casos es tracta de translocacions patognomòniques per la malaltia (per exemple la translocació *CCND1/IGH* al limfoma de cèl·lules del mantell (LCM) i la translocació *BCL2/IGH* al limfoma fol·licular (LF) i per tant detectables en un 95% dels casos aproximadament mentre que en d'altres només es detecten en un determinat nombre de pacients i poden tenir nombroses parelles diferents (Heim i Mitelman, 2009). La taula 2 representa les principals translocacions cromosòmiques característiques de les diferents SLP-B.

TRANSLOCACIÓ	SLP-B	GENS IMPLICATS
t(1;14)(p22;q32) <sup>a</sup>	Limfoma MALT	<i>BCL10/IGH</i>
t(2;7)(p12;q21) <sup>b</sup>	LZME	<i>IGK/CDK6</i>
t(2;14)(p13;q32)	LLC, immunocitoma	<i>BCL11A/IGH</i>
t(3;14)(p14;q32)	MALT, LDCG	<i>FOXP1/IGH</i>
t(3;14)(q27;q32) <sup>a</sup>	LDCG	<i>BCL6/IGH</i>
t(6;14)(p21;q32) <sup>a</sup>	LDCG, altres SLP-B	<i>CCND3/IGH</i>
t(8;14)(q24;q32) <sup>a</sup>	LB, LDCG, LPL, MM	<i>MYC/IGH</i>
t(9;14)(p13;q32)	LLP, altres SLP-B	<i>PAX-5/IGH</i>
t(11;14)(q13;q32) <sup>a</sup>	LCM, LLC, LELV, LDCG	<i>CCND1/IGH</i>
t(12;14)(q13;q32) <sup>a</sup>	LCM	<i>CCND2/IGH</i>
t(14;18)(q32;q21) <sup>a</sup>	LF, LDCG	<i>IGH/BCL2</i>
t(14;18)(q32;q21)	Limfoma MALT	<i>IGH/MALT1</i>
t(14;19)(q32;q13) <sup>a</sup>	LLC, LZM, LDCG	<i>IGH/BCL3</i>

**Taula 2.** Principals translocacions cromosòmiques de les SLP-B que afecten els *loci* de les Ig. <sup>a</sup>Descrites les variants on aquests gens es reordenen amb les Ig de cadena lleugera IGK o IGL. <sup>b</sup>Descrita la variant *CDK6/IGH*. Per als noms de les SLP-B: veure glossari d'abreviatures.

### Translocacions que no impliquen els gens de les immunoglobulines

Existeixen excepcions al fet que les translocacions cromosòmiques de les SLP-B impliquen el *loci* de les Ig. L'exemple més clar és la translocació t(11;18)(q21;q21) *API2/MALT1* que es dona predominantment en limfomes MALT i és fins hi tot més freqüent que la t(14;18)(q32;q21) *IGH/MALT1* (Heim i Mitelman, 2009).

Cal destacar però, que els reordenaments més comuns de les SLP-B que no afecten els *loci* de les Ig són els que es produeixen al gen *BCL6* (3q27). Han estat descrites translocacions de *BCL6* amb diferents gens i la característica comú és una disregulació de *BCL6* per la substitució de llur promotor (Heim i Mitelman, 2009).

### 2.1.1.2 ALTRES ALTERACIONS ESTRUCTURALS

A part de translocacions cromosòmiques podem trobar altres alteracions estructurals a les SLP-B, com ara la deleció de 6q (de les que més es repeteix i per tant bastant inespecífica), la deleció de 7q als limfomes de la zona marginal esplènica (LZME) i les delecions 11q i 13q a la leucèmia limfàtica crònica (LLC) (Heim i Mitelman, 2009).

Les alteracions que afecten la regió 17p13 on es troba el gen supressor de tumors *TP53* també són bastant freqüents en la majoria de les SLP-B i en la majoria dels casos es donen en forma de delecions o isocromosomes, generant en qualsevol cas una pèrdua d'heterozigositat d'aquest gen (Heim i Mitelman, 2009).

La taula 3 mostra un resum de les alteracions cromosòmiques no translocacions més freqüents i importants a nivell de diagnòstic de les SLP-B.

SLP-B	ALTERACIÓ CITOGENÈTICA
LLC	del(6q), del(11q), del(13q), del(17p)
LCM	del(1p), der(3q), del(6q), del(9p), del(11q), del(13q), del(17p)
LF	del(1p), dup(1q), der(3q27), del(6q), del(10q), del(17p)
LDCG	der(3q27), del(6q), del(9p)
LB	dup(1q), del(13q)
MM	dup(1q), del(6q), del(11q), del(13q), del(17p)

**Taula 3.** Alteracions cromosòmiques més freqüents i rellevants a nivell diagnòstic a les SLP-B. Per als noms de les SLP-B: veure glossari d'abreviatures.

### 2.1.2 ALTERACIONS CROMOSÒMIQUES NUMÈRIQUES

Les alteracions numèriques més comunment detectades a les SLP-B són les trisomies, tant totals (guany d'un cromosoma sencer) com parcials (guany de només un fragment cromosòmic). Tot i que es tracta d'alteracions molt ubiqües i poc específiques n'hi ha algunes que es troben més freqüentment en una determinada patologia que altres. La trisomia 12 per exemple, és una alteració citogenètica molt comú a la LLC així com la trisomia total o parcial del cromosoma 3/3q és troba tot sovint en els limfomes de la zona marginal (LZM). La taula 4 representa un resum de les principals trisomies descrites en les SLP-B (Heim i Mitelman, 2009).

SLP-B	ALTERACIÓ CITOGENÈTICA
LLC	+12, +18q
LCM	+3q, +12
Limfoma MALT, LZME	+3/3q, +18/18q
LF	+7, +12/12q, +18/18q
LDCG	+1q, +2p, +3/3q, +7, +9/9p, +11q, +12/12q, +18/18q, +19q
LB	+1q, +7, +12

**Taula 4.** Alteracions cromosòmiques numèriques més freqüents i rellevants per al diagnòstic a les SLP-B. Per als noms de les SLP-B: veure glossari d'abreviatures.

## 2.2 TÈCNiques DE CITOGÈNÈTICA MOLECULAR

Els avenços recents en el camp de la genètica molecular han aportat nous punts de vista sobre els mecanismes patogènics de les neoplàsies hematològiques. Aquestes noves tecnologies, aporten informació a l'estudi dels cariotips i són un complement enriquidor per als citogenetistes (Kearney i Horsley, 2005, Kolialexi i col., 2005). Poc a poc han estat o són introduïdes a la rutina diagnòstica i juntament amb la citogenètica convencional contribueixen al coneixement a nivell molecular de la patogènesi de la malaltia. A més a més, la caracterització i mapeig dels gens localitzats en els punts de trencament de les alteracions cromosòmiques permet identificar-ne i caracteritzar-ne els protooncogens resultants, la qual cosa comporta amb el temps millores en l'elecció terapèutica.

En el cas de les SLP-B, la incidència d'anomalies citogenètiques és molt dependent de les tècniques utilitzades per a la seva detecció (Roulston, 1997). L'ús de mitògens específics (TPA, TNF, IL2, entre d'altres) permet analitzar millor els cariotips anòmals, tot i que l'estudi per citogenètica convencional de les SLP-B presenta més dificultat que en el cas de les leucèmies ja que els cariotips són més complexes, existeixen diversos tipus histopatològics i l'accés al teixit implicat és més limitat (Calasanz, 2001). Per aquest motiu es tracta de patologies on les diferents tècniques de citogenètica molecular són àmpliament emprades.

### 2.2.1 HIBRIDACIÓ *IN SITU* FLUORESCENT (FISH)

Pardue i Gall, van descriure l'any 1969 una tècnica per al reconeixement de seqüències específiques d'ADN presents en una mostra citològica. Mitjançant fragments d'ADN marcats radioactivament i complementaris a la seqüència a estudiar éren capaços de detectar les regions genòmiques d'interès presents a la mostra. A partir d'aquest moment, la metodologia es va anar perfeccionant amb l'ús de marcatge fluorescent enlloc de radioactiu i la hibridació sobre preparacions cromosòmiques humanes (Jones, 1970, Gherard i col., 1981, Harper i col., 1981).

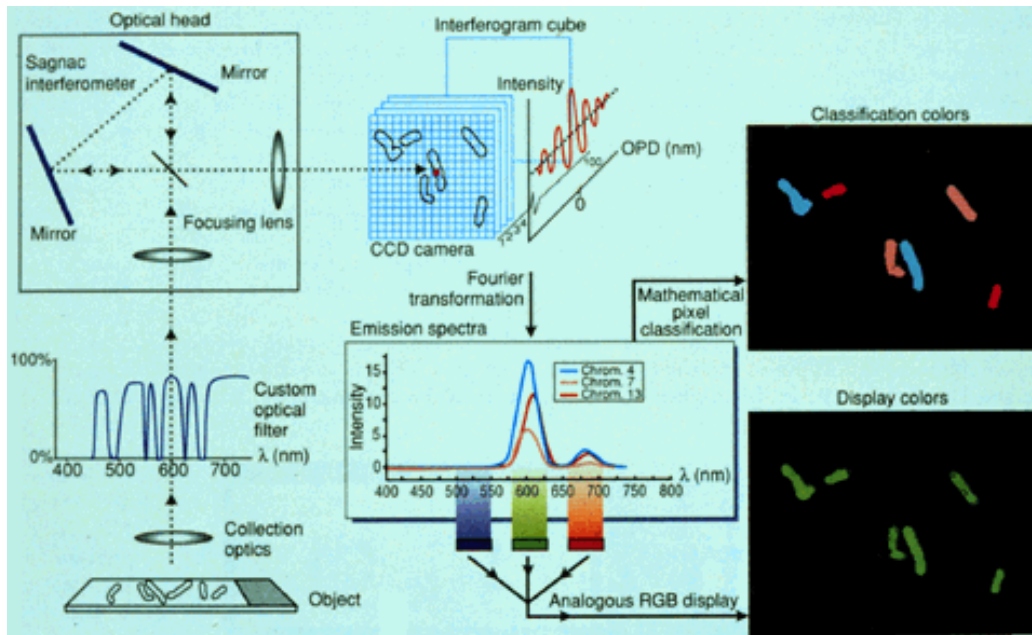


La hibridació *in situ* fluorescent (FISH, de l'anglès fluorescence *in situ* hybridization) tal i com la coneixem avui dia ens permet detectar i localitzar seqüències específiques (tant d'ARN com d'ADN) sobre preparacions cromosòmiques, cel·lulars o talls de teixit parafinat.

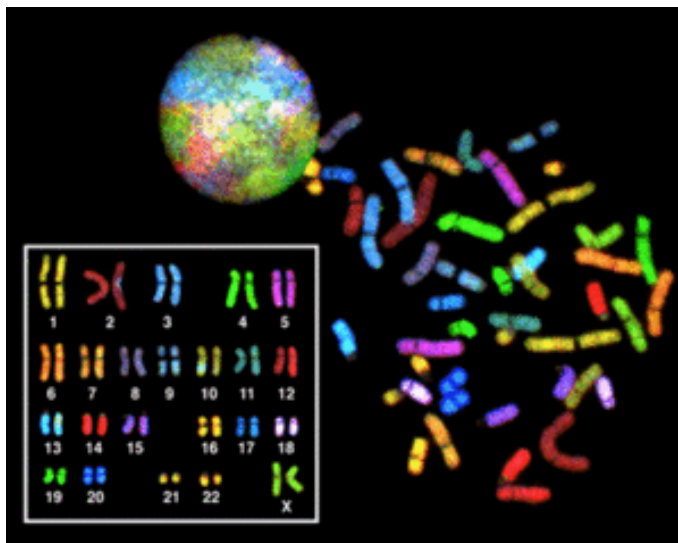
En oncohematologia, la tècnica de FISH constitueix un complement important en l'anàlisi de les alteracions cromosòmiques, sobretot en aquells casos en que aquestes són críptiques per citogenètica convencional (Wolff i col., 2007). Cal esmentar també, que els resultats obtinguts per FISH donen informació diagnòstica independent en casos en els que no hi ha divisió cel·lular *in vitro*, a part de ser útils en el monitoratge per a determinar l'estatus de remissió d'una patologia en tractament (Wolff i col., 2007).

### 2.2.2 CARIOTIPAT ESPECTRAL (*Spectral Karyotyping, SKY*)

La tècnica del cariotipat espectral o SKY (de l'anglès *spectral karyotyping*) és el resultat de l'aplicació a l'anàlisi dels cariotips de la tècnica d'obtenció d'imatges espectrals. El SKY combina l'espectroscopia de Fourier (Bell, 1972) amb la microscopia òptica per tal de poder mesurar simultàniament tots els punts d'un espectre fluorescent i d'aquesta manera utilitzant un programa informàtic específic identificar cada parell cromosòmic per un color diferent (Schröck i col., 1996). La figura 9 representa un esquema del procés d'obtenció d'imatges espectrals. En aquest exemple han estat hibridades simultàniament tres sondes de pintat cromosòmic. La llum emesa és visualitzada a través d'un filtre i enviada a un interferòmetre, el qual crea una imatge gràcies a una càmera *charge-coupled device* (CCD). L'interferòmetre analitza cadascun dels píxels de l'espectre i mitjançant la transformació de Fourier es defineix un espectre d'emissió. Els espectres poden ser classificats per colors, de manera que els cromosomes que presentin el mateix espectre presentaran una imatge espectral idèntica, la qual cosa permet realitzar un cariotipat per colors (Figura 10) (Schröck i col., 1996). L'equip per al SKY consta d'un microscopi d'epifluorescència adaptat a un SD 200 SpectraCube<sup>TM</sup> (conté l'interferòmetre) connectat a una càmera CCD i aquesta a un ordinador (Rothmann i col., 1998).



**Figura 9.** Processat dels espectres fluorescents per a l'obtenció d'imatges espectrals (Schröck i col., 1996).



**Figura 10.** Cariotip en colors de cromosomes humans.

L'SKY és una eina molt útil tant en el diagnòstic com en la investigació, ja que permet definir translocacions identificant el material cromosòmic que les constitueixen a més a més d'identificar el cromosoma de procedència dels cromosomes marcadors (molt freqüents en els processos tumorals) (Schröck i col., 2000).

Com a qualsevol tècnica però, presenta certes limitacions. D'una banda, són indetectables els reordenaments de menys d'una megabase (Mb) així com les delecions amb material afegit. D'altra banda, els reordenaments que impliquen regions pericèntriques poden donar resultats confusos ja que presenten a sovint barreja de colors i en cas d'anàlisi de cromosomes supernumeraris, pot semblar que hi ha translocació enlloc d'un sol cromosoma (degut a les amplificacions). Si els cromosomes no es troben prou separats, no es poden tenir en compte els valors d'aquells que es troben en contacte ni els de cromosomes superposats, ja que en aquests casos hi ha barreja de fluorocroms (Lee i col., 2001). Tenint-los en compte però, es tracta de problemes solventables i la informació que aporta aquesta tècnica és de molta utilitat. Si bé també és cert que el SKY és una tècnica relativament cara i per això en la majoria dels casos s'utilitza en investigació, el seu ús en casos amb cariotip complex i/o difícil d'interpretar és molt resolutiu de manera que és una eina cada cop més utilitzada en l'estudi de les neoplàsies hematològiques (Martínez-Ramírez i col., 2004; Tchinda i col., 2004; Adam i col., 2006).

### **3. EL LIMFOMA DE LA ZONA MARGINAL ESPLÈNICA**

L'any 1979, Neiman i col·laboradors van descriure un grup de pacients afectes d'un limfoma esplènic associat a la presència en sang perifèrica de cèl·lules amb una morfologia similar, però no idèntica, a la dels tricoleucòcits de la tricoleucèmia (o leucèmia de cèl·lules peludes, LCP)(Neiman i col., 1979). Histològicament es tractava d'un limfoma amb infiltrat nodular centrat a la polpa blanca de la melsa. Posteriorment, van ser publicats casos semblants caracteritzats per un immunocitoma esplènic primari amb cèl·lules velloses circulants (Spriano i col., 1986). Aquesta entitat que fins aleshores havia rebut infinitat de noms, era considerada una neoplàsia de cèl·lula B madura amb trets similars a la LCP, la leucèmia prolimfocítica (LPL) i la LLC, però de la que no existien característiques específiques. Finalment, el grup de Catovsky i col·laboradors va dur a terme un estudi sobre una sèrie de 22 pacients per tal d'establir les característiques clíniques, citològiques, immunocitoquímiques i genètiques d'aquesta neoplàsia a la que anomenaren limfoma esplènic amb limfòcits vellosos circulants (LELV) (Melo i col., 1987).

L'any 1992, Schmid i col·laboradors van publicar un treball de quatre casos que presentaven un limfoma de cèl·lules B de baix grau amb un patró micronodular característic d'infiltració de la melsa, ocupant la zona marginal. Sense fer referència a la vessant hematològica, les característiques immunohistoquímiques i genètiques eren idèntiques a les dels LELV. De la mateixa manera, les cèl·lules neoplàsiques éren similars a les de la zona marginal dels fol·licles limfoides de la melsa i per això va pendre el nom de limfoma de la zona marginal esplènica (LZME). Quan es van estudiar la histologia i la immunohistoquímica de la medul·la òssia dels casos que havien estat classificats com a LELV es va concloure que eren idèntiques a les dels LZME (amb la mateixa base patològica) i per tant que es tractava de la mateixa entitat (Isaacson i col., 1994, Catovsky i col., 1999). Cal esmentar, que es va fer evident que no tots els LZME presentaven cèl·lules neoplàsiques circulants a la sang perifèrica i que quan apareixien podien ser o no peludes (Isaacson i col., 1994). Originàriament el diagnòstic de LZME es feia en base a l'examen de la melsa dels pacients (Schmid i col., 1992) però posteriorment, es va associar a un patró d'infiltració intrasinusoidal característic al moll de l'òs de manera que per al diagnòstic no era necessària l'esplenectomia (Franco i col., 1996, Labouyrie i col., 1997). Actualment, els LZME son diagnosticats per la integració de dades clíniques, histològiques, citològiques, immunofenotípiques, citogenètiques i de biologia molecular (Matutes i col., 2008).

El LZME amb o sense limfòcits vellosos circulants va ser inclòs com a entitat provisional a la classificació REAL (Harris i col., 1994) per a ser refermat com a entitat definitiva a la classificació de la OMS (Harris i col., 1999, Swerdlow i col., 2008).

Actualment el LZME és una entitat reconeguda per la OMS que presenta característiques clíniques, morfològiques i immunofenotípiques ben establertes (Mollejo i col., 1995, Franco i col., 2003, Oscier i col., 2005, Matutes i col., 2008, Swerdlow i col., 2008). Es tracta d'una neoplàsia de cèl·lules B madures en la que limfòcits de petit tamany infiltren els fol·licles limfoides de la polpa blanca de la melsa, esborren la zona del mantell dels centres germinals i es barrejen a la zona marginal amb cèl·lules grans que infiltren la polpa vermella (Swerdlow i col., 2008, Thieblemont, 2008).

El LZME és doncs una neoplàsia hematològica deguda a la proliferació descontrolada i cúmul de cèl·lules de la zona marginal dels fol·licles limfoides esplènics. A part dels LZME, la OMS reconeix dues entitats més derivades de cèl·lules de la zona marginal. Es tracta dels limfomes de la zona marginal nodals i els limfomes de la zona marginal extranodal de teixit limfoide associat a mucosa (limfomes MALT, de l'anglès *mucoase associated lymphoid tissue*) que tot i pertànyer juntament amb els LZME al grup de limfomes de la zona marginal (LZM) presenten característiques clínicopatològiques i moleculars diferenciades (Swerdlow i col., 2008).

En contrast amb altres limfomes de cèl·lula B, no existeix una lesió gènica característica associada als LZME tot i que les alteracions cromosòmiques complexes són freqüents, detectant-se en un 80% dels casos (Oscier i col., 1993, Dierlamm i col., 1996, Solé i col., 2001, Hernández i col., 2001, Andersen, 2005, Salido i col., 2010).

Aquesta heterogènia citogenètica i molecular dificulta l'establiment de conclusions referents a l'origen i diferenciació de les cèl·lules neoplàsiques. A més a més, cal esmentar que els LZME agrupen casos amb/sense diferenciació plasmàtica, amb/sense mutacions somàtiques de les Ig i/o *BCL6*, que presenten o no pèrdua al·lèlica a la regió 7q22-32 i casos on hi ha hagut infecció per hepatitis C (Papadaki i col., 2007).

L'anàlisi del repertori de les Ig així com de llur estat mutacional, aporta informació clarificant sobre aquesta heterogènia. Els estudis realitzats fins ara estan d'acord en subdividir els casos en mutats/no mutats. Pel que fa als pacients sense mutació de les Ig, la majoria presenten també deleció de la regió 7q22-32 i evolucionen desfavorablement (Algara i col., 2002). En referència a la selecció d'anticossos, les regions V més utilitzades són aquelles que codifiquen per a autoanticossos, fet que d'altra banda és habitual en les cèl·lules de la zona marginal. Curiosament, s'ha observat que els casos amb mutació somàtica de les Ig, no presenten patrons identificatius amb respostes del centre germinal a les cèl·lules T antígen dependents (Stamatopoulos i col., 2004).

Altres estudis moleculars dels LZME, posen de manifest una selecció molt precisa de les regions VH1, suggerint un paper antigènic en la promoció del creixement de les cèl·lules tumorals. S'ha descrit als LZME una associació amb el virus de la hepatitis C (VHC), de manera que una infecció persistent estimularia el creixement maligne (Saadoun i col., 2005).

### 3.1 CARACTERÍSTIQUES CLÍNiques

El LZME representa aproximadament un 1% de tots els LNH (Swerdlow i col., 2008) tot i que hi ha grups que el consideren de fins a un 2.7% (Berger i col., 2000). Es tracta d'un tipus de SLP-B que es dona en persones d'edat avançada amb una ratio home dona de 1:1 tot i que hi ha grups que és de 1:1.8 (Iannitto i col., 2004). La majoria dels pacients presenten esplenomegàlia, de moderada a massiva, i per això constitueix un 8-14% de les SLP-B a les que se'ls realitza esplenectomia (Coad i col., 1993, Arber i col., 1997).

La infiltració en sang perifèrica en forma de limfocitosi és freqüent així com les citopènies relacionades amb l'hiperesplenisme (Thieblemont, 2008). De fet, la infiltració en sang es troba subestimada, especialment en casos amb poca limfocitosi, de manera que és recomanable un estudi exhaustiu de les extensions (Matutes i col., 2008). L'afectació de la medul·la òssia es presenta en diferents graus (25%-75% dels casos), trobant-se infiltració abundant en aquells pacients que cursen amb esplenomegàlia (Matutes i col., 2008). Alguns pacients poden presentar infiltració hepàtica (en el 90% dels casos amb afectació dels nòduls portals) sobretot els casos que han estat infectats per VHC (Franco i col., 2003, Thieblemont, 2008), mentre que l'afectació dels ganglis limfàtics (adenopaties perifèriques) és molt poc freqüent (Swerdlow i col., 2008). Degut a la infiltració medul·lar la majoria de pacients són diagnosticats en un estadi clínic Ann Arbor IV.

Símptomes no específics com anèmia i/o trombocitopènia tenen lloc en percentatges que oscil·len entre el 49-64% i el 15-30% respectivament (Franco i col., 2003, Iannitto i col., 2004). Precisament, en alguns casos les primeres manifestacions del limfoma són anèmia hemolítica o una trombocitopènia immune (Thieblemont, 2008).

Els anomenats símptomes B (febre i sudoració nocturna) són rarament descrits en pacients afectats de LZME i les alteracions en els nivells d'albumina sèrica, lactat deshidrogenasa del sèrum (LDH) i  $\beta$ 2-microglobulina són observades en percentatges variables (Franco i col., 2003, Thieblemont, 2008). Un elevat nombre de pacients presenten paraproteïna monoclonal del sèrum d'isotip IgM (Thieblemont, 2008). Els fenòmens autoimmunes es troben associats en la majoria dels casos al tractament (Bowen i col., 1999).

### **Diagnòstic**

El diagnòstic dels LZME es basa en la combinació dels resultats obtinguts en els estudis morfològics, histològics, immunofenotípics, citogenètics i de biologia molecular.

Els criteris mínims per al diagnòstic són dos:

- Histologia esplènica, immunofenotip característic i graduació de 2 o menys de l'score Matutes de LLC (Matutes i col., 1994).
- Morfologia en sang perifèrica i medul·la òssia característica (infiltració intrasinusoidal de cèl·lules CD20+) així com immunofenotip propi.

De tota manera, cal esmentar que l'absència de marcadors citogenètics i moleculars així com el fet que només una proporció dels casos disposi d'histologia esplènica dificulta el diagnòstic en alguns pacients (Matutes i col., 2008).

### **Tractament i pronòstic**

Els LZME són neoplàsies de curs clínic indolent amb bona resposta als tractaments per esplenectomia i/o quimioteràpia, tot i que l'opció escollida acostuma a ser el *watch and wait*, ja que no s'observen gaires diferències entre els pacients no tractats i els que han rebut tractament des del principi (Mulligan i col., 1991, Troussard i col., 1996, Berger i col., 2000, Chacón i col., 2002). A més a més, no existeixen estudis clínics prospectius per tal d'establir un criteri terapèutic, de manera que s'adopten les estratègies que funcionen en altres SLP-B de baix grau, com ara la LLC (Matutes i col., 2008).

Tot i que en general presenten un curs indolent, existeix un petit percentatge de casos (10%) en els quals la malaltia es manifesta de forma agressiva, amb transformació o no a limfoma difús de cèl·lula gran (LDCG), arribant a produir la mort per limfoma (Matutes i col., 2008). Amb el temps, s'espera poder determinar quins són els factors de risc per tal d'identificar els pacients que evolucionaran desfavorablement i tenir-ho en consideració en el seu tractament. La intervenció terapèutica en els casos simptomàtics no segueix cap consens i depèn molt de l'hematòleg responsable i com en altres limfomes indolents l'objectiu no és aconseguir una remissió completa (RC) estricta sinó el manteniment d'una bona situació hematològica i clínica.

Històricament l'esplenectomia ha representat la primera línia de tractament en aquells pacients que la necessiten. Es realitza en casos amb esplenomegàlia severa i/o citopènies amb repercussió clínica, tant com a tractament com per a millorar la qualitat de vida del pacient. De totes maneres hi ha grups que la recomanen sempre que sigui possible (Mulligan i col., 1991, Mollejo i col., 1995, Chacón i col., 2002) ja que a banda de llurs propietats terapèutiques constitueix la manera més precisa de diagnosticar els LZME, evitant-ne la confusió amb el LCM i el LF, tots dos amb un curs clínic molt diferent. La majoria dels pacients responen a l'esplenectomia i més de la meitat no requereixen teràpia posterior (Matutes i col., 2008).

La radioteràpia és una bona opció terapèutica en aquells casos en els que la cirurgia està contraindicada (Mollejo i col., 2005).

El paper de la quimioteràpia en els LZME és motiu de controvèrsia ja que en moltes de les sèries estudiades el percentatge de pacients que obté remissió completa és molt baix (Berger i col., 2002). Generalment són tractats els pacients amb progressió clínica post-esplenectomia o aquells en els que la opció quirúrgica no és possible.

En referència al tipus de quimioteràpia, la més utilitzada ha estat sempre la combinació d'agents alquilants CHOP (ciclofosfamida, doxorubicina, vincristina i prednisona) tot i que dues terceres parts dels casos tractats en primera línia no responen (Troussard i col., 1996, Iannitto i col., 2004) i sovint la toxicitat és més elevada que els beneficis terapèutics (Matutes i col., 2008).



Pel que fa als anàlegs de purines, particularment la Fludarabina<sup>®</sup> amb o sense combinació amb anticossos monoclonals (Rituximab<sup>®</sup>) han demostrat una gran eficàcia en quan a la qualitat de la resposta i a la supervivència lliure de malaltia (Matutes i col., 2008). D'altra banda i de la mateixa manera que en altres limfomes de cèl·lula B s'utilitza el Rituximab<sup>®</sup>, sol o en combinació amb la teràpia convencional (R-CHOP), sobretot en casos amb transformació a limfoma d'alt grau (Matutes i col., 2008). L'any 2006 es va dur a terme un estudi comparatiu entre pacients tractats només amb Rituximab<sup>®</sup>, amb R-CHOP o només amb quimioteràpia. Els resultats posen de manifest que aquest anticòs monoclonal anti-CD20 ha de ser una teràpia d'elecció ja que dona lloc a una llarga supervivència lliure de malaltia en comparació amb la quimioteràpia convencional i l'esplenectomia, fa desaparèixer l'esplenomegàlia en un 92% dels pacients i normalitza el recompte total de limfòcits (Tsimberidou i col., 2006, Kalpadakis i col., 2007).

En aquells casos en els que existeix infecció concomitant per VHC es dona tractament amb interferó- $\alpha$  2b (IF $\alpha$ 2b), ribavirina o una combinació de tots dos, aconseguint-se una activitat significant en la desaparició del virus en sang (Hermine i col., 2002, Kelaidi i col., 2004).

Finalment, els casos amb transformació i curs agressiu han de ser tractats de forma similar als limfomes B d'alt grau (Matutes i col., 2008).

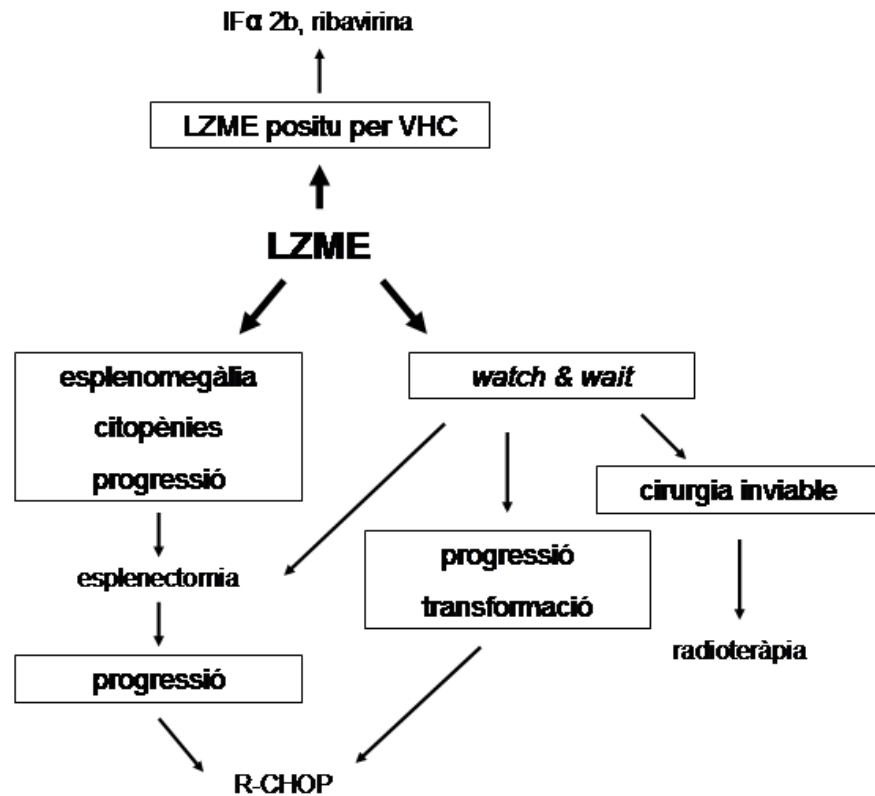
Els LZME són limfomes indolents en els que la supervivència mitjana es troba entre els 8-10 anys. Els primers anàlisis comparatius de supervivència posaven de manifest diferències entre els casos considerats LELV i els LZME probablement degut a que per al diagnòstic de LZME era necessària l'esplenectomia de manera que ja implicava que la malaltia es trobava en una fase més avançada (Mollejo i col., 2005).

Altres estudis demostren que sense tractament la supervivència sobrepasa els 5 anys i que en els casos tractats amb resposta els valors són similars (la taxa de RC és d'un 80%). Això fa pensar que potser el millor és reservar la quimioteràpia per aquells casos que presenten un curs clínic més agressiu (Chacón i col., 2002).

A nivell de factors de mal pronòstic, és a dir aquells que són adversos a l'hora d'aconseguir una RC, l'afectació d'òrgans no hematopoiètics al diagnòstic, un estat general dolent (d'acord amb l'*Eastern Cooperative Oncology Group*, ECOG), l'estatus d'expressió de la proteïna TP53, deleció de 7q, presència de component M,  $\beta$ 2-microglobulina elevada, expressió de gens de la via NF-kB, i limfocitosi són considerats els més significatius (Chacón i col., 2002, Thieblemont i col., 2002, Matutes i col., 2008). D'altra banda, de la mateixa manera que a la LLC l'absència de mutacions a IgVH també es considerada un factor de mal pronòstic (Algara i col., 2002).

Pel que fa a la transformació a limfoma d'alt grau són poques les sèries publicades fins ara. Sembla ser que és infreqüent, amb percentatges similars als d'altres limfomes B indolents (Camacho i col., 2001, Dungarwalla i col., 2008). Alguns autors l'associen a la deleció del gen *TP53* (Cualing i col., 2000, Dierlamm i col., 2000b, Dungarwalla i col., 2008) i també a la presència de deleció de 7q (Camacho i col., 2001, Dungarwalla i col., 2008). Dungarwalla i col·laboradors (2008) estableixen a més a més una relació entre el lloc de transformació i la resposta al tractament. Així els casos en els que la transformació té lloc a la medul·la òssia són més refractaris al tractament que aquells en els que es veuen afectats nòduls limfàtics perifèrics. Un estudi recent en una sèrie àmplia de LZME redueix els factors que més influeixen en la supervivència a l'edat, una hemoglobina inferior a 12g/dL,  $\beta$ 2-microglobulina elevada, cariotip complex, alteracions a 14q i deleció de *TP53* (Salido i col., 2010).

En diagnosticar un LZME és recomanable fer un estadiatge sobre el seu estat classificant-lo en dos grups diferenciats en funció dels resultats obtinguts: malaltia primària asimptomàtica o bé malaltia avançada/simptomàtica i a partir d'aquí pendre les decisions terapèutiques corresponents (figura 11).

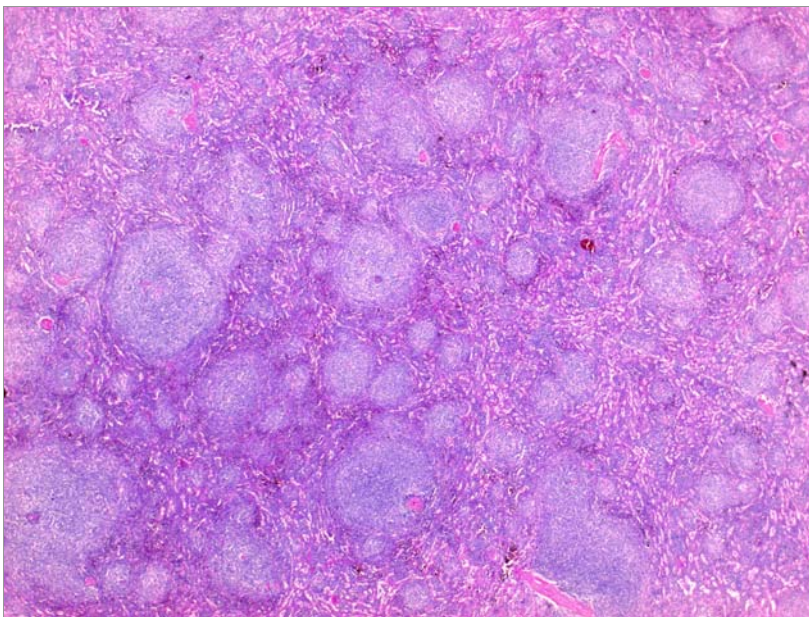


**Figura 11.** Esquema de les diferents opcions terapèutiques en el tractament dels LZME proposat pel *Splenic B-cell Lymphoma Group*.

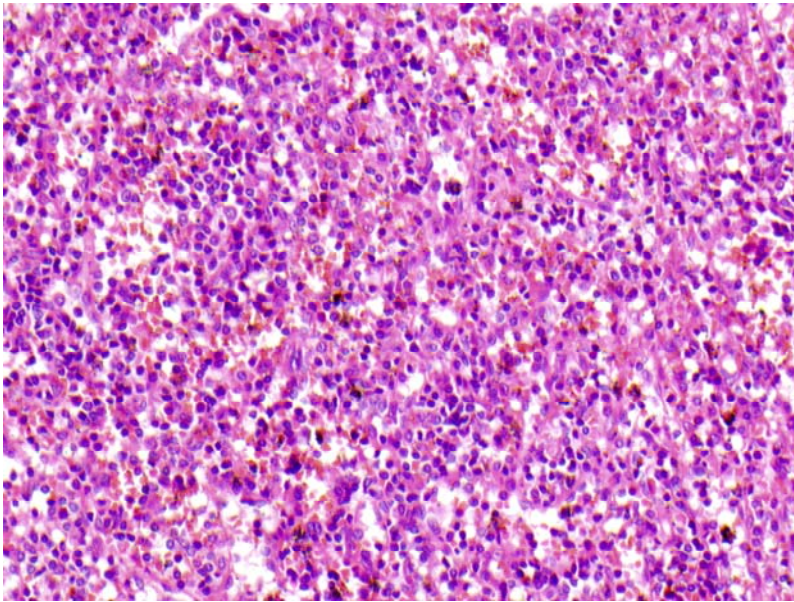
### 3.2 CARACTERÍSTIQUES HISTOLÒGIQUES I CITOLÒGIQUES DE LA MELSA

La descripció d'aquest tipus de limfoma va ser per l'estudi patològic de melses esplenectomitzades. Macroscòpicament una melsa afectada de LZME presenta un patró micronodular, amb proliferació neoplàsica a la polpa blanca (Figura 12). Els nòduls estan formats per un component intern de limfòcits petits situats a la zona de les cèl·lules del mantell, que rodeja i reemplaça el centre germinal, així com per un component extern de cèl·lules de tamany mitjà amb citoplasmes clars i alguna cèl·lula gran de nucleol prominent (Mollejo i col., 1995). En conjunt s'observa diferenciació marginal i reemplaçament fol·licular per les cèl·lules neoplàsiques (Mollejo i col., 2002, Franco i col., 2003).

També pot existir infiltració de la polpa vermella a nivell de cordons i sinus, la qual cosa és molt útil en el diagnòstic diferencial entre una hiperplàsia limfoide esplènica reactiva i un LZME (Mollejo i col., 1995, Sans-Sabrafen i col., 2001). En fases avançades de la patologia, les cèl·lules neoplàsiques esborren totalment l'arquitectura de la melsa (Franco i col., 2003). D'altra banda, cal esmentar l'existència d'una variant difusa en els LZME, caracteritzada per presentar una infiltració difusa de la polpa vermella, sense patró micronodular i en la que no existeix reemplaçament fol·licular (Figura 13) (Mollejo i col., 2002).



**Figura 12.** Microfotografia a baix augment de la melsa amb patró nodular característic d'un pacient diagnosticat de LZME (tinció HE). Fotografia realitzada pel Servei de Patologia de l'Hospital del Mar (Barcelona).



**Figura 13.** Microfotografia amb augment 200X de la melsa d'un pacient diagnosticat de LZME amb patró d'infiltració difús (tinció HE). Fotografia realitzada pel Servei de Patologia de l'Hospital del Mar (Barcelona).

Citològicament, les cèl·lules neoplàsiques dels LZME presenten una morfologia i disposició arquitectural similar a les cèl·lules que es disposen a la zona marginal dels fol·licles primaris de la melsa, les anomenades cèl·lules de la zona marginal.

Es tracta d'elements de tamany intermig, citoplasma moderat, clar o lleugerament eosinòfil en els que el nucli rodonejat és lleugerament més gran que el dels limfòcits petits, amb cromatina fina i sense nucleol que amb freqüència presenten diferenciació plasmacítica (Sans-Sabrafen i col., 2001, Mollejo i col., 2005). Les variacions morfològiques de les cèl·lules tumorals en diferents àrees del tumor estan relacionades probablement amb les condicions microambientals de la melsa, les quals poden modular la composició citològica d'un tumor (Falk, 1992). Els estudis per immunohistoquímica posen de manifest l'expressió en aquestes cèl·lules de CD20, CD21, CD79a (dèbilment), IgD, PAX-5 i BCL2. Per contra, no expressen CD5, CD10, CD23, CD43, CD11c, DBA44 (tot i que de forma variable), BCL6 ni CCND1. La restricció de cadenes lleugeres (kappa o lambda) s'observa en la majoria de casos, tant en la polpa blanca com en la vermella (Mollejo i col., 1995, Franco i col., 2003).

L'índex proliferatiu (Ki67) és baix i MIB1 posa de manifest un patró anular (en "diana") distintiu amb creixement a la zona marginal i a la zona del centre germinal reactiu residual (Mollejo i col., 2005). El marcatge amb BCL2 permet identificar la infiltració de centres germinals de manera que es poden distingir les cèl·lules tumorals BCL2+ entre les BCL2- de l'interior del centre germinal. D'altra banda la restricció de cadenes lleugeres permet diferenciar en molts casos cèl·lules tumorals amb diferenciació plasmacítica que també es troben infiltrant el centre germinal (Mollejo i col., 1995). La majoria de cèl·lules presenten positivitat per a CD27, un marcador de cèl·lules B de memòria activades (Papadaki i col., 2007).

Al voltant del tumor també es poden observar numerosos histiòcits epitelioides així com limfòcits T acompanyants (Mollejo i col., 2005).

El fet que els LZME expressin IgD va ser motiu de controvèrsia ja que Isaacson considerava que en tractar-se les cèl·lules neoplàsiques de cèl·lules de la zona marginal no haurien d'expressar-lo (Isaacson, 1996). La zona marginal però, és una regió constituïda per diferents tipus cel·lulars. De fet, el fenotip citològic majoritari de la majoria dels LZME és bifàsic, amb una zona central constituïda per limfòcits petits i una zona més perifèrica formada per cèl·lules grans de fenotip marginal. Actualment, ha estat demostrat que les cèl·lules normals de la zona marginal (no neoplàsiques) expressen IgD de forma dèbil, corresponent-se el seu fenotip amb el dels limfòcits B de memòria (Papadaki i col., 2007).

Ocasionalment, les cèl·lules neoplàsiques dels LZME expressen marcadors que no són característics d'aquesta entitat. Són situacions en les que cal aplicar una bateria d'anticossos suficient per tal d'evitar confusions diagnòstiques amb altres limfomes de cèl·lula B (Taula 5).

	CD79a CD20	CD10 BCL6	CD23	IgD	CD5 CD43	CD103	CCND1
LZME	+	-	-	+	-	-	-
LF	+	+	-	-	-	-	-
LCM	+	-	-	+	+	-	+
LLC	+	-	+	+	+	-	-
LCP	+	-	-	-	-	+	-

**Taula 5.** Esquema dels diferents marcadors utilitzats per al diagnòstic diferencial del LZME versus altres SLP-B.

A part de l'anticòs IRTA1 que sembla ser específic per a les cèl·lules de la zona marginal (Arcaini i col., 2003), recentment ha estat descrit també que l'absència de TCL1A (*T-cell leukemia/lymphoma 1A*) i la positivitat per a MNDA (*Myeloid cell Nuclear Differentiation Antigen*) està associada als LZME així que la seva aplicació combinada pot esser útil com a eina diagnòstica (Munari i col., 2012).

### 3.3 CARACTERÍSTIQUES DE LA MEDUL·LA ÒSSIA I LA SANG PERIFÈRICA

Per a l'estudi morfològic en sang perifèrica i medul·la òssia és essencial una bona conservació de la mostra, ja que una manipulació inadequada comporta la pèrdua de villis per part de les cèl·lules tumorals (Matutes i col., 2008).

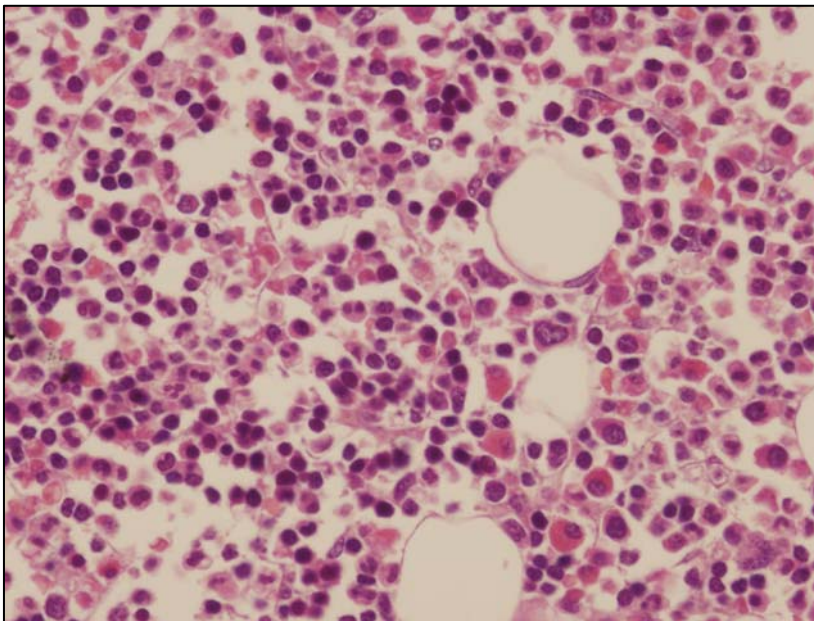
#### 3.3.1 MEDUL·LA ÒSSIA

L'afectació a nivell de medul·la òssia és habitual. Tot i que han estat descrits diferents patrons d'infiltració, el més característic dels LZME és l'intrasinusoidal, el qual no es troba (rars excepcions) en altres limfomes de cèl·lula B de baix grau. També pot donar-se un patró nodular intertrabecular i la combinació de tots dos és força freqüent (Figura 14) (Franco i col., 2003).



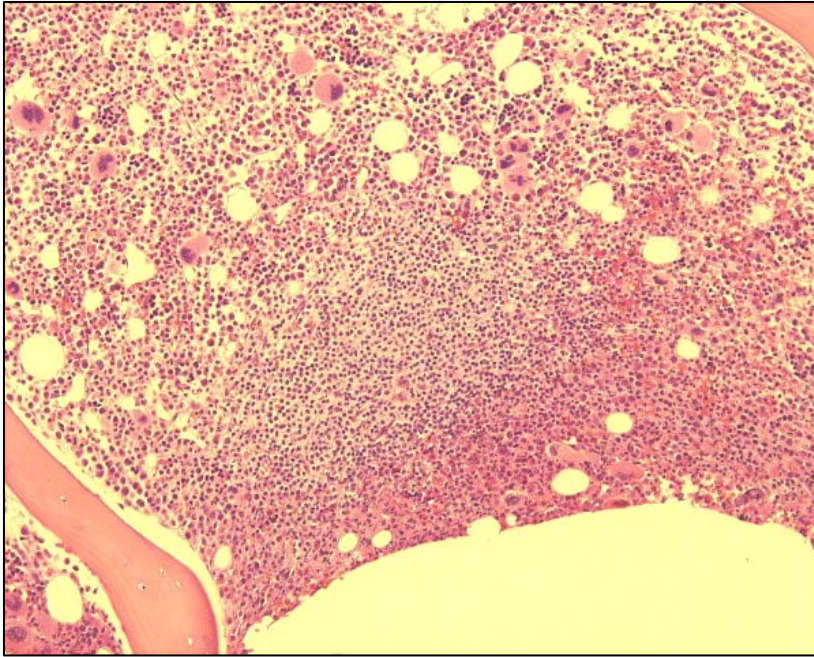
La diferenciació plasmacítica és més freqüent a la medul·la òssia que en sang perifèrica, la qual cosa pot portar a confusions amb el limfoma limfoplasmacític (LLP). Cal esmentar que l'aspirat de moll d'òs no és suficient per al diagnòstic d'aquesta entitat: és necessària sempre la biòpsia òssia (Matutes i col., 2008). Amb la progressió de la malaltia, especialment després de l'esplenectomia, el patró intrasinusoidal esdevé més nodular, existint una combinació de tots dos (Franco i col., 2001).

En les fases inicials de la malaltia, les cèl·lules tumorals representen un 20% de la cel·lularitat total. Les cèl·lules són de tamany petit/mig amb nucli rodó o ovalat de contorn regular i citoplasma escàs. Els estudis immunohistoquímics posen de manifest un fenotip de cèl·lula B madura (CD20+, BCL2+, CD10-, BCL6- i CCND1-) (Matutes i col., 2008).



**Figura 14A.** Microfotografia a gran augment d'una medul·la òssia amb un patró d'infiltració intrasinusoidal característic de LZME (tinció HE). Fotografia realitzada pel Servei de Patologia de l'Hospital Clínic (Barcelona).





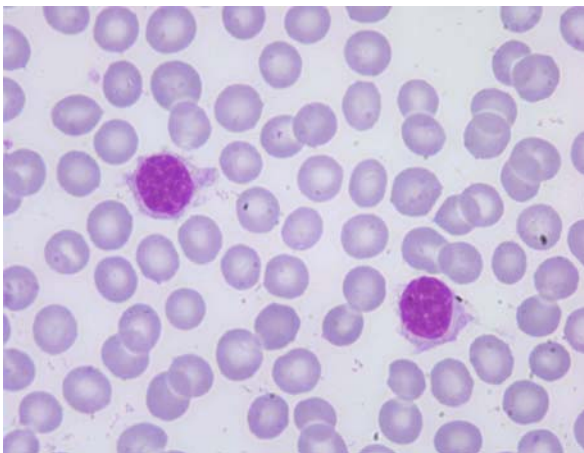
**Figura 14B.** Microfotografia a baix augment d'una medul·la òssia de LZME amb un patró d'infiltració nodular intertrabecular (tinció HE). Fotografia realitzada pel Servei de Patologia de l'Hospital Clínic (Barcelona).

### 3.3.2 SANG PERIFÈRICA

La infiltració en sang perifèrica ha estat descrita en forma de diferents percentatges. El fet que la nomenclatura provisional d'aquesta entitat fós LZME amb o sense limfòcits vellosos és explicativa d'aquesta diversitat. Les dues tercers parts dels pacients presenten leucemització al diagnòstic a expenses de cèl·lules limfomatoses d'aspecte vellós (Dogan i col., 2003, Woessner i col., 2006).

La infiltració en sang perifèrica acostuma a estar associada a anèmia, trombopènia i leucocitosi moderada. La morfologia dels limfòcits neoplàsics és heterogènia tot i que la majoria de cèl·lules circulants presenten un aspecte característic a expenses de prolongacions citoplasmàtiques en forma de vellositat, per la qual cosa reben el nom de limfòcits vellosos o peluts (Sans-Sabrafen i col., 2001, Woessner i col., 2006). Aquests tenen un tamany relativament més gran que els limfòcits normals i són una mica més petits que els de la LCP.

El nucli és rodó o bé ovalat, gairebé sempre amb tendència a l'excentricitat, amb cromatina condensada i nucleol present en la meitat de les cèl·lules. Les projeccions citoplasmàtiques que donen el nom a la cèl·lula es troben distribuïdes de forma irregular concentrant-se en els pols cel·lulars (Figura 15) (Woessner i col., 2006, Matutes i col., 2008). A més a més són abundants els limfòcits B petits i de tamany mitjà, similars a les anomenades cèl·lules B monocitoides. En ocasions s'observen també centròcits, limfoplasmòcits i algun limfòcit petit de cromatina hipercondensada i escàs citoplasma (Woessner i col., 2006, Matutes i col., 2008).



**Figura 15.** Limfòcits velloso característics de la infiltració en sang perifèrica dels LZME (tinció May-Grünwald-Giemsa). Imatge cedida pel Club Català de Citologia Hematològica.

Per citometria de flux les cèl·lules expressen IgD i IgM de superfície o IgM sol, CD19, CD20, CD22, CD24, CD27, CD45, CD79a, FMC7, DBA44 (75%) i CD11c (50%). Per contra, l'expressió de CD10, CD23, CD43, CD103, CD25 i CCND1 és molt infreqüent (Matutes i col., 1994, 2008). Una minoria de casos (<20%) presenten positivitat aberrant de CD5, marcador associat a un curs més agressiu (Matutes i col., 1994). Un treball de l'any 2004 suggeria que probablement les cèl·lules tumorals esdevenen CD5 positives en migrar de la melsa a la medul·la òssia i que l'adquisició d'aquest marcador és responsable de la progressió tumoral (Giannouli i col., 2004).

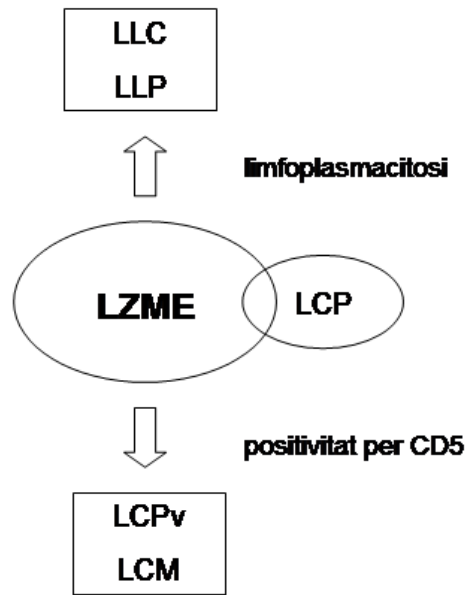
Més recenment ha estat descrit que la positivitat per CD5 confereix una elevada limfocitosi i infiltració medular difusa (Baseggio i col., 2010) així com diferències en el cariotip (Salido i col., 2010).

Les cèl·lules neoplàsiques dels LZME han estat poc estudiades des del punt de vista ultraestructural. Ha estat descrit que tenen un reticle endoplasmàtic rugós moderadament desenvolupat, ribosomes aïllats o agrupats i amb nucli que presenta un nucleol més perifèric que el de les cèl·lules marginals normals (Hammer i col., 1996).

Cal esmentar, que tot i ser característics, els limfòcits vellosos no ajuden en el diagnòstic dels LZME, ja que poden ser observats en altres patologies com ara la LCP i la LCPv.

### **3.4 DIAGNÒSTIC DIFERENCIAL**

El diagnòstic de LZME s'hauria de poder establir un cop fets els estudis clínics, histològics, citològics i immunofenotípics. No obstant, els LZME comparteixen característiques amb altres SLP-B la qual cosa en dificulta el diagnòstic diferencial (Figura 16). La melsa, per exemple, es troba freqüentment implicada en les neoplàsies de cèl·lula B tot i que a diferència dels LZME no disposen de criteris histològics i immunofenotípics ben establerts. A més a més, cal tenir en compte que tant els LZME com la resta de limfomes amb els que es pot confondre poden presentar fenotips aberrants, perdent els trets que generalment permeten diferenciar-los, de manera que el diagnòstic diferencial es complica realitzant-se a sovint el diagnòstic per exclusió. En aquests casos és indispensable la integració de totes les dades disponibles, i les tècniques de citogenètica i biologia molecular esdevenen crucials per a la correcte identificació de la neoplàsia (Matutes i col., 2008).



**Figura 16.** Esquema de la superposició dels LZME amb altres SLP-B.

### **LZME versus limfoma esplènic de cèl·lula B petita difús de polpa vermella**

En contrast amb el LZME clàssic, presenta infiltració homogènia de la polpa vermella, sense nòduls tumorals. A més a més no es detecta reemplaçament fol·licular per la zona marginal ni citologia bifàsica. Una proporció variable de casos expressa IgG però no IgD (Matutes i col., 2008).

### **LZME versus LCP**

Per al diagnòstic diferencial entre aquestes dues entitats cal tenir en compte tots els paràmetres disponibles. A nivell histològic les dues entitats presenten trets ben diferenciats: la LCP dóna lloc a una infiltració medul·lar de tipus irregular, amb reemplaçament de les sèries hematopoiètiques i densitat cel·lular baixa, mentre que els LZME presenten un patró d'infiltració intrasinusoidal. Pel que fa a la melsa, la LCP infiltra la polpa vermella de forma difusa quedant la polpa blanca atròfica (Franco i col., 2003).

La confusió entre aquestes dues neoplàsies és degut a que ambdues presenten cèl·lules velloses circulants en sang perifèrica. En absència de biòpsia òssia, la citometria de flux permet diferenciar entre una i l'altre.

Un dels marcadors més utilitzats és el CD27, marcador de cèl·lules B de memòria característic dels limfòcits de la zona marginal, que tot i ser positiu en els LZME i altres SLP-B presenta negativitat en les LCP (Taula 6). El problema no resolt encara, del que són necessaris més estudis, és la diferenciació entre el LZME i la LCPv. Aquesta última és una entitat superposada a la LCP però que presenta característiques citològiques i immunofenotípiques diferenciades (Matutes i col., 2008).

	LZME	LCP	LCPv
CD11c	+/-	+	+
CD23	+/-	-	-
CD25	-	+++	-
CD27	+	-	SD
CD103	-	++	+
CD123	-	+	-

**Taula 6.** Diagnòstic diferencial en sang perifèrica entre el LZME i la LCP.

SD: sense dades.

D'altra banda, el grup de Traverse-Glehen i col·laboradors (2008) proposa que sigui considerada una nova entitat anomenada limfoma esplènic de polpa vermella amb limfòcits peluts basòfils, per tractar-se d'una entitat amb característiques intermitges entre la LCPv i els LZME.

### **LZME versus LLP**

Degut a la presència de cèl·lules B amb diferenciació plasmacítica a la zona marginal dels LZME i la presència de paraproteïna en sèrum existeix controvèrsia pel que fa al diagnòstic diferencial entre les dues entitats. Generalment el diagnòstic de LLP és realitza per exclusió, essent els LZME la patologia que més s'hi superposa (Matutes i col., 2008).

La presència d'un patró d'infiltració mixta de les polpes blanca i vermella així com l'absència de diferenciació marginal confirmen el diagnòstic de LLP. En absència de mostra esplènica la combinació de CD22 i CD25 per citometria de flux és útil per a diferenciar entre les dues entitats tot i que no concloent (Mollejo i col., 2005). Recentment s'ha descrit la mutació MYD88 L265P en LLP de manera que l'ànalisi d'aquest gen ha de permetre discriminar entre aquesta entitat i els limfomes de la zona marginal el general. Els autors del treball justifiquen la presència d'aquesta mutació en casos de LZME i limfomes MALT pel fet que aquests en realitat són LLP mal diagnosticats i que precisament la mutació de MYD88 L265P ha de permetre establir un diagnòstic definitiu (Gachard i col., 2013).

### **LZME *versus* LCM, LF i LLC**

Es tracta d'entitats perfectament diferenciades entre sí, de manera que normalment no hi ha problemes a l'hora d'establir-ne el diagnòstic. De tota manera, existeixen casos en els que la histologia i la citologia no són suficientment esclaridores. En aquestes situacions, l'immunofenotip a nivell histològic/citològic (Taula 7) i sobretot la citogenètica a nivell general (Taula 2) resulten imprescindibles per a la classificació final de la neoplàsia. Cal destacar l'existència de l'anomenat limfoma fol·licular esplènic, que a diferència del LF clàssic es caracteritza per presentar infiltració esplènica amb un patró micronodular i expressió perifèrica que de vegades pot donar-se en forma de limfòcits vellosos. Es tracta doncs d'una entitat freqüentment mal diagnosticada com a LZME. L'expressió de marcadors centre-fol·liculars, les característiques citològiques dels centroblates i centròcits així com l'absència d'expressió d'IgD són essencials per al diagnòstic diferencial d'aquest tipus de LF (Mollejo i col., 2009).

**Taula 7A**

	LZME	LCM	LF	LLC
CD10	-	-	+	-
BCL6	-	-	+	-
CCND1	-	+	-	-

**Taula 7B**

	LZME	LCM	LF	LLC
CD19	+	+	+	+
CD20	+	+	+	+
CD5	+/-	+	-	+
CD10	-	-	+	-
CD23	-	-	+	+
CD43	-	+	+/-	+
CCND1	-	+	-	-

**Taula 7.** Immunofenotip per al diagnòstic diferencial de les SLP-B cròniques. 7A Immunofenotip per histologia i 7B Immunofenotip per citologia.

#### **4. ALTERACIONS CITOGENÈTIQUES EN ELS LIMFOMES DE LA ZONA MARGINAL ESPLÈNICA**

L'anàlisi citogenètica dels limfomes és important per diferents raons ja que en ocasions permet orientar i/o confirmar el diagnòstic, la presència d'alteracions secundàries representen en molts casos un valor pronòstic, les alteracions pròpies d'una patologia permeten dur a terme un seguiment del curs clínic de la malaltia i la detecció dels canvis cromosòmics permet conèixer els gens implicats en l'origen de la mateixa.

Contrastant amb altres SLP-B ben caracteritzats per alteracions cromosòmiques específiques, en els LZME no existeix una alteració consistent o única associada a la patologia tot i que la presència d'alteracions clonals es dóna aproximadament en un 70-80% dels casos (Oscier i col., 1993, Dierlamm i col., 1996, Solé i col., 2001, Hernández i col., 2001, Andersen i col., 2005, Salido i col., 2010).

El primer treball sobre les alteracions citogenètiques presents en els LZME va ser publicat l'any 1993 (Oscier i col., 1993). Aquell estudi es basava en una sèrie de 31 pacients on les alteracions més freqüentment detectades van ser la t(11;14)(q13;q32), la presència d'isocromosomes 17q així com anomalies a 7q i al cromosoma 12 (Oscier i col., 1993). Mentre que la sèrie d'Oscier i col·laboradors suggeria una relació entre els LZME i els LCM, un estudi del grup de Dierlamm observava una elevada incidència de trisomia 3 en aquesta entitat, similar a la que havia estat descrita en els limfomes MALT (Dierlamm i col., 1996). Per tal d'intentar projectar una mica de llum sobre aquestes contradiccions, Solé i col·laboradors van dur a terme estudis combinats de citogenètica i FISH, establint que els cromosomes més freqüentment implicats en els LZME eren 1, 3, 7, 8, 13, 14 i 20 (Solé i col., 1997, 2001). Els resultats obtinguts es trobaven en desacord amb la teoria de la possible relació entre els LZME i els LCM (Oscier i col., 1993) però confirmaven l'elevada freqüència de trisomia 3 descrita pel grup de Dierlamm (Dierlamm i col., 1996).



Els estudis mitjançant HGC presentaren uns resultats similars als obtinguts per citogenètica convencional, ampliant-ne el coneixement de les regions implicades en els guanys i les pèrdues genòmiques. Tot i que existeix certa heterogènia en els resultats dels diferents grups, a nivell general es pot concloure que els guanys són més freqüents que no pas les pèrdues, amb guanys recurrents a 3q i 12q i pèrdues principalment a 7q (Hernández i col., 2001, Andersen i col., 2005). El grup d'Hernández a més a més suggeria una relació entre els pacients que presentaven pèrdues (en general) i una taxa de supervivència inferior a la resta (Hernández i col., 2001) en concordança amb les observacions fetes anteriorment per Mateo i col·laboradors (1999) en referència a l'implicació de les delecions de 7q en els LZME. Finalment, un estudi multicèntric sobre una sèrie àmplia de casos descriu com a alteracions més freqüents en els LZME els guanys a 3/3q i 12q, les delecions de 7q i 6q i les translocacions de les regions 8q, 1q i 14q (Salido i col., 2010).

Les anomalies cromosòmiques a la regió q32 del cromosoma 14 implicant el gen *IGH* s'han trobat en els LNH amb diferents manifestacions clíniques i morfològiques (Takashima i col., 1997), però pel que fa als LZME, no en tenen una de característica. Tot i que el grup d'Oscier va suggerir la presència de la translocació t(11;14)(q13;q32) en els LZME (Oscier i col., 1993) aquesta hipòtesi va quedar descartada en estudis posteriors ja que es posà de manifest que els punts de trencament no eren els mateixos que per al LCM i en els LZME no hi havia implicació del gen *CCND1* (Thieblemont i col., 2004). D'altra banda, la translocació t(14;19)(q32;q13) implicant els gens *IGH/BCL3* (així com les variants amb *IGK* i *IGL*) que és una alteració freqüent en neoplàsies limfoides de cèl·lula B (tot i que llur significat patogènic està poc definit i per si sola no és suficient per a induir la tumorigènesi) no és habitual trobar-la en casos diagnosticats de LZME (Martín-Subero i col., 2007).

Alguns estudis han intentat relacionar les alteracions cromosòmiques presents al cariotip amb el curs clínic i el pronòstic de la malaltia. Per exemple, la t(2;8)(p12;q24) ha estat descrita en un cas agressiu de LZME (Batanian i col., 2000) mentre que els cariotips complexes que inclouen 6q-, 11q-, +12 i pèrdues a 17p sembla ser que es troben en casos que presenten una histologia d'alt grau (Cuneo i col., 2001).

En aquest sentit, Salido i col·laboradors (2010) van realitzar un estudi sobre una sèrie àmplia de pacients observant que els cariotips amb dues o més alteracions donaven lloc a un pronòstic més desfavorable que la resta, així com els casos que presentaven deleció de *TP53* i alteracions a 14q32.

#### **4.1 ALTERACIONS CROMOSÒMIQUES NUMÈRIQUES**

Als LZME els guanys són més freqüents que no pas les pèrdues de manera que les alteracions numèriques més freqüents en ordre d'importància són les trisomies 3/3q, 18 i 12 (Salido i col., 2010).

##### **4.1.1 TRISOMIA 3**

La trisomia 3 és una alteració freqüent en els LZM (MALT, nodal i esplènic) mentre que la seva presència és poc habitual en altres tipus de LNH. Associada a les variables clíniques i de laboratori pròpies, representa una de les alteracions més consistents per a la caracterització dels LZME (Dierlamm i col., 1996).

La seva incidència però està sotmesa a certa variabilitat en funció de la tècnica utilitzada: es va demostrar que els estudis mitjançant FISH incrementaven la detecció de les cèl·lules portadores de trisomia en comparació amb la citogenètica convencional (Gruszka-Westwood i col., 1999). D'altra banda, aquest mateix estudi va permetre demostrar que no existeixen diferències entre els casos de LZME i de LELV pel que fa a aquesta alteració, confirmant un cop més que es tracta de la mateixa entitat (Gruszka-Westwood i col., 1999). Curiosament s'ha observat que els casos que presenten trisomia 3/3q es troben associats a expressió de CD5 i que és una alteració força associada als cariotips complexos (Salido i col., 2010).

No es coneix el mecanisme genètic pel qual la trisomia 3 contribueix a la transformació neoplàsica. Una explicació podria ser l'efecte de la dosi gènica amb sobreexpressió dels gens localitzats al cromosoma 3, com per exemple l'antigen de superfície B7 (3q13.3-21)(el qual millora les interaccions amb les cèl·lules T mediatees per CD28, incrementant la producció de limfoquines),

*PBX2* (3q22-23) que codifica per a subunitat de la IL-12, *BAL* (3q21, *B aggressive lymphoma gene*) o *BCL6* (Dierlamm i col., 1996, Gazzo i col., 2003). A part del significat biològic de la presència de material extra de la regió 3q, també cal tenir en compte les conseqüències de llur reordenament amb altres regions cromosòmiques, ja que l'expressió dels seus gens queda disregulada (Gazzo i col., 2003).

Per tal de definir la regió 3q i determinar-ne llur importància en els LZME es van realitzar diferents estudis citogenètics, la majoria dels quals mitjançant la tècnica de la HGC, quedant descrites com a regions més representatives 3q21 i 3q29 (Dierlamm i col., 1997, Hernández i col., 2001, Andersen i col., 2005). Finalment, combinant estudis de citogenètica convencional i FISH es va determinar la regió més freqüentment sobreexpressada a 3q, quedant localitzada entre 3q13-3q29 (Gazzo i col., 2003).

Associades a la trisomia 3 es troben altres alteracions com ara la trisomia 18 i alteracions estructurals a 1p34 i 1q21 (Dierlamm i col., 1996). D'altra banda, tot i que en un principi es pensava que la del(7q) i la trisomia 3 eren alteracions excloents que donaven lloc a diferents vies patogèniques en els LZME (Solé i col., 2001), Gazzo i col·laboradors van observar el contrari i que, fins i tot en alguns casos, s'originaven reordenaments entre 3q i 7q (Gazzo i col., 2003).

## 4.2 ALTERACIONS CROMOSÒMIQUES ESTRUCTURALS

La disregulació de l'expressió de gens amb propietats oncogèniques deguda a translocacions específiques és un esdeveniment clau en la patogènesi de la gran majoria de les SLP-B. Als LZME en canvi, no existeix una translocació cromosòmica característica i responsable de la patologia. Tot i que s'han descrit en alguns casos translocacions implicant el *loci* de les Ig, l'alteració més recurrent en aquest tipus de limfoma són les delecions del braç llarg del cromosoma 7.

#### 4.2.1 DELECCIÓ DE 7q

L'any 1993, poc després de que Oscier i col·laboradors publicuessin el treball sobre les alteracions citogenètiques presents en els LZME, es va descriure per primer cop la deleció del(7)(q32) en desordres limfoproliferatius de cèl·lula B madura (Solé i col., 1993). Curiosament, i en concordança amb els resultats obtinguts pel grup d'Oscier, dos dels quatre casos on es detectava aquesta anomalia corresponien a pacients diagnosticats de LZME. Tot i que també s'han descrit casos en els que la regió 7q32 es troba reordenada en forma de translocació, es presenta de forma recurrent en els LZME com a deleció i acostuma a trobar-se com a única alteració en el cariotip, sobretot en pacients amb esplenomegàlia (Troussard i col., 1998, Solé i col., 2001). De tota manera, la millor manera per a determinar la presència/absència de delecions a 7q és mitjançant la tècnica de FISH, ja que permet detectar delecions terminals que poden passar desapercebudes per citogenètica convencional (Solé i col., 2001). Precisament, Remstein i col·laboradors van dur a terme l'any 2008 un estudi per FISH sobre les melses de 167 pacients, on a part de confirmar l'elevada freqüència de la deleció 7q32 van poder associar la presència d'aquesta anomalia amb la negativitat per immunofenotip de CD5. Es tracta d'una dada curiosa, si més no perquè la coexpressió de CD5 és freqüent en els LZME, però sembla ser que es troba associada a altres anomalies citogenètiques com ara les aneuploidies (Salido i col., 2010).

L'elevada freqüència d'aquesta deleció en els LZME (més d'un 40% dels casos la presenten) en comparació amb la resta de SLP-B fa que sigui considerada l'alteració característica d'aquesta patologia i s'utilitzi en llur diagnòstic diferencial (Oscier i col., 1993, Mateo i col., 1999, Hernandez i col., 2001, Solé i col., 2001, Gazzo i col., 2003, Gruszka-Westwood i col., 2003, Andersen i col., 2005, Salido i col., 2010).

Mateo i col·laboradors (1999) van dur a terme un estudi utilitzant microsatèl·lits per tal de determinar les regions més freqüentment perdudes i establiren la regió més comuntment delecionada (SCDR, *small commonly deleted region*) a 7q33-34. També van observar que aquesta alteració s'associava a un curs més agressiu, amb progressió i fins hi tot *exitus* degut al tumor.

En la mateixa línia, Gruszka-Westwood i col·laboradors utilitzaren microsatèl·lits i sondes de FISH, trobant molta heterogeneïtat pel que fa a la pèrdua d'heterocigositat (LOH, *loss of heterozygosity*) que van relacionar amb inestabilitat cromosòmica. Explicaven la poca concordància entre els resultats moleculars i els de FISH que podia ser deguda a delecions intersticials, al baix poder de resolució de les sondes o bé que la mida de la mostra no fós suficientment representativa. Finalment, suggerien l'existència en aquesta regió d'un gen supressor de tumors encara no caracteritzat (Gruszka-Westwood i col., 2003). En aquest sentit, Vega i col·laboradors (2008) en un estudi mitjançant *array* d'hibridació genòmica comparada (aHGC) per tal de detectar canvis en el número de còpies a nivell de nucleòtid i van trobar dos gens que podien estar associats a la patogènia dels LZME: *POT1* i *SHH*. *POT1* és un gen encarregat de la protecció telomèrica de manera que si es troba infraexpressat pot donar lloc a inestabilitat cromosòmica ja suggerida en altres treballs (Gruszka-Westwood i col., 2003, Hernandez i col., 2001). D'altra banda, *SHH* es troba implicat en la proliferació hematopoiètica, essent vital per a les cèl·lules B del centre germinal, i tot i que es troba delectat en un 50% dels casos, el seu paper en els LZME encara no està clar (Vega i col., 2008). De tota manera, tot i tractar-se de l'alteració més freqüent en els LZME i ser una alteració que en la majoria dels casos es presenta com a única anomalia citogenètica, no pot considerar-se com a l'esdeveniment patogènic primari d'aquesta entitat ja que una elevada proporció de casos presenten cariotip complex al diagnòstic, de manera que el més probable és que altres alteracions com mutacions puntuals, anomalies en els micro-ARN (miARN) etc.. (no detectables per citogenètica convencional) siguin les causes primàries d'aquesta patologia (Ruiz-Ballesteros i col., 2007, Remstein i col., 2008). En aquest sentit s'ha publicat més recentment un treball en el qual es van estudiar casos de LZME amb delecio de 7q mitjançant *arrays* d'alta resolució, per tal de determinar la presència de gens supressors de tumors en homozigosi, miARN rellevants i/o anomalies en l'estat de metilació de la SCDR. Els resultats que van obtenir posen de manifest que no hi ha cap gen/miARN dels estudiats a la SCDR afectat especialment per la delecio de 7q i a més a més els LZME amb del(7q) es comporten igual que els que no la tenen de manera que ha d'existir un altre mecanisme patogènic comú (Watkins i col., 2012).

#### 4.2.2 TRANSLOCACIONS DELS GENS DE LES IMMUNOGLOBULINES

Les anomalies que afecten la banda q32.33 del cromosoma 14 on es troba el gen *IGH* s'han descrit en la majoria de LNH amb diferents manifestacions morfològiques i/o clíniques.

Es tracta d'anomalies citogenètiques característiques que en molts casos constitueixen l'esdeveniment primari en els limfomes de cèl·lula B madura (Heim i Mitelman, 2009). Tot i això, no es coneix una alteració d'aquest tipus pròpia per als LZME, encara que esporàdicament es publiquen estudis que refereixen translocacions implicant els *loci* de les Ig, tant de la cadena pesada (*IGH*, 14q32) com de les cadenes lleugeres (*IGK*, 2p12 i *IGL* 22q11) de les Ig en aquesta entitat (Corcoran i col., 1999, Sonoki i col., 2001). El grup de Remstein i col·laboradors (2008) es va proposar establir quina era la prevalença de les translocacions dels gens de les Ig en els LZME mitjançant un estudi per FISH utilitzant sondes per a *IGH*, *IGK* i *IGL*. Van determinar la incidència d'aquestes translocacions en un 7% (6% translocacions d'*IGH*, i 1% translocacions d'*IGK* i *IGL* respectivament) i que els altres gens implicats en elles eren molt variats, detectant-se a més a més en la majoria de casos en cariotips complexes. Amb aquests resultats, van concloure que les translocacions implicant les Ig representen un esdeveniment secundari en els LZME, el qual no ajuda a determinar la causa primera de la neoplàsia.

##### **t(2;7)(p12;q21) *IGK/CDK6***

Tot i que les alteracions a 7q més freqüents en LZME són les delecions, també podem trobar aquesta regió implicada en translocacions que en la majoria dels casos són no balancejades (Gruszka-Westwood i col., 2003). En aquest sentit, Corcoran i col·laboradors (1999) van descriure una translocació implicant el gen *CDK6* (localitzat a 7q21) i la regió VJ de la Ig de cadena lleugera kappa. *CDK6* és una quinasa ciclina-dependent que s'encarrega de la regulació positiva cap a la fase 1 del cicle cel·lular. La seva juxtaposició amb els promotors de les Ig dóna lloc a una sobreexpressió que en els limfòcits B contribueix a la limfomagènesi. Per aquest motiu, tot i que ha estat descrit en LZME en els quals contribueix a la patogènesi, *CDK6* és un gen implicat en la majoria de limfomes amb baix índex proliferatiu (Hayette i col., 2003).

**t(6;14)(p21.1;q32)**

Les alteracions citogenètiques de la regió 6p21 (delecions, amplificacions i translocacions) s'han descrit en moltes neoplàsies de cèl·lula B madura, principalment en mieloma múltiple.

El gen *CCND3*, regulador del cicle cel·lular, va ser descrit pel grup de Sonoki i col·laboradors com el gen diana de la t(6;14)(p21.1;q32). A més a més van destacar que els reordenaments a 6p21 no són exclusius del mieloma múltiple i que precisament els reordenaments de *CCND3* en forma de translocació juxtaposant-se amb el gen *IGH* són una alteració descrita principalment en LDCG i LZME (Sonoki i col., 2001).

**t(9;14)(p13;q32)**

La t(9;14)(p13;q32) implicant els gens *PAX-5/IGH* va ser descrita en un principi en LNH amb diferenciació plasmacitoide (Offit i col., 1992). Treballs posteriors van demostrar però que no era una alteració característica dels LLP i que es podia donar en qualsevol neoplàsia limfoide (Cook i col., 2004, Poppe i col., 2005). Aquesta translocació s'ha descrit en alguns casos de LZME, on es postula que el reordenament *PAX-5/IGH* confereix a les cèl·lules B de memòria de la zona marginal un potencial de transformació a cèl·lules plasmàtiques (Mollejo i col., 2002, Gazzo i col., 2003).

**t(14;19)(q32;q13)**

La t(14;19)(q32;q13) *IGH/BCL3* és una translocació recurrent a les SLP-B així com llurs variants implicant els *loci* de les cadenes lleugeres kappa i lambda (t(2;9) i t(19;22)) que es donen en una proporció similar a les variants de la t(8;14)(q24;q32) (Heim i Mitelman, 2009). A diferència d'altres translocacions el seu significat a nivell oncogènic no està ben definit tot i que s'han descrit dos subgrups en funció de les alteracions citogenètiques observades i l'estat mutacional de IgVH. El primer grup inclou SLP-B amb cariotips complexes i IgVH mutat mentre que el segon són les SLP-B tipus LLC, amb poques alteracions i IgVH no mutat (Martín-Subero i col., 2007).

### 4.2.3 ALTRES TRANSLOCACIONS

Les translocacions del gen *BCL6*, localitzat a 3q27, es consideren una de les alteracions més freqüents en els LNH, tot i que es troben associades principalment a LDCG amb infiltració extranodal. Es tracta de reordenaments amb els gens de les Ig en un 50%, amb altres cromosomes en un 40% dels casos aproximadament i de reordenaments intracromosòmics en el 10% restant.

Pel que fa als LZME, no s'han descrit gaires casos amb reordenaments de *BCL6*, i es suggereix una relació amb llur evolució a LDCG (Keller i col., 2006).

#### **t(11;18)(q21;q21)**

La translocació t(11;18)(q21;q21) implicant els gens *API2/MLT* representa l'alteració estructural més freqüent en els limfomes MALT. La conseqüència d'aquest reordenament és una supressió de l'apoptosi en el desenvolupament de les cèl·lules B (Dierlamm i col., 2000; Blood, Dierlamm i col., 2000; Hematol Oncol). Tot i que els diferents limfomes de la zona marginal presenten el mateix origen cel·lular, aquesta alteració no ha estat descrita en cap cas de LZME, confirmant que es tracta d'una entitat totalment diferenciada dels limfomes MALT.

## **5. ALTERACIONS MOLECULARS EN ELS LIMFOMES DE LA ZONA MARGINAL ESPLÈNICA**

### 5.1 HIPERMUTACIONS SOMÀTIQUES DE LES IMMUNOGLOBULINES

Les hipermutacions somàtiques en els gens que codifiquen per a les Ig constitueixen una variable amb importància clínica en limfomes de cèl·lula B petita com els LZME. (Tracey i col., 2008). A més a més, l'anàlisi d'aquestes mutacions és útil per a determinar en quin estat del desenvolupament es troba la cèl·lula neoplàsica. Es tracta de mutacions que es donen amb una freqüència de  $10^{-3}$ - $10^{-4}$  (sis cops més que les mutacions espontànies de la resta de gens) i en la majoria de casos són resultat d'un canvi de base de la regió V (Tracey i col., 2008).



Els LZME constitueixen una entitat sobre la que hi ha consens en classificar com a molecularment heterogènia. Es tracta de neoplàsies amb origen a la zona marginal on les cèl·lules B es troben subjectes (com a la resta del centre germinal) a les hipermutacions somàtiques d'IgVH i *BCL6*, i per tant són entitats susceptibles de presentar un marcador molecular específic de línia cel·lular (Algara i col., 2002, Franco i col., 2003, Stamatopoulos i col., 2004, Kalpadakis i col., 2009).

Els primers estudis suggerien que els LZME derivaven de cèl·lules post-germinals de memòria, basant-se en el fet que les cèl·lules limfomatoses eren portadores de mutacions en els gens IgVH (Zhu i col., 1995, Dunn-Walters i col., 1998, Miranda i col., 1999). D'altra banda, Mateo i col·laboradors (2001) van descriure que la majoria de casos de LZME deriven de cèl·lules de la zona marginal, amb hipermutació de *BCL6*, mentre que una petita part deriva d'un precursor *naïve* no mutat de la zona del mantell. A més a més, en un altre article, Bahler i col·laboradors (2002) postulaven l'existència de dos grups de LZME en funció de l'estat mutacional de la VH. Així hi hauria un grup amb VH no mutat i expressió d'IgD (derivat de cèl·lula *naïve*) i un grup amb VH mutat IgD-, consistents amb origen de cèl·lula B de memòria. D'altra banda estudis realitzats sobre teixits diferents de pacients afectes confirmen que els factors microambientals són capaços d'iniciar mutacions somàtiques de manera que indirectament també tenen influència en el desenvolupament i progressió tumorals (Franco i col., 2003).

Certament, existeix controvèrsia sobre l'origen de cèl·lules de la zona marginal pel que fa als LZME ja que aproximadament la meitat dels casos no presenta mutacions somàtiques d'IgVH, no es detecta diferenciació marginal quan el tumor es troba fora de la melsa i l'expressió d'IgD qüestiona l'origen marginal (Mollejo i col., 2005). Podria ser per tant que l'origen d'aquesta entitat fós una cèl·lula B de la zona marginal precursora, encara sense caracteritzar, hipòtesi que estaria confirmada pels estudis de Troen i col·laboradors (2004).

El primer estudi en una sèrie àmplia de pacients el van dur a terme Algara i col·laboradors l'any 2002 partint de la base que els LZME en derivar de cèl·lules post-germinals haurien de presentar seqüències IgVH hipermutades. Van observar que els casos no mutats es trobaven associats a la deleció de 7q i tenien més probabilitats de transformació a LDCG.

El grup de Stamatopoulos, van estudiar els subgrups de gens més freqüentment utilitzats en els reordenaments IgVH-D-J dels LZME, determinant que IgVH3 i IgVH4 són els més habituals en aquesta entitat, de la mateixa manera que les mutacions de les cadenes lleugeres kappa i lambda es donaven de forma similar (Stamatopoulos i col., 2004). L'utilització preferencial de determinats gens IgVH (així com IgVK, IgVL) és indicatiu de reconeixement antigènic específic, posant de manifest que tant el microambient com l'estímul antigènic juguen un paper important en el procés de limfomagènesi dels LZME (Algara i col., 2002, Stamatopoulos i col., 2004, Kalpadakis i col., 2009). El significat pronòstic de la presència o no de mutacions no està gaire clar, ja que algunes sèries relacionen l'estat no mutat amb un curs clínic més agressiu (Algara i col., 2002, Ruiz-Ballesteros i col., 2005) mentre que d'altres estudis no troben diferències significatives entre mutació/no mutació (Kalpadakis i col., 2009).

Cal esmentar que les hipermutacions somàtiques porten associada una signatura gènica que pot ser molt important a nivell de pronòstic, ja que alteracions en l'expressió dels gens relacionats comporta un augment o disminució de l'estat mutacional. Tracey i col·laboradors (2008) van estudiar mitjançant *arrays* d'expressió els gens implicats en la hipermutació somàtica de les Ig en limfomes B de cèl·lula petita, tot i que el grup de LZME estudiats és molt reduït per a poder establir conclusions. L'impacte pronòstic de l'estat mutacional de les Ig en els LZME es troba doncs encara en discussió (Hockley i col., 2012).

## 5.2 ALTRES ALTERACIONS MOLECULARS

### ***MYD88 L265P***

Tot i trobar-se mutat en aproximadament un 90% dels casos de Macroglobulinèmia de Waldenström (MW) i LLP, la mutació somàtica de *MYD88 L265P* també ha estat descrita en LZME (Martínez-López i col., 2015). Tot i així, es segueix considerant una alteració característica del LLP.

**El gen *EZH2***

En LDCG i LF s'han descrit mutacions recurrents al gen *EZH2*, localitzat a 7q36.1 i considerat un gen supressor de tumors. El grup de Salido i col·laboradors (2011) va intentar esbrinar si existia correlació entre les mutacions de d'aquest gen i les delecions a 7q en els LZME. Els resultats van determinar que *EZH2* no té cap paper en la patogènesi del LZME.

Recenment s'han realitzat estudis de seqüenciació massiva per tal de demostrar relacions entre la clínica i les mutacions gèniques dels LZME. A part de corroborar la presència de la mutació *MYD88 L265P* (i d'altres mutacions en major o menor mesura) sembla ser que les mutacions a *NOCTH2* es troben relacionades amb menor temps previ a teràpia mentre que mutacions de TP53 s'associen a una menor supervivència (Parry i cols; 2015).



## **II HIPOTÈSI DE TREBALL I OBJECTIUS**



## **1.HIPÒTESI DE TREBALL**

La hipòtesi de treball es basa en la possible existència de marcadors cromosòmics útils per al coneixement dels gens implicats en el desenvolupament i progressió dels LZME. L'aplicació de les diferents tècniques de citogenètica convencional i citogenètica molecular hauria de permetre detectar noves alteracions i marcadors genètics en pacients diagnosticats de LZME. D'aquesta manera, el coneixement de nous canvis cromosòmics podria conduir cap a un diagnòstic i terapia específics.

## **2.OBJECTIUS**

A) Desenvolupar un estudi citogenètic exhaustiu de LZME utilitzant les següents tècniques:

- Citogenètica convencional de sang perifèrica, medul·la òssia, melsa o gangli limfàtic utilitzant TPA com a mitògen.
- Sobre els casos amb un cariotip complex o alteracions citogenètiques no definides i un número suficient de metafases es durà a terme la tècnica de l'SKY amb l'objectiu de definir noves translocacions cromosòmiques.

B) Definir els gens implicats en les translocacions recíproques.

En aquells casos en els quals es detecti una translocació no descrita previamente, s'utilitzaran sondes de FISH, tant comercials com no comercials per tal de determinar el punt de ruptura molecular. L'objectiu d'aquesta part de l'estudi és descriure nous gens implicats en la patogènia dels LZME.





### **III MATERIAL I MÈTODES**



## **1. PACIENTS**

En aquest treball s'han estudiat mostres de diferents teixits biològics de pacients diagnosticats de LZME.

Les mostres han estat recollides entre els anys 2004 i 2008 provinents dels diferents centres enumerats a continuació:

Hospital del Mar	Barcelona
Hospital Clínic i Provincial	Barcelona
Hospital Universitari de Bellvitge	L'Hospitalet de Llobregat
Hospital Germans Trias i Pujol	Badalona
Hospital Universitario Central de Asturias	Oviedo
Hospital Clínico Universitario	Salamanca

## **2. MÈTODES**

A continuació s'exposen en diferents apartats, resums de les tècniques emprades així com els protocols utilitzats en aquest treball. Les condicions que s'esmenten han estat les òptimes per a l'obtenció de resultats idònics. Per a la manipulació de les mostres han estat utilitzats sempre guants de vinil (Sempercare<sup>®</sup>) i en cas de treballar amb reactius perillosos aquests han estat de nitril (Flexam<sup>®</sup>).

Degut a que l'anglès és la llengua de la comunitat científica, de vegades és difícil trobar paraules i/o expressions equivalents en català. En aquests casos s'ha optat per a utilitzar el terme en anglès.

A l'ANNEX 1 es troben descrites les solucions emprades en les diferents tècniques d'aquesta memòria.

### **2.1 TÈCNIQUES DE CITOGENÈTICA CONVENCIONAL**

L'anàlisi dels cromosomes humans és una eina rellevant tant en recerca com en el diagnòstic i seguiment de diferents patologies. Les alteracions cromosòmiques són causa destacable de diferents malalties genètiques i la seva detecció és utilitzada en molts casos en l'establiment del diagnòstic.

En oncohematologia els reordenaments cromosòmics mantenen una estreta relació amb l'agressivitat, el grau i la citologia de la patologia, tenint en la majoria de casos valor pronòstic i influència en l'elecció terapèutica.

És per tot això, que la detecció d'alteracions cromosòmiques així com de les regions i gens implicats en elles és fonamental en la caracterització de les neoplàsies hematològiques.

### 2.1.1 EXTRACCIÓ I CONSERVACIÓ DE LES MOSTRES

Les mostres utilitzades per a l'estudi per citogenètica convencional han estat de sang perifèrica, medul·la òssia o melsa. Tot seguit es descriu com ha estat realitzada l'extracció i conservació d'aquestes.

#### A) MOSTRES DE SANG PERIFÈRICA

Les mostres de sang perifèrica s'obtenen per venopunció de les venes cefàlica o basilica i es recullen en tubs hermètics amb anticoagulant. Per al cultiu de citogenètica convencional és necessari que aquest sigui tipus heparina sòdica o bé heparina de liti ja que l'EDTA inhibeix el creixement cel·lular.

Les mostres de sang perifèrica es conserven en bon estat fins a 48 hores a temperatura ambient (TA), tot i que és recomanable processar-les en les primeres 24 hores.

#### B) MOSTRES DE MEDUL·LA ÒSSIA

En un aspirat de medul·la òssia s'obté líquid medul·lar per mitjà d'un procés de succió. Després d'anestesià la zona, es penetra a la cavitat medul·lar amb un tròcar i es procedeix a aspirar uns 2 mL de material. Les mostres es prenen generalment dels ossos ilíacs o bé de l'estèrnum (preferentment). L'aspirat és recull en un tub de 15 mL amb 5 mL de medi RPMI-1640 suplementat amb heparina sòdica a l'1%. La primera fracció de medul·la òssia és la més rica en cèl·lules en divisió, ja que a mesura que continua l'extracció aquesta es va contaminant amb sang perifèrica. Per tal d'obtenir el màxim nombre possible de cèl·lules en divisió és important posar el cultiu de medul·la òssia tan aviat com sigui possible després de la seva extracció.

És recomanable no sobrepassar les 10 hores i en cas que s'hagi d'esperar a processar la mostra, mantenir-la a TA o bé a 37°C.

### C) PECES D'ESPLENECTOMIA

S'anomena esplenectomia a l'extirpació quirúrgica de la melsa. L'esplenectomia electiva està indicada en diferents situacions com ara traumatisme esplènic, esferocitosi hereditària etc.. Pel que fa als LZME (patologia que acostuma a cursar amb esplenomegalia) és tracta d'una opció terapèutica de primera línia i també pot efectuar-se per tal de millorar els problemes de disconfort abdominal del pacient. L'esplenectomia es realitza sota anestesia general a través d'una incisió vertical o transversal sota el reborde costal esquerre. Cal esmentar, que actualment en casos en que la melsa no està gaire augmentada de tamany, l'esplenectomia per laparoscòpia és la tècnica d'elecció.

### 2.1.2 COMPOSICIÓ DEL MEDI DE CULTIU

#### REACTIUS I MATERIAL

Campana de flux laminar (Nuaire™)  
 Flascons de cultiu de 25 mL (TPP®)  
 Heparina sòdica 1% (Heparina Mayne®)  
 L-Glutamina 200 mM 100X (Gibco®)  
 Pipetes de plàstic d'1 mL, 5 mL i 10 mL  
 Pipetejador automàtic  
 RPMI-1640 sense L-Glutamina (Biological Industries®)  
 Sèrum boví fetal 0'1 µm (Biological Industries®)  
 Solució de Penicil·lina/Estreptomicina: 10000 unitats/mL penicil·lina G i 10 mg/mL sulfat d'estreptomicina (Biological Industries®)  
 Tubs de 15 mL (Sarstedt®)

El medi de cultiu es prepara en una campana de flux laminar prèviament esterilitzada amb etanol al 70%. A una ampolla de 100 mL de medi RMPI-1640 s'afegeix 1 mL d'heparina sòdica (1%). Es separen 20 mL de la barreja en quatre tubs de plàstic de 15 mL (5 mL cadascun) i es reserven a 4°C per quan s'hagin de fer puncions de medul·la òssia.

Als 80 mL restants s'hi afegeixen: 2 mL de L-Glutamina (2%), 1 mL de solució de Penicil·lina-Estreptomicina (1%) i 17 mL de sèrum boví fetal (17%).

S'aliquoten els 100 mL del medi complet en flascons de cultiu de 25 mL estèrils, a raó de 10 mL a cadascun. Es conserven a -20°C fins al moment del seu ús.

### 2.1.3 CULTIU DE SANG PERIFÈRICA

#### REACTIUS I MATERIAL

Alíquota de TPA (Annex 1)  
 Alíquota de 10 mL de medi de cultiu  
 Bany a 37°C  
 Campana de flux laminar (Nuaire™)  
 Centrífuga (Heraeus®)  
 Colcemid 10 µg/mL (Biological Industries®)  
 Comptador automàtic (Coulter) o càmera Neubauer  
 Estufa a 37°C i 5% de CO<sub>2</sub> (Napco)  
 Fixador Carnoy (Annex 1)  
 Hipotònica (KCl 0'075 M) (Annex 1)  
 Pipetes de plàstic d'1 mL  
 Pipetejador automàtic  
 Pipetes Pasteur de 3 mL  
 Sèrum fisiològic 0'9% (Braun®)  
 Tubs d'1'5 mL (Eppendorf®)  
 Tubs de 15 mL (Sarstedt®)

#### A. Preparació del material

Cal tenir a punt un flascó de cultiu amb 10 mL de medi complet atemperat ja que es conserven a -20°C (es pot atemperar a TA o bé al bany maria a 37°C).

El nombre idòni de leucòcits per al cultiu és de 2 milions per mL, de manera que caldrà ajustar el volum de la mostra a aquesta quantitat. El recompte es pot fer tant amb un comptador automàtic com de forma manual amb una càmera de Neubauer.

Si la mostra de sang perifèrica arriba en un tub amb EDTA, caldrà fer rentats per tal d'eliminar-lo, ja que inhibeix el creixement cel·lular. Els rentats consisteixen en posar 1 mL de la sang en 10 mL de sèrum fisiològic invertint bé varies vegades de forma lenta per no trencar les cèl·lules. Posteriorment es fa una centrifugació de 10 minuts a 1500 rpm i s'aspira amb una pipeta el sobrenedant que conté l'EDTA. El botó cel·lular ja pot ser ressuspès en el medi de cultiu.

## B. Cultiu

Un cop posat el volum adequat de mostra, s'afegeix la quantitat necessària de mitògen per tal d'estimular la divisió dels limfòcits B. Després d'haver testat un nombre prou elevat de mostres procedents de pacients amb diferents SLP-B al laboratori, s'ha arribat a la conclusió que el millor mitògen per a estimular els limfòcits B és el TPA.

- a) Es posa el volum de mostra necessari per tenir uns 20 milions de leucòcits en 10 mL.
- b) S'afegeixen 100  $\mu$ L de TPA i es barreja per immersió.
- c) Es protegeix el flascó de la llum amb paper d'alumini, ja que el TPA és fotosensible.
- d) S'obre el tap del flascó fins al primer topall i es col·loca a l'estufa de cultiu a 37°C i 5% de CO<sub>2</sub>. És important que el tap estigui obert per tal que hi hagi intercanvi de gasos.
- e) Es cultiva durant 72 hores.

## C. Processat de la mostra procedent del cultiu

Abans de començar es posa la solució hipotònica al bany a 37°C.

- a) S'atura el creixement del cultiu afegint 100  $\mu$ L de Colcemid que és un antimitòtic. El Colcemid provoca la degradació dels microtúbuls (per inhibició de la polimerització de tubulina) de manera que les cèl·lules s'aturen en fase de metafase.
- b) S'incuba a l'estufa de cultius durant dues hores més.
- c) Es traspasa el contingut del flascó a un tub de 15 mL.
- d) Es centrifuga 10 minuts a 1500 rpm.
- e) Es decanta el sobrenedant amb molt de compte ja que el pellet no està molt ben adherit al tub.
- f) S'afegeixen 10 mL d'hipotònica (preescalfada a 37°C). S'afegeixen utilitzant una pipeta pasteur. Per als dos primers mililitres és important afegir-la de forma constant, ressuspenent bé el pellet (agitant) per evitar la formació de grumolls.
- g) Es deixa la mostra 20 minuts al bany a 37°C.
- h) Es centrifuga 10 minuts a 1500 rpm.

- i) Es decanta el sobrenedant i es ressuspèn el botó cel·lular (amb el vòrtex si cal).
- j) S'afegeixen 10 mL de fixador Carnoy. En aquest pas també és molt important evitar la formació de grumolls. Per als dos primers mililitres ho fem gota a gota agitant i els últims 8 mL s'afegeixen a raig i amb pressió.
- k) Es torna a centrifugar 10 minuts a 1500 rpm i s'afegeix de nou fixador.
- l) Es centrifuga per últim cop 10 minuts a 1500 rpm i s'afegeix el fixador.
- m) Es ressuspèn amb fixador fins que la mostra adopta un color tèrbol i aleshores se'n separa una part en un tub d'1'5 mL per a conservar a  $-20^{\circ}\text{C}$  o bé a  $-80^{\circ}\text{C}$  (si és per a un temps més llarg de dos mesos).

Ja tenim la mostra a punt per a fer-ne extensions cromosòmiques.

#### 2.1.4 CULTIU DE MEDULLA ÒSSIA

##### REACTIUS I MATERIAL

Alíquota de TPA (Annex 1)  
Alíquota de 10 mL de medi de cultiu  
Campana de flux laminar (Nuair<sup>TM</sup>)  
Centrífuga (Heraeus<sup>®</sup>)  
Colcemid 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (Biological Industries<sup>®</sup>)  
Comptador automàtic (Coulter) o càmera Neubauer  
Bany a  $37^{\circ}\text{C}$   
Estufa a  $37^{\circ}\text{C}$  i 5% de  $\text{CO}_2$  (Napco)  
Fixador Carnoy (Annex 1)  
Hipotònica (KCl 0'075 M) (Annex 1)  
Pipetes de vidre d'1 mL  
Pipetejador automàtic  
Pipetes Pasteur de 3 mL de plàstic i de vidre (esterilitzades)  
Tubs d'1'5 mL (Eppendorf<sup>®</sup>)  
Tubs de 15 mL (Sarstedt<sup>®</sup>)

Abans de començar cal atemperar un flascó amb 10 mL de medi de cultiu complet a TA o bé al bany maria a  $37^{\circ}\text{C}$ .



## A. Cultiu

- a) Es centrifuga la mostra durant 10 minuts a 1800 rpm.
- b) Es procedeix a separar la capa blanca de cèl·lules mononucleades. En aquesta capa es troben els limfòcits que interessa estudiar. Es fa l'extracció utilitzant una pipeta Pasteur de vidre prèviament esterilitzada. A part de la capa blanca, s'agafa també una mica de la capa inferior (on es troben els eritròcits) per tal que les cèl·lules es trobin en el seu ambient i creixin millor.

Depenent del tipus cel·lular predominant a la medul·la òssia (s'observa en les extensions procedents de l'aspirat medul·lar) s'afegeix o no mitògen. Si predominen els elements immadurs no posarem TPA, però si per contra hi ha predomini de cèl·lules madures se n'afegeixen 100 µL.

- c) S'obre el tap del flascó fins al primer topall i es col·loca a l'estufa de cultiu a 37°C i 5% de CO<sub>2</sub>. Normalment les síndromes limfoproliferatives B es cultiven durant 72 hores amb TPA.

Si la medul·la és rica en cèl·lules immadures es cultivarà només 24 hores. Si els elements presents són madurs es deixarà 72 hores.

## B. Processat de la mostra procedent del cultiu

El processat de la mostra és el mateix que per a la sang perifèrica.

### 2.1.5 CULTIU DE GANGLI LIMFÀTIC

#### REACTIUS I MATERIAL

Agulles de 19G  
 Alíquota de TPA (Annex 1)  
 Alíquotes de 10 mL de medi de cultiu  
 Bany a 37°C  
 Campana de flux laminar (Nuaire™)  
 Centrífuga (Heraeus®)  
 Colcemid 10 µg/mL (Biological Industries®)  
 Comptador automàtic (Coulter) o càmera Neubauer  
 Estufa a 37°C i 5% de CO<sub>2</sub> (Napco)  
 Fixador Carnoy (Annex 1)  
 Flascons de 50 mL (Sarstedt®)  
 Heparina sòdica a l'1%

Hipotònica (KCl 0'075 M) (Annex 1)  
Pipetes de vidre d'1 mL  
Pipetejador automàtic  
Pipetes Pasteur de 3 mL  
Plaques de petri estèrils  
Tubs d'1'5 mL (Eppendorf®)  
Tubs de 15 mL (Sarstedt®)  
Xeringues d'1 mL

En aquest treball només han estat utilitzades mostres procedents d'esplenectomia, però el procediment per al cultiu és el mateix que per als ganglis limfàtics. Prèviament al cultiu, cal processar la mostra (teixit sòlid) per tal d'obtenir-ne cèl·lules en suspensió. D'altra banda, abans d'iniciar el procés es separa un petit fragment de la peça per tal de fer-ne emprentes sobre un portaobjectes. Les emprentes permeten fer una primera valoració citològica de la mostra per tal de determinar-ne el tipus cel·lular més abundant. Per als cultius de gangli limfàtic és recomanable sembrar dos flascons, un per a deixar-lo 24 hores sense mitògen (cultiu A) i l'altre per a cultivar-lo durant 72 hores amb mitògen (cultiu B).

#### A. Preparació de la mostra

- a) Es posa la peça de teixit en una placa de petri estèril amb medi RPMI-1640 complementat amb heparina sòdica a l'1%. Utilitzant xeringues de 1 mL amb agulles de 19G s'aspira el medi i s'introdueix dins el teixit de forma constant. Realitzant aquest procés de forma repetida es fa que les cèl·lules de l'interior del gangli vagin sortint i quedin en suspensió en el medi. A mida que aquest es va tornant tèrbol se n'afegeix més. Aquest procediment rep comunament el nom de "xutat".
- b) Es recull el medi amb les cèl·lules en suspensió en un flascó de 50 mL i se'n quantifica la quantitat obtinguda.
- c) S'atemperen dos flascons amb 10 mL de medi de cultiu a TA o bé al bany maria a 37°C.

## B. Cultiu

- a) Es calcula el volum de mostra necessari per a 20 milions de cèl·lules i es passa a llurs corresponents flascons amb medi de cultiu rotulats com a A i B.
- b) S'afegeixen 100 µL de TPA al flascó corresponent (B).
- c) S'obren els taps dels flascons fins al primer topall i es col·loquen a l'estufa de cultiu a 37°C i 5% de CO<sub>2</sub>.
- d) Es deixen cultivant durant 24 i 72 hores.

## C. Processat de la mostra procedent del cultiu

El processat de la mostra és el mateix que per a la sang perifèrica i la medul·la òssia.

### 2.1.6 EXTENSIONS CROMOSÒMIQUES

#### REACTIUS I MATERIAL

Fixador Carnoy (Annex 1)

Plaques calefactores a 45°C i 100°C

Portaobjectes (Menzel-Gläser®)

Per a fer les extensions cromosòmiques es centrifuga el material fixat en Carnoy durant 10 minuts a 3000 rpm. Es decanta el sobrenedant, es ressuspèn el pellet en el fixador residual i afegim Carnoy nou fins que es torni tèrbol (són aproximadament sis gotes). Per a l'estudi dels cromosomes i la seva correcta identificació, és necessari que aquests es trobin prou separats entre ells. S'aconsegueixen metafases ben escampades llençant la gota de la mostra al portaobjectes des d'una alçada de 50 centímetres - 1 metre.

Un cop fetes les extensions, s'assequen a la planxa a 45°C i es deixen envellir durant una hora a la planxa a 100°C. Per a cada mostra es fan tres extensions diferents.

### 2.1.7 TÈCNiques D'IDENTIFICACIÓ CROMOSÒMICA

Les tècniques de tinció de bandes (bandeig cromosòmic) ens permeten distingir els cromosomes. D'aquesta manera en podem conèixer el número, observar-ne la morfologia dels centròmers i constriccions secundàries així com detectar-ne alteracions numèriques i/o estructurals. Cal esmentar que també són observables ruptures i *gaps* (forats) de cromosoma i cromàtida.

Les tincions de bandes posen de manifest un patró que ens permet diferenciar i caracteritzar cadascun dels cromosomes. El mètode de tinció més utilitzat de forma rutinària en l'anàlisi citogenètic és el de bandes G.

#### **Tinció de bandes G**

També reb el nom de tinció Giemsa. S'obté un patró característic de bandes fosques (bandes G positives) i de bandes clares (bandes G negatives). Per a l'obtenció de bandes G s'han utilitzat el colorant de Wright i el tampó de Sörensen.

#### REACTIUS I MATERIAL

Aigua corrent

Colorant de Wright (Sigma®) (Annex 1)

Tampó de Sörensen (Annex 1)

Per a fer la tinció es barregen 3 mL de tampó de Sörensen amb 1 mL de colorant Wright per a cada portaobjectes (proporció 3:1) i es deixa actuar durant 3 minuts i 30 segons. Passat aquest temps es renten breument amb aigua corrent i s'assequen amb paper de filtre. Les mostres ja són a punt per a ser analitzades.

### 2.1.8 ANÀLISI MICROSCÒPICA I NOMENCLATURA DE LA CITOGENÈTICA CONVENCIONAL

En l'anàlisi citogenètic s'estudien un mínim de 20 metafases de cada cas (objectiu de 100X d'immersió), de les quals cinc es cariotipen i la resta es compten. Per al cariotipatge d'aquest treball ha estat utilitzat el sistema d'anàlisi d'imatges digital Cytovision (Applied Imaging).

Com a criteri per acceptar una alteració com a clonal és necessari que aquesta aparegui en dues metafases en el cas de les alteracions de guany i estructurals i com a mínim en tres metafases en el cas de les monosomies.

En quan a la formulació de les alteracions detectades s'ha utilitzat la nomenclatura descrita a la ISCN de l'any 2005 (Shaffer i Tommerup, 2005).

### 2.2 TÈCNiques D'HIBRIDACIÓ *IN SITU* FLUORESCENT (FISH)

A la tècnica d'hibridació *in situ* amb marcatge directe de les sondes amb fluorescència se l'anomena FISH, de l'anglès *Fluorescence in situ hybridization*. La FISH ens permet detectar i localitzar seqüències específiques d'ADN sobre cèl·lules, cromosomes o teixits.

Aquesta metodologia complementa perfectament la citogenètica convencional en aquells casos en els quals l'anàlisi de bandes és insuficient, ja sigui per la complexitat dels cariotips, per la falta de divisions de la cèl·lula neoplàsica o bé per l'existència de reordenaments cromosòmics subtils.

Cal esmentar la recomanació de treballar en el màxim grau de fosc possible sempre que s'utilitzen sondes marcades fluorescentment per tal d'evitar-ne la degradació dels fluorocroms.

#### Tipus de sondes

Les sondes emprades en aquest treball han estat de diferents tipus:

- Sondes centromèriques: marquen tota la regió centromèrica i permeten identificar i enumerar el cromosoma estudiat.
- Sondes de pintat cromosòmic: constituïdes per una llibreria de sondes que cobreixen tot el cromosoma.

- Sondes específiques de *locus*: marquen regions cromosòmiques molt concretes i poden ser de tres tipus diferents; sondes de fusió, sondes de *break apart* i sondes específiques de *locus*. Totes elles permeten detectar tant alteracions numèriques com estructurals.

Les sondes a més a més poden ser comercials o no comercials. Les sondes comercials utilitzades en aquest treball han estat de les cases Abbot-Vysis<sup>®</sup>, DAKO<sup>®</sup> i Metasystems<sup>®</sup>. Pel que fa a les sondes no comercials, han estat sintetitzades a partir de *Bacterial artificial chromosome* (BAC).

### Tractament amb pepsina

La funció de la pepsina és eliminar la membrana cel·lular i les proteïnes del citoplasma per tal de facilitar l'accés de la sonda al nucli, on és troba l'ADN diana. En molts casos per tal de garantir l'èxit de la tècnica de FISH cal fer un tractament previ amb pepsina. Depenent de la mostra (gangli o suspensió cel·lular) així com de la quantitat de citoplasma/proteïnes d'aquesta s'utilitza un tipus de pepsina o un altre i els temps del tractament són més o menys llargs.

### Rentats de post-hibridació

Aquests rentats serveixen per eliminar l'excés de sonda que pugui quedar i els híbrids imperfectes per tal que no interfereixin en la lectura dels resultats.

### Contratinció

El DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol) és un colorant fluorescent utilitzat en la tècnica de FISH per a la tinció d'ADN i nuclis. El DAPI doncs, permet determinar la posició de les sondes en els nuclis i les metafases híbrides.

### 2.2.1 OBTENCIÓ d'ADN DE *BACTERIAL ARTIFICIAL CHROMOSOME* (BAC) PER A LA SÍNTESI DE SONDES NO COMERCIALS

Per a la síntesi de sondes no comercials, cal obtenir ADN complementari a la regió que es vol estudiar. Aquests fragments d'ADN complementaris a regions cromosòmiques humanes són insertats en plàsmids o directament en l'ADN de bacteris que actuen com a vectors per al seu creixement. En funció de la longitud de l'insert, les clones seràn de BAC, de *plasmid artificial chromosome* (PAC) (100-300 Kb tots dos) o bé de fòsmids (40 Kb).

Les clones bacterianes s'emmagatzemen en les anomenades biblioteques genòmiques, que són un conjunt de clones en les que cadascuna conté un fragment de genoma. Les biblioteques conserven els bacteris liofilitzats a – 80°C. El nostre centre és propietari de la biblioteca de 32000 clones de BAC del *Children's Hospital Oakland Research Institute* (CHORI) (Oakland, CA, USA).

#### REACTIUS I MATERIAL

Agitador a 200 rpm i 37°C  
 Ampolles de vidre d'1 L (Pirex®)  
 Antibiòtic (cloranfenicol)  
 Bec bunsen  
 Clones de BAC liofilitzades  
 Erlenmeiers de 250 mL (Pirex®)  
 Espectrofotòmetre NanoDrop ND-1000 UV-VIS (NanoDrop®)  
 Extracte de llevat (Pronadisa®)  
 Flascons de plàstic de 50 mL (Becton Dickinson®)  
 Glicerol 87% (Merck®)  
 Isopropanol (Merck®)  
 Microcentrífuga refrigerada (Eppendorf®)  
 NaCl (Merck®)  
 Plasmid Midi Kit (Qiagen®)  
 Triptona (Pronadisa®)  
 Tubs d'1'5 mL (Eppendorf®)  
 Tubs de 2 mL (Eppendorf®)  
 Tubs de 15 mL (Sarsted®)

### Medi de cultiu 2xYT

Per treballar amb microorganismes cal mantenir determinades condicions d'esterilitat i per aquest motiu utilitzarem el bec bunsen. Per tal de garantir el creixement exclusiu de les clones seleccionades i evitar la presència de bacteris contaminants, aquestes són dissenyades per a ser resistents a un antibiòtic en concret (el cloranfenicol o la canamicina). En preparar el medi de cultiu ho haurem de tenir en compte per afegir-ne un o altre segons els requeriments de la clona que volguem fer créixer. Per a preparar el medi de cultiu 2xYT es pesen 16 grams de triptona, 10 grams d'extracte de llevat i 5 grams de clorur de sodi (NaCl), i s'enrasa a 1 L amb aigua destil·lada. Un cop tenim el medi esterilitzat s'afegeix l'antibiòtic corresponent.

El cloranfenicol ha de quedar en una concentració final de 20 µg/mL i la canamicina de 25 µg/mL. Un cop afegit l'antibiòtic el medi es conserva a 4°C fins a la seva utilització.

### **Procediment**

#### DIA 1

S'inoculen colònies del BAC a estudiar (provinents de la biblioteca genòmica) en 3 mL de medi 2xYT suplementat amb l'antibiòtic corresponent. Es cultiva durant 20 hores a 37°C i 200 rpm per tal de saturar el medi i assegurar que hi haurà suficient massa microbiana.

#### DIA 2

S'inoculen 500 µL del cultiu crescut en 50 mL de medi 2xYT (proporció 1/10). S'utilitza un erlenmeier de 250 mL per tal de garantir una bona aireació. Es deixa créixer 17-20 hores a 37°C i 200 rpm.

#### DIA 3

A partir d'aquest moment s'utilitzen els tampons i solucions del Plasmid Midi Kit. Abans de començar cal posar els tampons P1 i P3 en gel i el QF en un bany a 65°C.

- a) Es traspasa el medi crescut a un flascó de 50 mL.
- b) Es centrifuga 15 minuts a 4000 rpm i 4°C.
- c) Es descarta el sobrenedant i ressuspèn el pellet en 3 mL de tampó P1.



- d) S'afegeix 3 mL de tampó P2 invertint el flascó 2-3 cops. Incubar 5 minuts a TA.
- e) S'afegeixen 3 mL de tampó P3 fred barrejant per inversió. Incubar en gel durant 10 minuts.
- f) Es centrifuga durant 45 minuts a 4000 rpm i 4°C. Passat aquest temps es recull el sobrenedant en un tub de 50 mL nou i es torna a centrifugar 15 minuts a 4000 rpm i 4°C.
- g) Es rotula i col·loca la columna en un tub de 15 mL. La columna s'equilibra amb 3 mL de solució QBT.
- h) S'afegeix el sobrenedant sobre la columna procurant no fer bombolles i es renta amb 5 mL de solució QC.
- i) Es rotulen tubs nous de 15 mL on es col·loca la columna per tal de recollir l'ADN que hi ha quedat retingut.
- j) S'elueix l'ADN amb 2 mL de tampó QF prèviament escalfat a 65°C.
- k) Es reparteix l'elució en dos tubs de 2 mL rotulats.
- l) Es precipita l'ADN amb 700 µL d'isopropanol. S'inverteix bé i es deixa *overnight* (ON) a -20°C.

#### DIA 4

- a) Es centrifuga durant 45 minuts a 13200 rpm i 4°C.
- b) Es descarta el sobrenedant i es renta el botó amb 100 µL d'etanol al 70% i es torna a centrifugar 10 minuts a 10000 rpm.
- c) Es descarta el sobrenedant i es deixen assecar els tubs a l'aire primer i a l'estufa després durant aproximadament 12 minuts.
- d) Es ressuspèn l'ADN amb 25 µL d'aigua destil·lada preescalfada a 70°C i s'ajunta el material dels dos tubs.
- e) Es quantifica l'ADN al NanoDrop®

Ja tenim l'ADN a punt per a fer-ne el marcatge fluorescent.

## 2.2.2 MARCATGE DIRECTE DE LA SONDA AMB FLUORESCÈNCIA MITJANÇANT *NICK TRANSLATION*

La tècnica de la *nick translation* és una eina de biologia molecular emprada per a l'obtenció d'ADN marcat que posteriorment podrà ser utilitzat com a sonda.

S'anomena així perquè en el procés una *ADN*sa s'encarrega de crear *nicks* (buits) que una *ADN* polimerasa I anirà omplint en sentit 3'→5'. Per fer-ho, elimina els nucleòtids consecutius mitjançant l'activitat exonucleàsica 5'→3' i els va substituint pels seus anàlegs marcats amb fluorescència.

Les sondes sintetitzades podran ser utilitzades tant en hibridacions d'extensions cromosòmiques com de material parafinat.

### REACTIUS I MATERIAL

ADN COT-1 (Roche Diagnostics®)  
 Acetat sòdic (NaAc) 3M (Annex 1)  
 Aigua destil·lada  
 Aigua per injecció 10 mL (Serra Pamies®)  
 Etanol absolut (Panreac®)  
 Micropipetes i puntes  
 Microcentrífuga refrigerada (Eppendorf®)  
*Nick translation kit* (Abbot-Vysis®)  
*Spectrum red* (Abbot-Vysis®)  
*Spectrum green* (Abbot-Vysis®)  
 Termobloc (P-Selecta®)  
 Tubs d'1'5 mL (Eppendorf®)  
 Tubs de 15 mL (Sarstedt®)

El kit de *nick* conté el tampó per a la reacció, l'enzim, la *nuclease-free water* (NFW), i els nucleòtids que són els deoxinucleòtids-trifosfat (dNTP) (adenina, citosina i guanina) i la deoxitimidina-trifosfat (dTTP).

### Preparació de les barreges de nucleòtids

A partir dels vials de nucleòtids que vénen amb el kit, es preparen les barreges necessàries per a la reacció:

Barreja de dNTPs = 10 µL dATP + 10 µL dCTP + 10 µL dGTP

Barreja de dTTPs = 10 µL dTTP + 20 µL NFW

Preparació de les solucions mare dels fluorocroms

Els fluorocroms es troben liofilitzats en els vials comercials de manera que cal ressuspèndre'ls en el que anomenarem solució mare. Al vermell s'hi afegeixen 100  $\mu\text{L}$  de NFW mentre que al verd 50  $\mu\text{L}$  de NFW. La diferència de volum és deguda a que les molècules de fluorocrom vermelles són més grans que les del verd. Un cop ressuspèsos, es preparen les solucions de treball, consistents en 10  $\mu\text{L}$  de solució mare + 40  $\mu\text{L}$  de NFW.

**Procediment**

En primer lloc cal calcular els microlitres d'ADN que es necessita per a tenir-ne aproximadament 1000 ng i adequar la quantitat de NFW per arribar a un volum final de 17'5  $\mu\text{L}$ . Després s'afegeixen els nucleòtids, el tampó, fluorocroms i finalment l'enzim. És recomanable que l'enzim estigui sempre en fred i el mínim temps possible fora del congelador ja que és molt làbil. D'altra banda, per mantenir els fluorocroms en condicions òptimes, se'n preparen alíquotes de 2'5  $\mu\text{L}$ , evitant d'aquesta manera descongelar/congelar cada cop la solució mare.

A la taula 8 hi ha representats els volums necessaris de cadascun d'aquests reactius.

ADN	X $\mu\text{L}$
NFW	17'5-X $\mu\text{L}$
dNTPs	10 $\mu\text{L}$
dTTPs	5 $\mu\text{L}$
Tampó	5 $\mu\text{L}$
Fluorocrom vermell/verd	2'5 $\mu\text{L}$
Enzim	5 $\mu\text{L}$

**Taula 8.** Volums dels reactius necessaris per a la reacció de *nick translation*.

**REACCIÓ DE NICK TRANSLATION**

Un cop afegit l'enzim es posen els tubs en un bany on la temperatura oscil·li entre 15 i 18°C. S'atura la reacció passades tres hores posant-la 10 minuts a 70°C en bany sec.

### PRECIPITACIÓ DE L'ADN MARCAT

S'afegeixen a la reacció 10 µL de COT-1, 10 µL de NaAc 3 M i 250 µL d'etanol al 100% (ben fred). S'inverteix lentament i es deixa precipitant ON a -20°C. És molt important seguir aquest ordre en posar els reactius. La COT-1 s'unirà a les regions marcades de forma inespecífica per a que no interfereixin en la reacció d'hibridació i posteriorment les sals i l'alcohol contribuiran a la precipitació de l'ADN.

### RESSUSPENSÍO DE L'ADN MARCAT

- a) Es centrifuga durant 45 minuts a 13200 rpm i 4°C.
- b) Es descarta el sobrenedant i es renta el botó amb 100 µL d'etanol al 70% i es torna a centrifugar 10 minuts a 10000 rpm.
- c) Es descarta el sobrenedant i es deixen assecar els tubs a l'aire primer i a l'estufa després durant aproximadament 12 minuts.
- d) Es ressuspèn l'ADN amb 10 µL d'aigua destil·lada preescalfada a 70°C.

Ja tenim la sonda a punt per a ser hibridada.

Cal esmentar, que per a les sondes creades a partir de BAC és necessari realitzar hibridacions control sobre metafases per tal de comprovar-ne llur localització.

### 2.2.3 HIBRIDACIÓ *IN SITU* FLUORESCENT PER A SONDES CENTROMÈRIQUES I ESPECÍFIQUES DE *LOCUS* PER A CÈL·LULES EN SUSPENSÍO (CARNOY)

La podem realitzar utilitzant sondes comercials o bé sondes creades per nosaltres a partir de BAC. El tampó d'hibridació és el mateix en tots dos casos, l'única cosa que varia són les sondes.

### REACTIUS I MATERIAL

#### SONDES COMERCIALS

Sondes de la casa Vysis<sup>®</sup> o DAKO<sup>®</sup>  
Tampó d'hibridació (Vysis<sup>®</sup>)

## SONDES DE BAC

BAC marcat amb fluorescència mitjançant *nick translation*  
Tampó d'hibridació (Vysis®)

Bany a 45°C (i a 75°C per hibridació en formamida)  
Cambra humida (hibridació en formamida)  
Cobreobjectes (Menzel-Gläser®)  
Coplins de vidre  
DAPI II (Vysis®)  
Etanol (Panreac®)  
Microcentrífuga refrigerada (Eppendorf®)  
Micropipetes i puntes  
Placa calefactora Hybrite (Vysis®)  
Parafilm®  
Portaobjectes (Menzel-Gläser®)  
Solució de formamida al 50% (Annex 1)  
Solució de formamida al 70% (Annex 1)  
2XSSC (Annex 1)  
2XSSC al 0'1% de NP-40 (Annex 1)  
Tubs d'1'5 mL (Eppendorf®)

### **Procediment**

Es realitzen les extensions cromosòmiques a partir de material conservat en fixador Carnoy obtingut per la tècnica de citogenètica convencional. L'envelliment de les preparacions és ON a TA.

### Sondes comercials

S'embolica un tub d'1'5 mL en paper d'alumini (per a protegir-lo de la llum) per a fer la barreja d'hibridació. Les sondes comercials són molt concentrades, de manera que amb una petita quantitat en tenim prou. La barreja estàndard consta de 3.5 µL de tampó d'hibridació, 1 µL d'aigua destil·lada i 0'5 µL de la sonda. En el cas d'hibridar dues sondes alhora, posariem 3 µL de tampó, 1 µL d'aigua i 0'5 µL de cada sonda. En qualsevol dels casos el volum final és de 5 µL per la qual cosa s'utilitzaran cobreobjectes de 20x20 mm.

### Sondes de BAC

El procediment i volums de tampó i aigua destil·lada són els mateixos que per a les sondes comercials.

## HIBRIDACIÓ EN PLACA CALEFACTORA

Es fa un pols a la barreja d'hibridació i es posa tot el volum sobre un cobreobjectes. Seguidament es deixa caure a sobre la regió del portaobjectes marcada per a hibridar evitant que es formin bombolles. Es segella amb parafilm<sup>®</sup> i es col·loca la lamineta a la placa calefactora seleccionant-ne el programa adequat.

Per a sondes centromèriques o específiques de *locus* la desnaturalització és d'1 minut a 75°C i la hibridació ON a 37°C.

## HIBRIDACIÓ MITJANÇANT FORMAMIDA

Es desnaturalitza la mostra en una solució de formamida al 70% a 74°C durant 5 minuts i seguidament es deshidrata en una sèrie d'etanols al 70%, 80% i 100% freds durant 2 minuts. El xoc tèrmic contribueix a la desnaturalització. Es deixa assecar a l'aire com a mínim 7 minuts ja que l'etanol inhibeix la hibridació.

Pel que fa a la sonda, es fa un pols de centrifuga a la barreja i es desnaturalitza al bany a 74°C durant 5 minuts, en un tub d'1'5 mL protegit de la llum i segellat amb parafilm<sup>®</sup>.

Un cop seca l'extensió, es posa tot el volum de sonda en un cobreobjectes i es deixa caure a sobre la regió del portaobjectes marcada per a hibridar. Es segella amb parafilm<sup>®</sup> i es col·loca la lamineta en una cambra humida a 37°C ON.

## RENTATS DE POST-HIBRIDACIÓ

Els rentats de post-hibridació es realitzen igual per a hibridacions en formamida o en placa calefactora.

Uns 30 minuts abans de començar, es posen tres coplins amb formamida al 50%, un amb 2xSSC i un amb 2xSSC al 0'1% de NP-40 al bany a 45°C.

- a) Es retira el parafilm<sup>®</sup> que segella el cobreobjectes i posem la lamineta dins del primer coplin amb formamida. Es Remena una mica fins que el cobreobjectes es desprèn i es deixa 10 minuts.
- b) Es repeteix dos cops més el rentat de 10 minuts amb formamida al 50%.
- c) Es passa el portaobjectes al coplin amb solució 2xSSC i es deixa 10 minuts.

d) Es fa un últim rentat amb solució 2xSSC/0'1%NP-40 durant 5 minuts.

## CONTRATINCIÓ

Es col·loquen 7  $\mu$ L de DAPI II sobre l'àrea hibridada amb el portaobjectes encara humit. Es cobreix amb un cobreobjectes de 20x20 mm i es mantenen les preparacions a  $-20^{\circ}\text{C}$  i en fosc com a mínim 30 minuts abans d'analitzar-les (el fred fa que augmenti la intensitat de la fluorescència).

## 2.2.4 HIBRIDACIÓ *IN SITU* FLUORESCENT SOBRE TEIXIT PARAFINAT

Per a aplicar la tècnica de la FISH en mostres incloses en parafina es necessiten talls d'uns 2-4 mm de gruix que es munten sobre un portaobjectes silanitzat (DAKO<sup>®</sup>), és a dir carregat positivament, per tal que s'hi adhereixin. Els talls provenen directament d'un bany d'aigua destil·lada i no se'ls afegeix cap additiu. Per tal d'eliminar l'excés de parafina es deixen els portes ON a l'estufa a  $65^{\circ}\text{C}$ .

## REACTIUS I MATERIAL

Aigua destil·lada  
 Bany a  $45^{\circ}\text{C}$   
 Cambra humida  
 Cobreobjectes (Menzel-Gläser<sup>®</sup>)  
 Coplins de vidre  
 DAPI II (Vysis<sup>®</sup>)  
 EDTA (Annex 1)  
 Estufes a  $37^{\circ}\text{C}$  i a  $65^{\circ}\text{C}$   
 Etanol (Panreac<sup>®</sup>)  
 Forn microones  
 Micropipetes i puntes  
 PBS 1X (Annex 1)  
 Placa calefactora Hybrite (Vysis<sup>®</sup>)  
 Pepsina 100 mg/mL (Sigma<sup>®</sup>)  
 Portaobjectes (Menzel-Gläser<sup>®</sup>)  
 Solució de formamida al 50%  
 Tubs d'1'5 mL (Eppendorf<sup>®</sup>)  
 Tubs de 15 mL (Sarstedt<sup>®</sup>)  
 Xilol (BDH Prolabo<sup>®</sup>)  
 2XSSC (Annex 1)  
 2XSSC al 0'1% de NP-40 (Annex 1)

## Procediment

### DESPARAFINAT

S'eliminen les restes de parafina que puguin quedar fent tres rentats de 10 minuts cadascun en xilol. Seguidament s'hidrata la mostra amb una sèrie d'etanols al 100% (2x5 minuts), 80% (5 minuts) i 70% (5 minuts). Per tal de mantenir els portes hidratats es posen en un coplin en aigua destil·lada fins al següent pas.

### TRACTAMENT AMB EDTA

És un tractament per a permeabilitzar les cèl·lules i facilitar l'entrada de la sonda. L'EDTA és un quelant que elimina les unions covalents de la fixació. Es col·loquen els portes en un recipient amb tampó EDTA i s'incuben al forn microones en tres tandes de 7 minuts, 5 minuts i 7 minuts, evitant sempre que arribi a bullir. El temps mig per a que l'EDTA es refredi és aproximadament de 40 minuts.

### TRACTAMENT AMB PEPSINA

La solució de pepsina està constituïda per 10 mL d'aigua destil·lada, 100 µL de HCl 1M i 5 µL de pepsina. Es prepara sempre just abans d'utilitzar-la per evitar que aquesta última es degradi. Abans de començar cal preparar la solució d'aturada de la reacció (50 mL PBS 1X + 2'5 mL MgCl<sub>2</sub> 1M) (Annex 1).

- a) Es col·loquen 40 µL de la solució de pepsina sobre el tall i es cobreix sense fer bombolles amb un cobreobjectes de 24x40 mm o 24x24 mm depenent del tamany de la mostra.
- b) S'incuba la lamineta 30 minuts a 37°C en cambra humida (prèviament preescalfada).
- c) Es posa la mostra en un coplin amb solució d'aturada retirant el cobreobjectes sense arrossegar i es deixa 5 minuts.
- d) Es renta remenant una mica en un coplin amb aigua destil·lada i es deixa assecar.



Amb l'ajut d'un microscopi invertit es determina la qualitat de la digestió. Puntualment es pot allargar la digestió fins a 15 minuts més si el resultat no ha estat bo. En aquests casos es tornaria a posar pepsina, incubar i aturar.

## HIBRIDACIÓ

Per a hibridar s'utilitza la placa calefactora i es fan les barrejes de sondes de la mateixa manera que per a una FISH de cèl·lules en suspensió. En cas que el gruix o tamany del tall sigui molt gran es preparen 10  $\mu$ L de la barreja de sonda en comptes de 5  $\mu$ L (mantenint les proporcions de tampó, sonda i aigua).

Per a les hibridacions sobre material parafinat el programa adequat és de 80°C durant 5 minuts i ON a 37°C.

## RENTATS DE POST-HIBRIDACIÓ

Els rentats de post-hibridació es realitzen de la mateixa manera que per a les hibridacions sobre cèl·lules en suspensió.

## CONTRATINCIÓ

Es col·loquen 20  $\mu$ L de DAPI II sobre l'àrea hibridada amb el portaobjectes encara humit. Es cobreix amb un cobreobjectes de 24x40 mm i es mantenen les preparacions a -20°C i en foscor com a mínim 30 minuts abans d'analitzar-les.

## 2.2.5 HIBRIDACIÓ *IN SITU* FLUORESCENT PER A SONDES DE PINTAT CROMOSÒMIC

Es tracta d'un protocol d'hibridació en formamida.

## REACTIUS I MATERIAL

Bany a 75°C i a 45°C  
Cambra humida  
Cobreobjectes (Menzel-Gläser®)  
Coplins de vidre  
DAPI II (Vysis®)  
Estufa a 37°C  
Micropipetes i puntes  
Parafilm®

Portaobjectes (Menzel-Gläser®)  
Solució de formamida al 50% (Annex 1)  
Solució de formamida al 70% (Annex 1)  
Sondes de pintat cromosòmic (MetaSystems®)  
Tubs d'1'5 mL (Eppendorf®)  
2XSSC (Annex 1)  
2XSSC al 0'1% de NP-40 (Annex 1)

## **Procediment**

### **DESNATURALITZACIÓ DE LA SONDA**

S'agafa la quantitat de sonda necessària (10 µL per a un cobreobjectes de 22x22 mm i 7µL si aquest és de 18x18 mm) i es posa en un tub d'1'5 mL protegit de la llum i segellat amb parafilm®. Es desnaturalitza durant 5 minuts a 75°C i posteriorment es deixa 30 minuts a l'estufa a 37°C.

### **DESNATURALITZACIÓ CROMOSÒMICA**

Es desnaturalitza la mostra en una solució de formamida al 70% durant 3 minuts a 70°C. Seguidament es deshidrata en una sèrie creixent d'etanols 70%, 90% i 100% (3 minuts cadascun) i es deixa assecar a l'aire com a mínim 10 minuts abans d'hibridar.

### **HIBRIDACIÓ**

Es posa tot el volum de sonda sobre el cobreobjectes adequat i es deixa caure a sobre la regió del portaobjectes marcada per a hibridar. Es segella amb parafilm® i es col·loca la lamineta dins d'una cambra humida precalentada deixant-la ON a 37°C.

### **RENTATS DE POST-HIBRIDACIÓ I CONTRATINCIÓ**

Els rentats de post-hibridació i la contratinció es realitzen de la mateixa manera que per a les hibridacions sobre cèl·lules en suspensió.

### 2.2.6 CARIOTIPAT ESPECTRAL (*SPECTRAL KARYOTYPING, SKY*)

La tècnica de FISH permet la hibridació simultània sobre regions genòmiques específiques de moltes sondes, sempre i quan aquestes estiguin marcades amb diferents fluorocroms. El cariotipat espectral o SKY és el resultat de l'aplicació de la tècnica de FISH a l'estudi dels cariotips.

La sonda del kit SKYPaint™ (Applied Spectral Imaging) està composta per una col·lecció de sondes, cadascuna de les quals és complementària a una única regió cromosòmica.

Aquestes sondes estan marcades amb una combinació de fluorocroms específica que confereix un color cromosòmic característic a cada parell de cromosomes autosòmics i el parell de cromosomes sexuals.

Per aplicar la tècnica de l'SKY és molt important obtenir metafases de bona qualitat i que les extensions cromosòmiques estiguin ben escampades, per tal d'evitar el solapament de sondes i possibles confusions en el moment de la interpretació.

#### REACTIUS I MATERIAL

Aigua destil·lada  
 Banys a 37°C, a 80°C i a 45°C  
 Cambra humida  
 Cobreobjectes (Menzel-Gläser®)  
 Coplins de vidre  
 Estoc de pepsina 10% (100 mg/mL) (Annex 1)  
 Estufes a 37°C i a 65°C  
 Etanol absolut (Panreac®)  
 HCl 1M (BDH Prolabo®)  
 MgCl<sub>2</sub> (Annex 1)  
 Micropipetes i puntes  
 Microcentrífuga refrigerada (Eppendorf®)  
 NP-40 (Sigma®)  
 Parafilm®  
 PBS 1X (Annex 1)  
 PBS 1X/MgCl<sub>2</sub> (Annex 1)  
 Pepsina cristal·lina (Sigma® P-6887, activitat 3200-4500 unitats/mg proteïna)  
 Portaobjectes (Menzel-Gläser®)  
 SKYPaint™ Kit (Applied Spectral Imaging)  
 Solucions al 70% i 50% de Formamida (Merck®) (Annex 1)  
 Solució de HCl (Annex 1)  
 Solució de rentat II (1xSSC) (Annex 1)  
 Solució de rentat III (4xSSC/0,1% NP-40) (Annex 1)

Tubs d'1'5 mL (Eppendorf®)  
20XSSC (Annex 1)

## **Procediment**

DIA 1

Es fa l'extensió cromosòmica de la mostra comprovant al microscopi invertit la seva qualitat. És molt important valorar la quantitat de citoplasma present, ja que depenent d'aquest els rentats amb pepsina seran més o menys llargs. Es deixa envellir la mostra ON a 65°C.

DIA 2

### Tractament amb pepsina

S'ha de tenir a punt un coplin amb la solució de HCl a 37°C. S'afegeixen 10 µL de pepsina just abans de posar la mostra.

- a) Es submergeix el porta uns 10-15 segons, depenent de la netedat de l'extensió (valoració del dia anterior).
- b) Es treu el porta de la solució de clorhídric i es posa durant cinc minuts en un coplin amb PBS 1X a TA.
- c) Es repeteix el rentat amb PBS 1X 5 minuts més.
- d) Es renta amb PBS 1X/MgCl<sub>2</sub> 5 minuts.
- e) Es renta amb PBS 1X 5 minuts.
- f) Es deshidrata la lamineta: etanol 70%, 80% i 100% (2 minuts cadascun).

Es deixa el porta inclinat assecant a l'aire.

### Desnaturalització de la sonda

Cal tenir preparat un bany a 80°C.

- a) Es fa un pols al vial 1 (sonda) del kit SKYPaint™. Es forma un precipitat vermell al fons que es ressuspèn amb l'ajut d'una pipeta.
- b) Es prenen 7'5 µL i es passen a un tub d'1'5 mL. Es segella amb parafilm® (per evitar evaporacions) i es protegeix de la llum amb paper d'alumini.
- c) Es submergeix el tub en el bany a 80°C durant 7 minuts i després es passa a l'estufa de 37°C on estarà 60 minuts.

S'aprofiten aquests 60 minuts per fer la desnaturalització cromosòmica.

### Desnaturalització cromosòmica

Es posa la formamida al 70% en un bany a 75°C (és necessària com a mínim mitja hora per a que el cople arribi a aquesta temperatura).

- a) Es submergeix el porta en la solució desnaturalitzant durant 1 minut.
- b) Immediatament es posa la lamineta en un cople amb etanol al 70% tot just tret del congelador (és important que estigui molt fred per a que hi hagi xoc tèrmic) i es deixa 2 minuts.
- c) Etanol al 80% fred 2 minuts.
- d) Etanol al 100% fred 2 minuts.

Es deixa el porta inclinat assecant a l'aire com a mínim 10 minuts, ja que l'etanol inhibeix la hibridació.

### Hibridació

Es posa la sonda sobre un cobreobjectes de 24x24 mm i es cobreix amb la regió de l'extensió marcada per hibridar evitant la formació de bombolles. S'embolica el portaobjectes amb parafilm® i es col·loca en una cambra humida boca avall. Es deixa la cambra dos dies a l'estufa a 37°C.

### DIA 3

Es comprova que la cambra estigui suficientment humida.

### DIA 4

En tots els tractaments que es faràn a partir d'aquest moment el portaobjectes haurà d'estar sempre humit i protegit de llum directa. Mitja hora abans de començar es posen les solucions de rentat en un bany a 45°C.

- a) Es submergeix el portaobjectes en el primer cople amb solució de formamida al 50% (solució de rentat I), procurant que se'n desprengui el cobreobjectes. Un cop després es deixa 5 minuts.
- b) Es fan dos rentats més de 5 minuts cadascun amb solució I.
- c) Es submergeix el porta en la solució de rentat II i es fan dos rentats de 5 minuts cadascun.

- d) 2 minuts en la solució de rentat III.
- e) S'apliquen 80 µL del reactiu de bloqueig (vial 2 del kit). Es cobreix amb un cobreobjectes fet amb parafilm<sup>®</sup> i es deixa incubar 30 minuts en cambra humida a 37°C. Un cop passat aquest temps s'inclina el portaobjectes per tal que s'eixugui i s'hi afegeixen 80 µL de tampó I (vial 3 del kit).
- f) Es posa de nou un cobreobjectes de parafilm<sup>®</sup> i s'incuba a 37°C en cambra humida durant 45 minuts.
- g) Es renta durant 3 minuts el portaobjectes en solució de rentat III a 45°C.
- h) Es fan dos rentats més de 3 minuts en solució III.

En acabar amb aquests rentats es buiden els coplins i s'hi posa solució de rentat III nova per als rentats posteriors.

- i) S'apliquen 80 µL del tampó II (vial 4 del kit). Es cobreix de nou amb parafilm<sup>®</sup> i s'incuba un altre cop 45 minuts en cambra humida a 37°C.
- j) Tres rentats de 3 minuts cadascun amb solució de rentat III.
- k) Es fa un breu rentat del portaobjectes amb aigua destil·lada.

### Contratinció

S'apliquen 20 µL de DAPI II (vial 5 del kit) sobre un cobreobjectes de 24x60 mm i es deixa caure a sobre la regió del portaobjectes hibridada prenent compte que no s'hi formin bombolles. La preparació es deixa com a mínim 30 minuts a -20°C abans d'analitzar-la al microscopi.

### Notes

→ El quart dia, s'utilitzen cobreobjectes de plàstic per evitar fer malbé la mostra cada vegada que es retiren.

→ Tot i que el kit SKYPaint<sup>™</sup> es conserva a 4-6°C, la nostra experiència ha posat de manifest que el vial 5 (DAPI II) és millor guardar-lo a -20°C, ja que guanya en intensitat.

## 2.2.7 CRITERIS DE VALORACIÓ DE LA HIBRIDACIÓ *IN SITU* FLUORESCENT I ESTABLIMENT DELS NIVELLS DE TALL PER A CADA TIPUS DE SONDA

El valor de tall d'una alteració es defineix com el número mínim de senyals alterades que cal detectar per a que es consideri que la mostra té un resultat diferent al control.

El nivell de tall per a cada tipus de sonda s'estableix en posar a punt la tècnica al laboratori. S'analitzen 10 mostres de sang perifèrica (per als estudis de cèl·lules en suspensió) i cinc amígdals (per als estudis de teixit inclòs en parafina) de persones no diagnosticades de neoplàsies hematològiques i que no presentin cap tipus d'alteració. Per a determinar el número de falsos positius inherents a la tècnica s'estudien un mínim de 500 nuclis per mostra. Les taules 9 i 10 representen els punts de tall de les sondes utilitzades en aquest treball, comercials i de BAC respectivament.

En una mostra es considera valor crític aquell que es troba pròxim al punt de tall ( $\pm 2$ ). En aquests casos s'analitzen un número major de nuclis fins a poder discriminar entre el valor del nivell de tall i el de la mostra.

Tipus de sonda	Cèl·lules a analitzar	Nivells de tall
Centromèrica	500	Monosomies >10% Trisomies >5%
Específica de <i>locus</i>	100	Delecions >10% Guany >5% Reordenament >1%
Pintat cromosòmic	10	Mínim dues metafases amb la mateixa alteració

**Taula 9.** Nivells de tall establerts per a les sondes d'hibridació *in situ* fluorescent comercials. En el cas de les sondes comercials, els nivells de tall són els mateixos tant per als estudis de cèl·lules en suspensió com per als estudis de material inclòs en parafina.

Tipus de sonda	Cèl·lules a analitzar	Nivells de tall
<i>FOXP1</i> ( <i>break apart</i> )	200	<u>Cèl·lules en suspensió</u> -reordenament >1% -guanys>3% -pèrdues>10%  <u>Material inclòs en parafina</u> -reordenament >2% -guanys >10% -pèrdues >54%
<i>CDK6</i> ( <i>break apart</i> )	200	<u>Cèl·lules en suspensió</u> -reordenament >1%

**Taula 10.** Nivells de tall establerts per a les sondes d'hibridació *in situ* fluorescent dissenyades a partir de BAC.

### 2.3 TÈCNiques D'IMMUNOHISTOQUÍMICA

La immunohistoquímica (IHQ) és una tècnica basada en l'ús d'anticossos específics, monoclonals i policlonals, per a detectar marcadors antigènics característics de diferents línies de diferenciació i funció cel·lular.

L'anticòs es marca mitjançant un enllaç químic amb un enzim que el transforma en un substrat visible sense afectar la capacitat de l'anticòs per formar el complex amb l'antigen. Els enzims més utilitzats són la peroxidasa i la fosfatasa alcalina, i el substrat més habitual és la 5'- 3' diaminobenzidina (DAB).

Els enzims poden conjugar-se directament amb l'anticòs o bé mitjançant altres substàncies com complexos, altres anticossos (secundaris) o polímers.

Les tècniques d'IHQ permeten una localització precisa de les reaccions antigen-anticòs, ja que la tinció és permanent, estable, es pot contrastar i pot ser evaluada amb un microscopi òptic.



## REACTIUS I MATERIAL

*Bond ER1 Buffer Solution* (Vision Biosystems, Mount Waverly, Australia)

*Bond Refine Polymer* (Vision Biosystems, Mount Waverly, Australia)

5'-3' Diaminobenzidina (DAB)

Etanol absolut

FOXP1, Clona JC12 (Cedit per la Dra. Alison Banham, Nuffield Department of Clinical Laboratory Sciences, University of Oxford, John Radcliffe Hospital, Oxford, United Kingdom)

Hematoxilina de Harris

Immunotenyidor automàtic (Bond Max, Vision Biosystems, Mount Waverly, Australia)

Portaobjectes silanitzats

Tampó de rentat

Xilol

## Procediment

Sobre talls procedents de teixit parafinat es realitza una IHQ automatitzada seguint el següent protocol:

- a) Desparafinació de les mostres.
- b) Recuperació antigènica per calor amb *Bond ER1 Buffer Solution* durant 20 minuts.
- c) Incubació amb FOXP1 diluït a 1:80 durant 30 minuts.
- d) Incubació amb *Bond Refine Polymer* durant 30 minuts.
- e) Revelat amb DAB durant 10 minuts.
- f) Contratació amb Hematoxilina de Harris.

Al final de cada pas es realitzen rentats amb tampó de rentat.

## Criteris de valoració

Es consideren com a positius (diferents a la mostra control) aquells casos que presenten més del 30% de cèl·lules atípiques positives. D'altra banda, la intensitat de FOXP1 es classifica com a dèbil, moderada o intensa.

Aquesta tècnica ha estat realitzada en col·laboració amb el Servei de Patologia de l'Hospital Clínic i Provincial de Barcelona.



## **IV RESULTATS**



## **1.PRIMER TREBALL**

### LA TRANSLOCACIÓ t(9;14)(p13;q32) EN CASOS DE LIMFOMA DE LA ZONA MARGINAL ESPLÈNICA

#### **1.1 INTRODUCCIÓ**

La translocació t(9;14)(p13;q32) implicant els gens *PAX-5/IGH* va ser descrita inicialment en els LLP i d'altres LNH amb diferenciació plasmacitoide (Offit i col., 1992). Aquesta hipòtesi va ser descartada per estudis posteriors (Cook i col., 2004) i diferents treballs realitzats en LLP, LZM i limfomes limfocítics suggerien que es tracta d'una alteració poc freqüent en les SLP-B de baix grau (Tracy i col., 2005). Els treballs de Poppe i col·laboradors (2005) van corroborar que aquesta translocació no es troba restringida a un determinat subtipus morfològic com el LLP, però en canvi trobaven una relació entre la seva presència i situacions de malaltia avançada amb pronòstic advers.

Pel que fa als LZME, únicament s'ha descrit un cas associat a una translocació complexa t(2;9;14)(p12;p13;q32) (Morrison i col., 1998). Cal recordar, que els estudis cromosòmics en LZME posen de manifest una alta incidència de delecions de 7q així com guanys de 3q i per contra una baixa freqüència de translocacions implicant el *locus* de les *IGH*. Aquest fet, juntament amb la poca incidència de la t(9;14)(p13;q32) en SLP-B de baix grau, explicaria els pocs casos de LZME en els que aquesta alteració ha estat descrita.

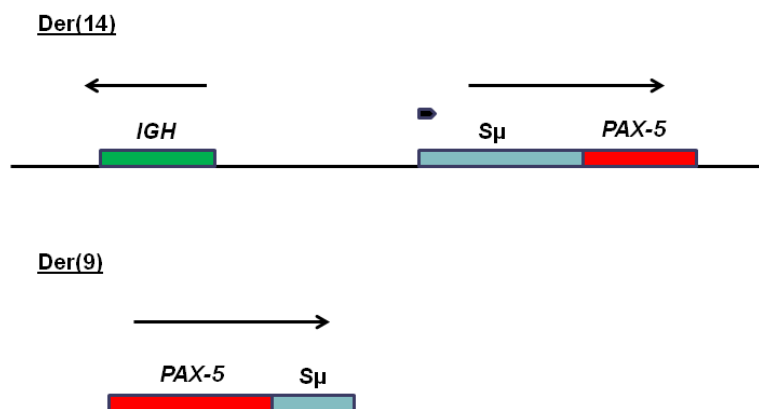
##### **1.1.1 El gen *PAX-5***

*PAX-5* (*Paired box 5*) és un gen que codifica per al factor de transcripció BSAP, que s'expressa en els estadis primerencs de la limfopoiesi de les cèl·lules B i es regula a la baixa a les fases finals de diferenciació a cèl·lula plasmàtica. Es tracta doncs d'un gen que s'expressa al llarg del cicle cel·lular i que és necessari per a l'evolució més enllà del progenitor de cèl·lula B (Ohno i col., 2000).

La disregulació del gen *PAX-5* interfereix directament via BSAP en el desenvolupament de les cèl·lules B madures, impedit que entrin en estat quiescent i afavorint d'aquesta manera la limfomagènesi.

### 1.1.2 t(9;14)(p13;q32)

Com a conseqüència d'aquesta translocació, *PAX-5* es troba sobreexpressat per trobar-se juxtaposat amb el promotor del gen *IGH*. Mentre que en condicions normals *PAX-5* es troba inactivat en la diferenciació tardana de les cèl·lules B, l'expressió d'*IGH* és molt activa en aquesta fase de diferenciació plasmàtica. És per això que la unitat transcripcional generada per la t(9;14)(p13;q32) interfereix en la inactivació de *PAX-5* i contribueix a la limfomagènesi. Els cromosomes derivatius resultants d'aquest reordenament es troben representats a la figura 17.



**Figura 17.** Noves unitats transcripcionals degudes a la t(9;14)(p13;q32).

## 1.2 OBJECTIU

L'objectiu d'aquest treball va ser la descripció de les característiques de tres pacients diagnosticats de LZME que presentaven la translocació t(9;14)(p13;q32) així com determinar la implicació dels gens *PAX-5/IGH* en aquesta patologia.

## 1.3 PACIENTS I MÈTODES

### 1.3.1 Pacients

Es van estudiar tres pacients amb cariotip complex en els quals el seu estudi mitjançant cariotipat espectral va suggerir la presència d'una translocació t(9;14)(p13;q32). Es tractava de tres dones amb una mitjana d'edat de 71 anys i llurs característiques clíniques i citogenètiques (SKY) es troben representades a les taules 11 i 12 respectivament.

Cas	Edat sexe	EMG	Infiltració MO	Immunofenotip (teixit)	Histologia
1	69 D	Si (SD pes)	No	CD10-, CD20+, CD79b-, CD5-, CD23+, CiclinaD1- (SP)	Sense dades
2	73 D	Si (500 g)	Si	CD10-, CD20+, CD79b+, CD5-, IgD+, P53-, CiclinaD1- (MO)	LZME patró difús
3	73 D	Si (2279 g)	Si	CD10-, CD20+, CD79a+, CD43-, IgD+, IgM+, CD5-, CD23-, P53-, Ciclina D1- (MO)	LZME patró difús

**Taula 11.** Característiques clíniques dels tres pacients diagnosticats de LZME amb t(9;14)(p13;q32).

D: dona; EMG: Esplenomegàlia; MO: medul·la òssia; SD: Sense dades; SP: Sang perifèrica.

Cas	Cariotip espectral (a partir de SP o MO)
1	46-49,XX,+3,der(3)t(3;22)(p11;q11),der(6)t(1;6)(q10;q27),del(7)(q32), der(11)t(6;11)(?;q23),t(9;14)(p13;q32),-22,+mar(2),+mar(9),+mar(11)[cp5] (SP)
2	47-49,X,-X,+3,der(3)t(3;8)(8pter?8p11::3p11?3qter),+7, der(8)t(3;8)(3?q::8p11?8q22::3?q),t(9;14)(p13;q23),t(14;19)(q32;q13),-21, +mar(11),+r(1)[cp4] (MO)
3	46-49,XX,dup(1)(q22q32),t(2;16)(?;q22),+4,del(4)(p11),del(4)(p11),+7, del(9)(p21),der(9)t(9;14)(9pter?9p13::14q32?14q11::9p13?9qter),,+mar(?4)[cp3] (SP)

**Taula 12.** Característiques citogenètiques (mitjançant SKY) dels tres pacients diagnosticats de LZME amb t(9;14)(p13;q32). MO: Medul·la òssia; SP: Sang perifèrica.

### 1.3.2 Mètodes

Per tal de confirmar els resultats obtinguts per SKY es va aplicar la tècnica de FISH utilitzant sondes de *break apart* comercials sobre mostres de sang perifèrica, medul·la òssia i melsa (teixit inclòs en parafina). Les sondes utilitzades van ser PAX-5 de Dako Diagnostics, IGH d'Abbot-Vysis i en el pacient 2 a més a més, la sonda BCL3 de Dako Diagnostics. El nivell de tall de les sondes es va establir en un >1% per a la translocació, després de la seva evaluació en mostres de sang perifèrica i amígdala de cinc donants sans.

En l'estudi sobre cèl·lules en suspensió dels pacients van ser analitzats un mínim de 200 nuclis de cada mostra.



## 1.4 RESULTATS

Els resultats obtinguts mitjançant els estudis per FISH es mostren a la taula 13. Vam confirmar la presència de la t(9;14)(p13;q32) en detectar trencament de la sonda de *PAX-5* i de la sonda d'*IGH* en una proporció similar de nuclis de cada mostra (requisit indispensable en el cas d'una translocació recíproca).

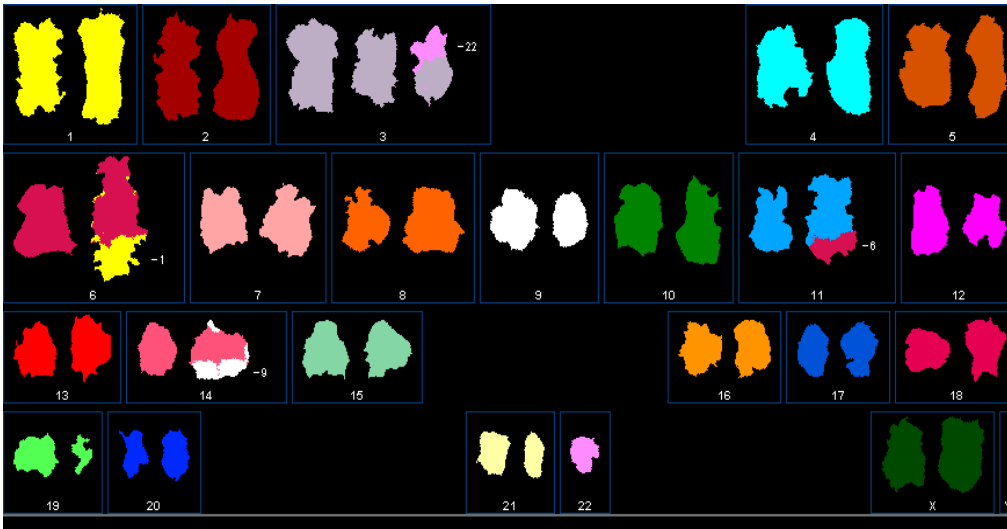
En el cas 2 a més a més, també es va confirmar la translocació recíproca t(14;19)(q32;q13).

Cas	Alteració	Teixit	Sonda	Resultats i comentaris
1	t(9;14)(p13;q32)	SP	<i>PAX-5</i> i <i>IGH</i>	translocació recíproca t(9;14)(p13;q32)
2	t(9;14)(p13;q32) t(14;19)(q32;q13)	MO MO Melsa	<i>PAX-5</i> i <i>IGH</i> <i>BCL3</i> i <i>IGH</i> <i>PAX-5</i> i <i>IGH</i>	translocació recíproca t(9;14)(p13;q32) translocació recíproca t(14;19)(q32;q13)
3	t(9;14)(p13;q32)	SP Melsa	<i>PAX-5</i> i <i>IGH</i>	translocació recíproca t(9;14)(p13;q32)

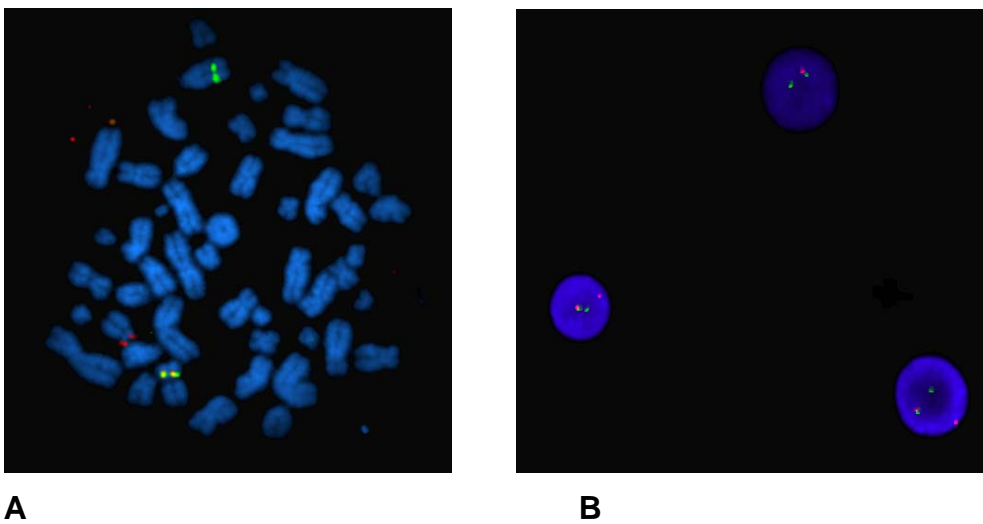
**Taula 13.** Resultats dels estudis per FISH de la t(9;14)(p13;q32) i la t(14;19)(q32;q13).

SP: Sang perifèrica; MO: Medul·la òssia.

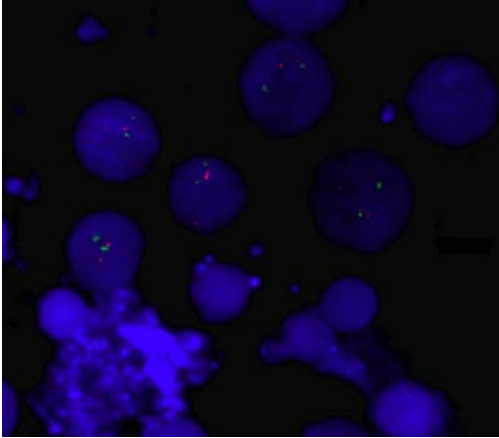
Les Figures 18, 19 i 20 són imatges explicatives dels resultats obtinguts en aquest treball.



**Figura 18.** SKY del cas 1 com a imatge representativa de la possible  $t(9;14)(p13;q32)$ .



**Figura 19.** A) Reordenament de *PAX-5* al cromosoma derivatiu 14 (cas 2). B) El reordenament d'*IGH* confirma la translocació recíproca  $t(9;14)(p13;q32)$  (cas 3).



**Figura 20.** El senyal de trencament de *BCL3* confirma la implicació d'aquest gen en la t(14;19)(q32;q13).

En aquests tres casos les anomalies cromosòmiques més freqüents a part de la t(9;14)(p13;q32) (i la t(14;19)(q32;q13) en el cas 2) van ser la implicació dels cromosomes 1 (en forma de duplicacions o guanys) i les trisomies 3 i 7 (en 2/3 casos).

## **2.SEGON TREBALL**

### DETECCIÓ DE NOVES ALTERACIONS CROMOSÒMIQUES MITJANÇANT CARIOTIPAT ESPECTRAL EN UNA SÈRIE DE 23 PACIENTS DIAGNOSTICATS DE LIMFOMA DE LA ZONA MARGINAL ESPLÈNICA

#### **2.1 INTRODUCCIÓ**

El LZME és una entitat diagnòstica independent amb característiques morfològiques, histològiques i immunofenotípiques ben descrites per la OMS tot i presentar similituts amb altres limfomes de cèl·lula B petita. Degut a això, les alteracions citogenètiques representen per a molts tipus de LNH una eina imprescindible en el diagnòstic diferencial. Tanmateix, els LZME constitueixen un grup citogenèticament heterogeni, on en molts casos els cariotips acostumen a ser complexes, de manera que la determinació de marcadors específics per a aquesta entitat és difícil. Així i tot, existeixen alteracions recurrents com les delecions a 7q i els guanys de 3q. Els estudis citogenètics previs assenyalen com a cromosomes més freqüentment implicats en aquesta patologia el 1, 3, 6, 7, 8 i 14 (Oscier i col., 1993, Dierlamm i col., 1996, Solé i col., 1997, Troussard i col., 1998, Dierlamm i col., 2000c, Hernández i col., 2001, Solé i col., 2001, Aamot i col., 2005). Pel que fa a les translocacions implicant el *loci* de les Ig a 14q32 no s'han descrit gaires casos de LZME, tot i tractar-se d'alteracions freqüents en els limfomes de cèl·lula B (Solé i col., 2000).

Els estudis per FISH permeten afinar els resultats obtinguts per citogenètica convencional, ajudant a determinar els mecanismes implicats en la patologia dels LZME (Solé i col., 2001). En aquest sentit, la tècnica de l'SKY és una tècnica de FISH multicolor que permet identificar cada cromosoma d'un color diferent. Aquesta tècnica és molt útil per a definir alteracions cromosòmiques en casos amb cariotips complexes o cromosomes marcadors (Schröck i col., 1996).

## **2.2 OBJECTIU**

L'objectiu d'aquest treball va ser analitzar una sèrie àmplia de LZME mitjançant la tècnica de l'SKY per tal de definir alteracions recurrents que ens fossin útils en l'establiment d'un marcador genètic específic per aquesta patologia.

## **2.3 PACIENTS I MÈTODES**

### **2.3.1 Pacients**

Els 23 pacients estudiats van ser seleccionats d'una sèrie de 160 casos diagnosticats de LZME, en funció de que presentessin un cariotip complex amb un número de metafases suficientment elevat per analitzar. Disposavem de mostres de 12 homes i 11 dones (no existia predominància de sexe) amb una mitjana d'edat de 72 anys. Els teixits utilitzats van ser 16 mostres de sang perifèrica, sis de medul·la òssia i una de melsa. En aquells pacients en el quals l'anàlisi de l'esplenectomia no va ser possible, el diagnòstic es va dur a terme mitjançant els estudis morfològics i immunofenotípics de la sang perifèrica (Taula 14).

Cas	Edat/Sexe	EMG/ENC	Immunofenotip	Implicació MO	Teixits analitzats per SKY
1	89/H	SI/NO	CD20+, CD5-, CD10-, CD79b-	SD	SP
2	59/D	SI/SI	CD20+, CD5-, CD10-, CD79b+	SI	Melsa
3	69/D	SI/NO	CD20+, CD5-, CD10-, CD79b-	SI	SP
4	74/D	SI/SI	CD20+, CD5+, CD10-, CD79b+	SI	SP
5	74/D	SI/SI	CD20+, CD5+, CD10-, CD79b+	SD	SP
6	77/D	NO/NO	CD20+, CD5+, CD10-, CD79b+	SI	SP
7	59/H	SI/SI	CD20+, CD5-, CD10-, CD79b+	SI	MO
8	46/D	SI/SI	CD19+, CD5-, CD10-, CD79b+	SI	MO
9	81/H	SI/SI	CD20+, CD5-, CD10-, CD79b+	SI	SP
10	77/D	NO/NO	CD20+, CD5-, CD10-, CD79b+	SI	MO
11	73/D	SI/SI	CD20+, CD5-, CD10-, CD79b+	SI	SP
12	58/D	SI/SI	CD20+, CD5-, CD10-	SI	SP
13	75/D	SI/SI	CD20+, CD5-, CD10-, CD79b+	SI	MO
14	75/H	NO/NO	CD20+, CD5-, CD10-, CD79b+	SI	SP
15	55/H	SI/SI	CD20+, CD5-, CD10-, CD79b+	SI	SP
16	81/D	SI/NO	CD20+, CD5-, CD10-, CD79b+	SI	MO
17	60/H	NO/NO	CD22+, CD5-, CD10+/-, CD79b+	SI	SP
18	80/H	NO/NO	CD20+, CD5-, CD10-, CD79b+	SI	SP
19	85/H	NO/NO	CD20+, CD5-, CD10-, CD79b+	SD	SP
20	79/H	NO/NO	CD20+, CD5-, CD10-, CD79b-	SI	SP
21	84/H	NO/NO	CD20+, CD5+, CD10-, CD79b+	SI	SP
22	66/H	SI/SI	CD20+, CD5+, CD10-	SI	MO
23	84/H	SI/NO	CD20+, CD5+(56%), CD10-, CD79b+	SD	SP

**Taula 14.** Característiques clíniques i de laboratori dels 23 pacients amb LZME al moment del diagnòstic.

H: Home; D: Dona, EMG: Esplenomegalia; ENC: Esplenectomia; SD: Sense dades, SP: Sang perifèrica, MO: Medul·la òssia.

### 2.3.2 Mètodes

#### CITOGENÈTICA CONVENCIONAL

Els estudis per citogenètica convencional es van realitzar al moment del diagnòstic segons els protocols estàndart per a mostres de sang perifèrica, medul·la òssia i melsa. Es van estudiar un mínim de 20 metafases per cada cas i els cariotips es van descriure seguint la nomenclatura de la ISCN (Shaffer i Tommerup, 2005).

#### CAROTIPAT ESPECTRAL

El protocol de l'SKY per a la realització de l'estudi citogenètic es va dur a terme amb l'objectiu d'obtenir una imatge espectral idònia. El número de metafases analitzades va ascendir com a mínim a quinze per cas i les alteracions estructurals van ser acceptades només si es detectaven mínimament en dues metafases. De la mateixa manera que per a la citogenètica convencional els cariotips van ser descrits seguint les guies de la ISCN (Shaffer i Tommerup, 2005).

#### HIBRIDACIÓ *IN SITU* FLUORESCENT

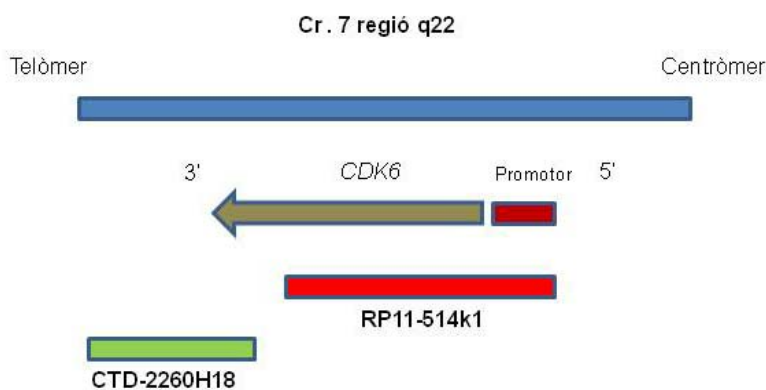
Per tal de verificar la implicació de gens coneguts en els reordenaments amb punts de trencament on es troben, es van dur a terme estudis de FISH utilitzant les següents sondes comercials:

- |   |                     |   |                  |
|---|---------------------|---|------------------|
| - | <i>BCL6</i> a 3q27  | } | Abbott-Vysis     |
| - | <i>MYC</i> a 8q24   |   |                  |
| - | <i>RB1</i> a 13q14  |   |                  |
| - | <i>IGH</i> a 14q32  |   |                  |
| - | <i>TP53</i> a 17p13 |   |                  |
| - | <i>BCL3</i> a 19q13 | } | Dako Diagnostics |
| - | <i>IGK</i> a 2p12   |   |                  |
| - | <i>PAX-5</i> a 9p13 |   |                  |

Per a confirmar la presència d'un isocromosoma 17q es va utilitzar la sonda de pintat cromosòmic del cromosoma 17 de MetaSystems.

A més a més, vam dissenyar una sonda no comercial de *break apart* per tal de confirmar la implicació del gen *CDK6* a la regió 7q22 d'un pacient (Figura 21). Els BAC es van seleccionar del CHORI BACPAC *resource center* (<http://bacpac.chori.org/>) i la sonda consta de dues clones (a 3' i 5' del gen) marcades amb fluorescència verda i vermella mitjançant la tècnica de *nick translation*. Aquesta sonda és capaç de detectar tots els reordenaments del gen ja que els punts de trencament descrits es troben a 3,6 Kb *Upstream* de l'inici de transcripció. El nivell de tall per a la detecció del reordenament va establir-se en >1% després de la valoració de 200 nuclis de sang perifèrica de 10 donants sans.

La tècnica de FISH es va realitzar sobre cèl·lules fixades en Carnoy (mostres de sang perifèrica i medul·la òssia) i en material parafinat (melsa). Es van analitzar un mínim de 200 nuclis i 5 metafases (a excepció de la parafina) per cas. Els nivells de tall utilitzats van ser els establerts per a les sondes de tipus comercial (veure material i mètodes).



**Figura 21.** Esquema dels BAC escollits per a la elaboració de la sonda del gen *CDK6*. El BAC situat a 3' va ser marcat en verd i el situat a 5' en vermell.



## 2.4 RESULTATS

Per citogenètica convencional es van observar moltes alteracions cromosòmiques, i tot i així, la tècnica de l'SKY va permetre detectar noves alteracions en 17 dels 23 casos estudiats (74%)(Taula 15). Malgrat que els pacients presentaven una barreja de cèl·lules normals/tumorals que dificultava la definició de les diferents alteracions per SKY, va ser gràcies a aquesta tècnica que es va poder redefinir el cariotip en els 17 casos esmentats (Taula 16). Es tractava d'alteracions que romanien críptiques o bé no identificables pel mètode del bandeig G. Només sis pacients es van mantenir amb el cariotip establert per citogenètica convencional.

Dels 40 reordenaments trobats, 25 eren translocacions equilibrades on els cromosomes més implicats varen resultar ser: 1, 12, 8, 9, 17 i 14.

Entre les alteracions numèriques més recurrents destacaven la trisomia 3 (8 casos, 34%), trisomia 18 (6 casos, 26%) i trisomia 7 (4 casos, 17%). Pel que fa a les monosomies, són més difícils de determinar, ja que és complicat diferenciar una pèrdua ocasional d'una anomalia clonal. En aquesta sèrie dos pacients (12 i 15) presenten monosomia del cromosoma 6.

Taula 15. Cariotips per citogenètica convencional i SKY de 23 pacients amb LZME.

Cas	Citogenètica convencional	SKY
1.	44-46,XY,del(2)(p11),del(6)(q15),del(6)(q15),add(12)(q24),-17,+mar[cp4]/46,XX[16]	40-43,XY,+1,der(1)del(1)(p22)del(1)(q31);t(2;12)(p11;q24),del(6)(q15),del(6)(q15),del(17)(p13)[cp2]
2.	47,XX,del(2)(q23),add(17)(p13),+mar,-2-4 dmin[6]	42-48,XX,del(2)(q23),der(17)t(5;17)(?;p13),+dmin(1),+dmin(3)[cp4]
3.	46,XX,der(6)t(1;6)(q10;q27),del(7)(q32),t(9;11)(p11;q25),add(14)(q32),add(19)(p13),-22,+mar[10] 46,XX[6]	46,XX,+3,der(3)t(3;22)(p11;q11),der(6)t(1;6)(q10;q27),del(7)(q32),der(11)t(6;11)(?;q25),t(9;14)(p13;q32),-22,+mar(11)[cp5]
4.	47,XX,+3,t(5;6?)(p15;?),del(7)(q31q36)[10]/46,XX[10]	44-89,XX,+3,der(3)t(3;8)(q27;q24),del(6)(q15),der(6)t(6;8)(q23;q24),del(7)(q31q36),der(17;18)(q10;q10),+18,t(18)(q10)[cp4]
5.	47,XX,t(3;18)(q11;p11),+18,der(18)t(3;18)(q11;p11)[4]/46,XX[16]	47,XX,t(3;18)(q11;p11),+18,der(18)t(3;18)(q11;p11)[2]
6.	50,XX,+x7,+3,del(6)(q23),+7,+18[6]polyplod[4]/46,XX[10]	47-49,X,-X,+3,del(6)(q23),+7,+9,der(9)t(X;9)(?;q34),+18[cp6]
7.	50,XY,+X,+3,+8,+18[16]/46,XY[4]	50,XY,+X,+3,+8,+18[3]
8.	46,XX,der(13)t(3;13)(q21;q11),der(19)t(11;19)(q11;q13)[15]/46,XX[2]	46,XX,del(7)(q22),der(13)t(3;13)(q21;q14)[2]
9.	46,XY,der(6)t(3;6)(q11;q11),der(19)t(11;19)(q11;q13)[9]/46,XY[7]	46-47,XY,der(6)t(3;6)(q11;q11),der(19)t(12;19)(q11;q13),+mar(12)[cp4]
10.	47,XX,dup(3)(q11q27),+7,del(7)(q22q34),del(7)(q22q34)[13]/46,XX[7]	47-48,XX,dup(3)(q11q27),+7,del(7)(q22q34),del(7)(q22q34),+1[cp2]
11.	48,XX,dup(1)(q22q32),+4,del(4)(p11),del(4)(p11),+7,add(9)(p24),del(9)(p21),der(12)[3]/ 48,XX,dup(1)(q22q32),+4,del(4)(p11),del(4)(p11),add(9)(p24),del(9)(p21),der(12),+19[7]	47-49,XX,dup(1)(q22q32),+4,del(4)(p11),del(4)(p11),+7,del(9)(p21),der(9)ins(9;14)(p13;q32q11),dup(12)(q11q15),+16,der(16)t(2;16)(?;q22)[cp3]
12.	51,XX,del(2)(q22),+3,+8,t(8)(q10),+11,add(11)(q23),der(14)t(1;14)(q21;q32),+18,+18[cp5]/46,XX[29]	46-52,XX,del(2)(q22)+3,-6,+8,+11,der(14)t(1;14)(q21;q32),+18,+18[cp4]

Taula 15. Cariotips per citogenètica convencional i SKY de 23 pacients amb LZME (continuació)

Cas	Citogenètica convencional	SKY
13.	49,X,-X,-X,+3,del(3)(p12),+7,del(7)(q32;q35),t(14;19)(q32;q13),+mar,+f(17)/46,XX[3]	47-49,X,-X,-X,+3,der(3)t(3;8)(pter;q11::8q24;8qter),+7,del(7)(q32;q35) der(8)t(3;8)(3?q;8p11→8q22::3?q),t(9;14)(p13;q32),t(14;19)(q32;q13),+mar(11),-f(1)(p36q44)[cp4]
14.	46,XY,add(17)(p13)[2]/46,XY,der(6)t(3;6)(q13;p25),add(17)(p13),add(17)(p13),add(19)(q13)[4]	46,XY,der(6)t(3;6)(q13;p25),add(17)(p13),add(19)(q13)[cp2]
15.	49,XY,+3,del(3)(q27),add(6)(p14),+18,+marf(17)/46,XY[3]	48,XY,+3,del(3)(q27),-5,inv(12)(p13q21),+18,+mar(2)[cp2]
16.	45,XX,dic(2;12)(q37;p13)/46,XX[17]	45,XX,dic(2;12)(q37;p13)[3]
17.	47,XY,dup(1)(q14q44),del(7)(q32),+12,add(12)(p13),t(14;19)(q32;q13)[17]/46,XY[3]	47,XY,dup(1)(q14q44),del(7)(q32),+12,der(12)t(6;12)(q24;p13),t(14;19)(q32;q13)[2]
18.	45-46,XY,t(1;14)(p22;q32),t(3;9;19)(?;q34;q13),+8,add(8)(q22),add(15)(q26),t(17)(q10),+mar[cp20]/46,XY[1]	44-47,XY,t(1;6)(p34;p23)+2,del(2)(q21),der(2)t(2;21)(p11;q11),+8,dic(8;15)(q24;q26),del(11)(q11),t(17)(q10),+mar(2),+mar(Y)[cp9]
19.	46,XY,del(7)(q22q32),add(16)(p13)[4]/46,XY,del(7)(q22q32),add(16)(p15),add(16)(p13)[2]/46,XY[2]	46,XY,t(1;11)(p12;p15),del(7)(q22q32),der(16)t(12;16)(p12;p13)[cp8]
20.	46,XY,inv(3)(p13q26),del(7)(q22q32),del(10)(q24q26),del(11)(q21q23)[17]/46,XY[8]	46,XY,inv(3)(p13q26),del(7)(q22q32),del(10)(q24q26),del(11)(q21q23)[2]
21.	47,XY,del(3)(p23),add(7)(q32),add(9)(q34),del(9)(q22),del(13)(q14),-15,del(17)(p13),[17]/46,XY[3]	45-47,XY,del(3)(p23),der(7)t(7;9;13)(7p22→7q32::9q34::13q14→13qter),del(9)(q22),der(9)t(9;15)(q34;q15),del(13)(q14),-15,der(17)t(5;17)(q22;p13),der(22)t(20;22)(q11;p11)[cp4]
22.	47,XY,del(7)(q21),+1[5]/43,XY,+3,del(7)(q21),-9,-13,-14,-18[10]/46,XY[5]	43-44,XY,del(7)(q21),-9,t(10;15)(q22;q22),der(13;14)(q10;q10),der(13;18)(q10;q10),der(17)t(9;17)(?;p13)[cp4]
23.	45,XY,t(2;8)(p11;p11),del(14)(q22),-2[19]/46,XY[1]	44-45,XY,t(2;7)(p11;q22),der(8)t(8;21)(q22;q11),del(14)(q22)[cp2]

**Taula 16.** Reinterpretació de les dades obtingudes per citogenètica convencional després de l'anàlisi per SKY (punts de trencament basats en el bandeig-G).

Cas	Citogenètica convencional	SKY
1	+mar del(2)(p11).add(12)(q24)	+der(1)del(1)(p22)del(1)(q31)
2	add(17)(p13)	t(2;12)(p11;q24)
3	+mar, +2-4 dmin no observada t(9;11)(p11;q25).add(14)(q32)	der(17)t(5;17)(?:p13) +dmin(1), +dmin(3) +3
4	add(19)(p13) -22 +mar no observada no observada t(5;6?)(p15;q15) no observada no observada no observada +X?	der(11)t(6;11)(?:q25),t(9;14)(p13;q32) no observada der(3)t(3;22)(p11;q11) +mar(11) der(3)t(3;8)(q27;?), del(6)(q15)
6	no observada	der(6)t(6;8)(q23;?) dic(17;18)(q10;q10) +18
9	der(19)t(11,19)(q11;q13)	i(18)(q10) +9
10	no observada	-X, der(9)t(9;X)(?:q34)
11	add(9)(p?24) der(12) +19 no observada	der(19)t(12;19)(q11;q13) +mar(12) +11
12	i(8)(q10) add(11)(q23)	der(9)t(9;14)(9pter→9p13::14q32→14q11::9p13→9qter) dup(12)(q11q15), +16, der(16)t(2;16)(?:q22) no observada no observada

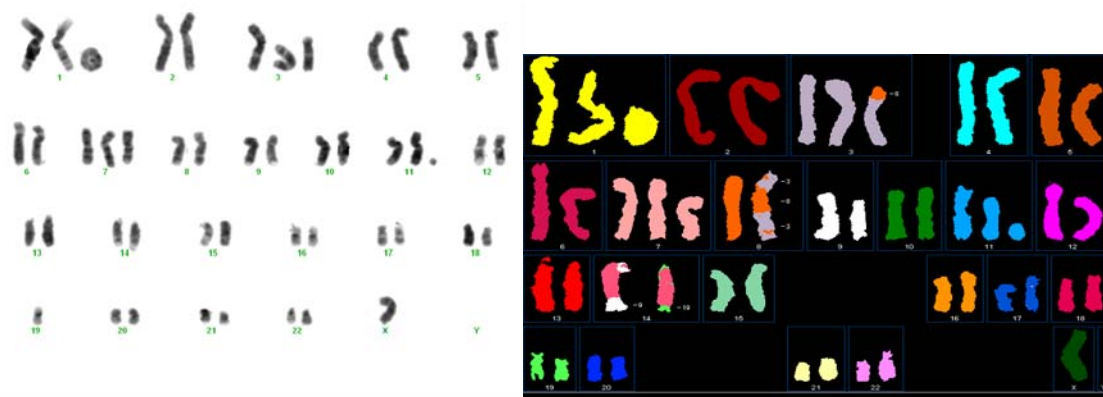
**Taula 16.** Reinterpretació de les dades obtingudes per citogenètica convencional després de l'anàlisi per SKY (punts de trencament basats en el bandeig-G).

Cas	Citogenètica convencional	SKY
13	del(3)(p12) no observada no observada +mar	der(3)t(3;8)(3pter→3q11::8p11→8pter) der(8)t(3;8)(3?q::8p11→8q22::3?q) t(9;14)(p13;q32) +mar(11)
14	+r	+r(1)(p36q44)
15	add(17)(p13) add(6)(p14) +mar	17 material inv(12)(p13q21) +mar(2)
17	add(12)(p13)	der(12)t(8;12)(q24;p13)
18	no observada no observada t(1;14)(p22;q32) t(3;9;19)(?;q34;q13) add(8)(q22),add(15)(q26) no observada no observada +mar	+2, del(2)(q21) der(2)t(2;21)(p11;q11) t(1;6)(p34;p23) no observada dic(8;15)(q22;q26) del(11)(q11) +mar(2) +mar(Y)
19	add(11)(p15) add(16)(p13)	t(1;11)(p12;p15) der(16)t(12;16)(p12;p13)
21	add(7)(q32),del(9)(q22),del(13)(q14) add(9)(q34) del(17)(p13)	der(7)t(7;9;13)(7p22→7q32::9q22→9q34::13q14 →13qter) der(9)t(9;15)(q34;q15) der(17)t(5;17)(q22;p13)
22	no observada no observada -13,-14 -13,-18 no observada t(2;8)(p11;p11) -21	der(22)t(20;22)(q11;p11) t(10;15)(q22;q22) der(13;14)(q10;q10) der(13;18)(q10;q10) der(17)t(9;17)(?;p13) t(2;7)(p11;q22) der(8)t(8;21)(q22;q11)

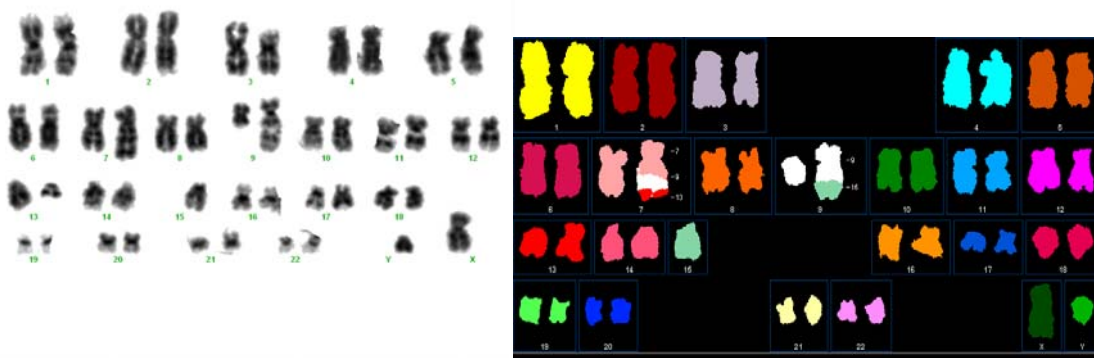
## ALTERACIONS ESTRUCTURALS

L'alteració estructural més freqüentment observada va ser la del(7q)(q22-q32) (9 casos, 39%). En set pacients, aquesta es trobava associada a guanys de 3q. Les adicions de material cromosòmic detectades per citogenètica convencional van redefinir-se en la majoria dels casos (10 de 13, 77%) en translocacions després d'aplicar la tècnica de l'SKY. Per ordre de freqüència, els cromosomes més implicats en els reordenaments i els seus punts de trencament van ser: 3 (q11-q27), 14 (q32), 6 (q11-q27), 12 (p/q) i 9 (p13/q) i 8 (p/q).

La figura 22 representa un exemple de la utilitat de l'SKY en l'anàlisi de cariotips complexos.



A



B

**Figura 22.** Imatges de la citogenètica convencional *versus* l'SKY dels pacients 13 (A) i 21 (B).

L'aplicació posterior de la tècnica de FISH amb sondes que cobrien les regions cromosòmiques implicades a la tècnica de l'SKY, va permetre establir els punts de ruptura de les noves translocacions detectades i confirmar en d'altres la implicació de gens descrits prèviament en aquelles regions (Taula 17). En sis de set pacients (85%) amb implicació de 17p al cariotip es va confirmar la deleció de *TP53*. Curiosament, el pacient 14, presentava material afegit al cromosoma 17 i tot i que per bandeig G es pensava que es tractava d'una translocació, per SKY es va definir que era material del mateix cromosoma. Per FISH vam aplicar la sonda de pintat cromosòmic del 17 confirmant un isocromosoma 17q.

*BCL6* es va estudiar en nou pacients amb alteracions a 3q, incloent casos en els que els punts de trencament éren diferents a q27, per tal de determinar tant la implicació d'aquest gen com guanys/pèrdues en aquesta regió. Set dels casos (77%) presentaven guanys de 3q degut a la presència de trisomies o bé cromosomes derivatius, i els altres dos presentaven només dues còpies. En cap pacient es va demostrar un reordenament implicant *BCL6*.

Els pacients amb afectació de 13q14 i 8q24 es van estudiar amb les sondes RB1 i MYC respectivament. Només un cas de tres presentava pèrdua de 13q14 i pel que fa al gen *MYC* en tres casos es van observar guanys deguts a translocacions no recíproques i un altre pacient presentava un reordenament de *MYC* al cromosoma 3p (Taula 17).

Taula 17. Estudi per FISH de les alteracions identificades per SKY.

Cas	Teixit	Alteració	Sondes de FISH	Resultats i comentaris
1	SP	t(2;12)(p11;q24)	KAPPA	no reordenat
	SP	del(17)(p13)	F53	65% deleció
2	mel·la	der(17)t(5;17)(?;p13)	F53	78% deleció
3	SP	t(9;14)(p13;q32)	PAX-5//IGH	66.5% translocació recíproca
4	SP	+3,der(3)t(3;8)(q27;q24)	BCL6	46% tres senyals/sense translocació normal
	SP	dic(17;18)(q10;10)	F53	
	SP	der(3)t(3;8)(q27;q24)	c-MYC	55% quatre senyals/sense translocació
5	SP	der(18)t(3;18)(q11;p11)	BCL6	27% tres senyals
8	MO	der(13)t(3;13)(q21;q14)	RB1	no reordenat
		der(13)t(3;13)(q21;q14)	BCL6	32% tres senyals
		der(19)t(12;19)(q11;q13)	BCL3	no reordenat
9	SP	der(6)t(3;6)(q11;q11)	BC-6	64% tres senyals/sense translocació normal
10	MO	dup(3)(q11q27)	BCL6	
11	mel·la	t(9;14)(p13;q32)	PAX-5//IGH	61.5% translocació recíproca
13	mel·la	t(9;14)(p13;q32)	PAX-5//IGH	18.6% translocació recíproca
		t(14;19)(q32;q13)	BCL-3//IGH	38% translocació recíproca
		+3,der(8)t(3;8)	BCL6	37% tres senyals/sense translocació
	SP	der(3)t(3;8)	MYC	senyal al cromosoma 3p
	SP	add(17)(p13)	pintat 17	i(17)(q10)
14	SP	i(17)(p13)	F53	52% deleció
	SP	der(6)t(3;6)(q13;p25)	BCL6	59% tres senyals/sense translocació
15	SP	+3,del(3)(q27)	BCL6	75% tres senyals/no deleció
17	SP	t(14;19)(q32;q13)	BCL3//IGH	58% translocació recíproca
		der(12)t(8;12)(q24;p13)	MYC	59% tres senyals/sense translocació
18	SP	i(17)(q10)	F53	34% deleció
	SP	der(2)t(2;21)(p11;q11)	KAPPA	no reordenat
20	SP	dic(8;15)(q24;q26)	MYC	17% tres còpies/no reordenat
21	SP	inv(3)(p13q26)	BCL6	normal
	SP	der(17)t(5;17)(q22;p13)	F53	65% deleció
22	MO	del(13)(q14),der(7)t(7;8;13)	RB1	34.5% deleció
		der(13)t(13;18)(q10;q10)	RB1	no reordenat
		der(17)t(9;17)(?;p13)	F53	73% deleció
23	SP	t(2;7)(p11;q22)	KAPPA	68.5% translocació
			CDK6	63% translocació

SP: Sang perifèrica; MO: Medulla òssia



## TRANSLOCACIONS DELS GENS DE LES IG

Dels 23 pacients estudiats per SKY, es va poder detectar que vuit d'ells presentaven implicació de les regions 2p12 i 14q32 (*IGK* i *IGH* respectivament). En relació amb *IGH*, per FISH es van poder confirmar les translocacions recíproques t(9;14)(p13;q32) implicant els gens *PAX-5/IGH* (tres casos) i la t(14;19)(q32;q13) implicant *IGH/BCL3* (dos casos). Pel que fa al gen *IGK*, es va detectar en un reordenament amb el gen *CDK6* en forma de t(2;7)(p12;q22) en un dels tres casos estudiats amb aquesta sonda. Malauradament, en els altres dos pacients on per cariotipat espectral es van detectar les translocacions t(2;12)(p12;q24) (cas 1) i t(2;21)(p12;q22) (cas 18) no es va poder confirmar per FISH el reordenament de la cadena lleugera kappa. Curiosament, el pacient 18 presentava una translocació definida com a t(1;14)(p22;q32) per citogenètica convencional, però després de l'aplicació de la tècnica de l'SKY aquesta va redefinir-se com a una t(1;6)(p34;p23) sense afectació d'*IGH*.

En el cas 12 no es va poder comprovar per FISH la implicació d'*IGH* en la t(1;14)(q21;q32) degut a que no disposavem de més material fixat en Carnoy.

Tot i així, i en resum, vam poder confirmar translocacions en els gens de les Ig en cinc de 23 pacients (21%).

### **3.TERCER TREBALL**

#### EL GEN *FOXP1* EN ELS LIMFOMES DE LA ZONA MARGINAL ESPLÈNICA: APROXIMACIÓ PER HIBRIDACIÓ *IN SITU* FLUORESCENT I IMMUNOHISTOQUÍMICA

##### **3.1 INTRODUCCIÓ**

El gen *Forkhead box protein P1* (*FOXP1*) localitzat a la banda 3p14 del cromosoma 3 genera una proteïna del mateix nom que presenta dominis característics de factor de transcripció, els quals representen un paper molt important en el desenvolupament normal dels organismes. Cal esmentar, que la regió 3p es troba delecionada en una tercera part dels tumors sòlids humans i que en ella han estat descrits diferents gens supressors de tumors. Degut a que *FOXP1* es troba en aquesta regió i llur proteïna es troba alterada i presenta pèrdua d'heterocigositat en aquest tipus de neoplàsies, es considera un nou candidat a gen supressor de tumors (Banham i col., 2001). Altrament, no hi ha massa informació pel que fa al rol de *FOXP1* en oncohematologia, tot i que és un regulador transcripcional en la limfopoiesi de les cèl·lules B (Hu i col., 2006). La sobreexpressió de la proteïna *FOXP1* va ser observada en casos de LDCG no centre germinal, on s'associava a un pitjor pronòstic (Barrans i col., 2004, Banham i col., 2005). Tanmateix, els mecanismes de disregulació de *FOXP1* en els LNH no són clars, tot i que diferents estudis suggerien que en molts casos les alteracions citogenètiques són el mecanisme patogènic responsable (Haralambieva i col., 2005, Streubel i col., 2005, Wlodarska i col., 2005, Fenton i col., 2006).

##### **3.1.1 t(3;14)(p14;q32)**

La translocació t(3;14)(p14;q32) implicant els gens *FOXP1/IGH* es va descriure en limfomes MALT i LDCG extranodals (Haralambieva i col., 2005, Streubel i col., 2005, Wlodarska i col., 2005, Fenton i col., 2006).

En els limfomes MALT, s'observà que en un 10% dels casos existia la translocació, que era dependent del lloc de localització de la malaltia i es trobava associada a altres alteracions cromosòmiques com la trisomia 3 (Streubel i col., 2005). Els estudis d'Haralambieva i col·laboradors (2005) i Fenton i col·laboradors (2006) en canvi, la descriuen bàsicament en LDCG extranodals.

El mecanisme de disregulació de *FOXP1* sembla ser degut a la seva juxtaposició amb el gen de les Ig, tot i que la descripció d'una t(2;3)(q36;p14) (Wlodarska i col., 2005) suggeriria que es tracta d'un gen promiscu implicat en els LNH que pot reordenar-se, com *BCL6*, amb molts *partners* diferents (Haralambieva, 2005). Respecte a la possibilitat de que la trisomia 3 sigui la responsable de la disregulació de *FOXP1*, Wlodarska i col·laboradors (2005) no van trobar evidència d'un augment de l'expressió de la proteïna en casos on només es dóna aquesta alteració.

Pel que fa als LZME, i a diferència de la resta de LNH, els reordenaments implicant el *locus* de les *IGH* s'han descrit en pocs casos (Corcoran i col., 1999, Hernández i col., 2001, Sonoki i col., 2001, Solé i col., 2001, Remstein i col., 2008) i en referència a la t(3;14)(p14;q32) només es van estudiar vuit casos els quals éren negatius per a aquest reordenament (Streubel i col., 2005).

## **3.2 OBJECTIU**

L'objectiu d'aquest treball va ser determinar mitjançant la tècnica de FISH l'existència de reordenaments del gen *FOXP1* en LZME i correlacionar-ho amb el nivell d'expressió de la seva proteïna per IHQ en aquells casos dels que es disposava de teixit esplènic.

## **3.3 PACIENTS I MÈTODES**

### **3.3.1 Pacients**

En aquest treball es van incloure 36 pacients diagnosticats de LZME segons els criteris de la OMS (Swerdlow i col., 2008).

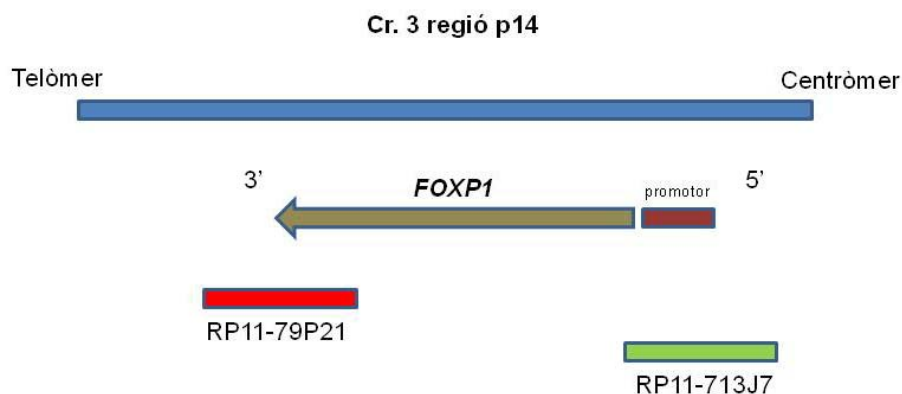
### 3.3.2 Mètodes

#### CITOGENÈTICA CONVENCIONAL

L'anàlisi per citogenètica convencional es va dur a terme segons el protocol estàndard per a cèl·lules fixades en Carnoy (12 casos de sang perifèrica, set de medul·la òssia i 17 de melsa) i la descripció dels cariotips es va dur a terme segons la ISCN (Shaffer i Tommerup, 2005).

#### HIBRIDACIÓ *IN SITU* FLUORESCENT

Per a l'estudi per FISH es va dissenyar una sonda de *break apart* no comercial, utilitzant BAC seleccionats del CHORI BACPAC *resource center* (<http://bacpac.chori.org/>). La sonda consta de dues clones (a 3' i 5' del gen) marcades amb fluorocroms vermell i verd mitjançant la tècnica de *nick translation* (Figura 23).



**Figura 23.** Esquema dels BAC escollits per a la elaboració de la sonda del gen *FOXP1*. El BAC situat a 3' va ser marcat en vermell i el situat a 5' en verd.

La sonda elaborada és capaç de detectar tots els punts de trencament de *FOXP1*, ja que prèviament havia estat descrit que aquests es trobaven a 90 Kb *downstream* del gen.

El marcatge de sonda i la tècnica de FISH es van dur a terme segons els protocols establerts sobre 12 mostres de sang perifèrica, set de medul·la òssia i 17 de melsa. En 10 de les 17 melses estudiades la tècnica de FISH va donar resultats no valorables, de manera que es va repetir l'experiment utilitzant cèl·lules de melsa fixades en Carnoy.

Per a l'establiment dels nivells de tall de la nostra sonda en cèl·lules en suspensió es van utilitzar mostres de sang perifèrica de 10 donants sans on es van analitzar en cada cas 200 nuclis. Els valors de tall obtinguts van ser de >1% per al reordenament i de >3% per a guanys de *FOXP1*. Pel que fa als casos de material parafinat es van valorar cinc amígdals també de donants sans, i en aquests casos els nivells de tall obtinguts van ser de >2% per a reordenaments de *FOXP1* i de >10% per a més d'una còpia del gen.

#### IMMUNOHISTOQUÍMICA

La IHQ es va aplicar sobre els 17 casos dels quals es disposava de material histològic inclòs en parafina. L'anticòs, clona JC12, va ser cedit per la Dra. Banham (Banham i col., 2001).

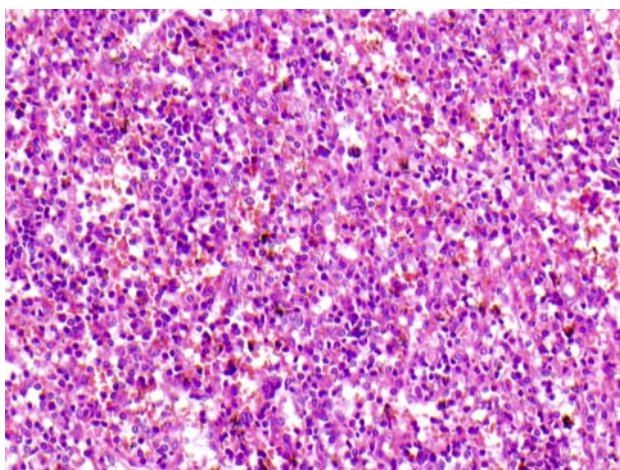
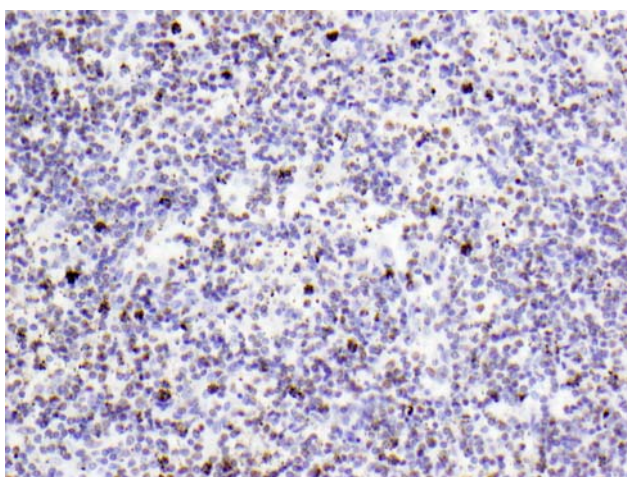
Els casos estudiats van ser considerats positius quan éren observades més del 30% de cèl·lules atípiques, i la intensitat de *FOXP1* es va establir com a dèbil, moderada i forta.

### 3.4 RESULTATS

Dels 36 casos estudiats, 29 (80%) van presentar un cariotip alterat per citogenètica convencional que en 22 d'ells era complexe, en 16 (44%) es trobava implicat el cromosoma 3 i en set casos estava constituït per una única alteració (en 5/7 pacients es tractava de deleció de 7q). El gen *FOXP1* no es va trobar reordenat en cap cas, tot i que en set pacients dels 36 (19%) van ser detectades tres còpies del gen, degudes a la trisomia total (5 casos) o parcial de 3p per translocacions no balancejades (2 casos) del cromosoma 3.

En un pacient (cas 3) van detectar-se discordàncies entre els resultats obtinguts per citogenètica convencional i FISH, ja que per bandeig G s'observava trisomia 3 (en 30 metafases de morfologia pobre) i per FISH no es va poder confirmar (Taula 18).

Els estudis d'IHQ es van realitzar sobre 17/36 pacients dels quals es disposava de teixit esplènic. Dels 17 casos analitzats, 14 presentaven expressió de FOXP1 i en cinc d'ells es tractava d'expressió forta i uniforme (Taula 18). És important destacar que tres pacients amb deleció de 7q com a única alteració van mostrar sobreexpressió de la proteïna FOXP1 així com afectació prominent de la polpa vermella de la melsa (3 casos dels 17 estudiats per IHQ) (Figura 24).

**A****B**

**Figura 24.** A) Secció de melsa tenyida del pacient 8 (tinció HE) augment 200X.  
B) Expressió de FOXP1 del mateix fol·licle limfoide.

En referència als casos 17 i 23, que també presentaven deleció de 7q com a única alteració, la IHQ no va poder detectar expressió de FOXP1 degut a que només presentaven un lleuger augment del teixit limfoide esplènic. D'altra banda, un pacient amb tres còpies del gen *FOXP1* detectades per FISH (cas 9) presentava només una lleugera expressió de la proteïna. Malauradament, de la resta de casos amb guany de *FOXP1* detectat mitjançant FISH no disposaven de peces d'esplenectomia, de manera que no va ser possible establir una correlació amb estudis d'expressió per IHQ.

Taula 18. Resultats de citogenètica, FISH i IHQ dels LMZE estudiats.

Cas	Teixit	Citogenètica convencional	FISH	IHQ	Patró esplènic
1	SP	44-89,XX,+3,der(3)t(3;8)(q27;q24),del(6)(q15),der(6)t(6;8)(q23;q24),del(7)(q31;q36),der(17;18)(q10;q10),+18,i(18)(q10)[cp4]	28% tres còpies		
2	SP	46,XX,t(1;3)(q25;p13),del(2)(p23),add(19)(p13)[2]/45,XX,t(1;3)(q25;p13),del(2)(p23),add(13)(q34),add(14)(q32),-22[1]/46,XX,t(1;3)(q25;p13),add(19)(p13)[1]/46,XX,add(2)(q37),t(1)/46,XX,del(X)(q22)[1]/46,XX[114]	25% tres còpies		
3	MO	48-49,XX,+3,+5,der(9),-10,-12,add(13)(q34),+2mar[cp2]/46,XX[28]	Normal		
4	SP	47,XX,t(3;18)(q11;p11),+18,der(18)t(3;18)(q11;p11)[2]	Normal		
5	SP	47-49,X,-X,+3,del(6)(q23),+7,+9,der(9)t(X;9)(?;q34),+18[cp6]	33% tres còpies		
6	MO	45,XX,t(3;4;14)(p21;q34;q32),-8,t(8;12)(q11;p11)[3]/45,XX,t(3;4;14)(p21;q34;q32),-12,der(22)t(12;22)(q11;q13)[3]/46,XX,t(3;4;14)(p21;q34;q32),del(12)(q11)[2]	8% tres còpies		
7	MO	46,XX,del(7)(q22),der(13)t(3;13)(q21;q14)[2]	Normal		
8	melisa	46-47,XY,der(6)t(3;6)(q11;q11),del(7)(q22),der(19)t(12;19)(q11;q13),+mar(12)[cp4]	Normal	expressió intensa	infiltració prominent de la polpa vermella
9	melisa	48,XX,+3,+12[20]	19% tres còpies	expressió dèbil	micronodular
10	MO	47-48,XX,dup(3)(q11q27),+7,del(7)(q22q34),del(7)(q22q34),+11[cp2]	Normal		
11	MO	47-49,X,-X,+3,der(3)t(3;8)(3pter→3q11::8q24→8qter),+7,del(7)(q32q36)der(8)t(3;8)(3?q;8p11→8q22::3?q),t(9;14)(p13;q32),t(14;19)(q32;q13),+mar(11),+r(1)(p36q44)[cp4]	39% tres còpies		
12	SP	46,XY,der(6)t(3;6)(q13;p25),add(17)(p13),add(19)(q13)[cp2]	Normal		
13	SP	48,XY,+3,del(3)(q27),-6,inv(12)(p13q21),+18,+mar(2)[cp2]	65% tres còpies		



**Taula 18.** Resultats de citogenètica, FISH i IHQ dels LMZE estudiats (continuació)

Cas	Teixit	Citogenètica convencional	FISH	IHQ	Patró esplènic
14	SP	46,XY,inv(3)(p13q26),del(7)(q22q32),del(10)(q24q26),del(11)(q21q23)[2]	Normal		
15	SP	45-47,XY,del(3)(p23),der(7)t(7;9;13)(7p22→7q32-9q22→9q34;13q14→13pter),del(9)(q22),der(9)t(9;15)(q34;q15),del(13)(q14),-15,der(17)t(5;17)(q22;p13),der(22)t(20;22)(q11;p11)[cp4]	Normal		
16	SP	44-45,XY,t(2;7)(p12;q22),der(6)t(6;21)(q22;q11),del(14)(q22)[cp2]	Normal		
17	melsa	46,XY,del(7)(q32)[1]/46,XY[19]	Normal	sense expressió	lleuger increment del teixit limfoide
18	SP	46,XY,t(2;12)(p12;q24),del(6)(q21),del(6)(q23),del(17)(p13)[5]/46,XY[25]	Normal		
19	SP	46,XX,del(7)(q32),del(10)(p21q11)[20]	Normal		
20	melsa	46,XX,del(7)(q22)[17]/46,XX[3]	Normal	expressió moderada	micronodular
21	melsa	46,XX[20]	Normal	expressió dèbil	micronodular
22	melsa	46,XX,del(7)(q32)[6]/46,XX[9]	Normal	expressió intensa	infiltració prominent de la polpa vermella
23	melsa	46,XX,del(7)(q22)[15]	Normal	sense expressió	lleuger increment del teixit limfoide
24	MO	47,XX,+12[4]/46,XX[16]	Normal		
25	melsa	46,XX[20]	Normal	expressió intensa	infiltració prominent de la polpa vermella
26	SP	44-47,XY,t(1;5)(p34;p23),+2,del(2)(q21),der(2)t(2;21)(p12;q11),+8,dic(8;15)(q24;q26),del(11)(q11),t(17)(q10),+mar(2),+mar(Y)[cp9]	Normal		
27	melsa	46,XX[20]	Normal	expressió moderada	micronodular
28	MO	43-44,XY,del(7)(q21),-9,t(10;15)(q22;q22),der(13;14)(q10;q10),der(13;18)(q10;q10),der(17)t(9;17)(?;p13)[cp4]	Normal		

**Taula 18.** Resultats de citogenètica, FISH i IHQ dels LMZE estudiats (continuació)

Cas	Teixit	Citogenètica convencional	FISH	IHQ	Patró esplènic
29	melsa	42-48,XX,del(2)(q23),der(17)t(5;17)(?;p13),+dmin(3)(cp4]	Normal	expressió dèbil	micronodular
30	melsa	46,XY[20]	Normal	expressió intensa	micronodular
31	melsa	46,XY,del(7)(q32)[6]/46,XY[11]	Normal	expressió intensa	infiltració prominent de la polpa vermella
32	melsa	46,XY[30]	Normal	sense expressió	micronodular
33	melsa	46,XX,del(7)(q32),add(19)(q13)[10]/46,XX[10]	Normal	expressió dèbil	micronodular
34	melsa	46,XY[10]	Normal	expressió moderada	micronodular
35	melsa	46,XX[20]	Normal	expressió moderada	micronodular
36	melsa	46,XX,i(12)(q10)[5]/46,XX[15]	Normal	expressió moderada	micronodular

MO: Medul·la òssia; SP: Sang perifèrica

## V DISCUSSIÓ



## **1. La t(9;14)(p13;q32) en LZME**

Les alteracions citogenètiques més freqüentment descrites en LZME són les delecions de 7q i la trisomia 3 (Oscier i col., 1993, Solé i col., 1993, Dierlamm i col., 1996, Troussard i col., 1998, Gruszka-Westwood i col., 1999, Solé i col., 2001, Salido i col., 2010) i pocs estudis posen de manifest translocacions implicant el gen *IGH* (Corcoran i col., 1999, Hernández i col., 2001, Sonoki i col., 2001, Solé i col., 2001, Remstein i col., 2008). En referència a la t(9;14)(p13;q32), només ha estat descrit un cas amb un reordenament complex t(2;9;14)(p12;p13;q32) implicant el gen *PAX-5* (Morrison i col., 1998).

Els tres pacients estudiats en el nostre treball presentaven cariotips complexes, essent les alteracions més freqüents el guany parcial de 1q (en un cas com a duplicació i en un altre com a cromosoma en anell on es guanya tot un cromosoma 1) i les trisomies 3 i 7 (en 2 casos). Aquests pacients presentaven una morfologia i immunofenotip típics de LZME tot i que dos d'ells posaven de manifest un patró difús d'infiltració esplènica, poc comú en aquesta patologia. De la mateixa manera que en els casos descrits en estudis previs, la t(9;14)(p13;q32) va ser detectada després d'aplicar tècniques de FISH multicolor. Concretament, en els nostres pacients, la t(9;14)(p13;q32) es va detectar després de l'aplicació de l'SKY, suggerint que aquesta alteració pot quedar emmascarada en cariotips amb reordenaments complexes.

En el cas 2, els estudis previs per citogenètica convencional, posaven de manifest una única translocació t(14;19)(q32;q13) i va ser per SKY que es va veure que una petita proporció de cèl·lules presentaven també una t(9;14)(p13;q32). Per FISH vam poder comprovar que es tractava doncs d'un cas amb dues translocacions afectant al gen *IGH*. El fet que un elevat nombre de cèl·lules presentés la t(14;19)(q32;q13) com a única alteració suggeria que la t(9;14)(p13;q32) era una alteració secundària. Cal destacar, que un any després del diagnòstic, la t(9;14)(p13;q32) ja era visible mitjançant citogenètica convencional, posant de manifest un augment d'aquesta clona tumoral.

A nivell histològic (en els casos 2 i 3) vam observar una associació d'aquest reordenament a un patró difús d'infiltració esplènica, poc comú en els LZME.

Mollejo i col·laboradors (2002), consideren que existeixen casos de LZME amb patró difús d'infiltració esplènica i característiques diferenciades: pocs micronòduls, morfologia marginal amb citoplasma abundant, inactivació de *TP53* i implicació cutània. Tot i això, cap dels nostres dos casos presentava aquestes característiques.

Els nostre treball va confirmar la rara però recurrent presència de la  $t(9;14)(p13;q32)$  en els LZME i que no es tracta d'una alteració específica d'un determinat subtipus de LNH. El pronòstic associat als reordenaments *PAX-5/IGH* en aquesta entitat patològica encara roman incert i és necessari un posterior seguiment dels pacients per a entendre millor el paper d'aquesta alteració en aquest tipus de limfomes.

Cal destacar, que posteriorment al nostre estudi va ser publicat el cas d'una pacient diagnosticada de LZME amb la  $t(9;14)(p13;q32)$ . Malauradament no es van realitzar estudis per citogenètica convencional i no existeix informació del cariotip, curiosament però, presentava infiltració cutània i també un patró histològic de caràcter difús (compatible també amb LDCG) (Kelly i col., 2007). Així mateix, un altre treball de l'any 2009, reportava un cas d'un pacient diagnosticat de LDCG positiu per a infecció del virus Epstein Barr i  $t(9;14)(p13;q32)$  (Ohno i col., 2009). Aquestes dues publicacions reforcen la nostra hipòtesi de que el reordenament *PAX-5/IGH* no és exclusiu d'un subtipus específic de LNH, que es tracta d'una alteració que es dona en pacients amb malaltia avançada i que presenten patrons histològics de caràcter difús.

Finalment, destacar un estudi on també per cariotipat espectral es va poder descriure una translocació complexa  $t(9;14;11)(p13;q32;q13)$  implicant *PAX-5*, *IGH* i *CCND1*. El que sobta d'aquest treball i el fa digne de menció és el fet de que es tracta d'un mieloma de cèl·lules plasmàtiques, i tal i com hem dit *PAX-5* es troba regulat a la baixa en les fases finals de diferenciació de les cèl·lules B (Sato i col., 2015).

Sigui com sigui, els nostres resultats en LZME són molt preliminars i hauran de ser confirmats en sèries més llargues de pacients.

## **2.Noves alteracions cromosòmiques en LZME detectades per cariotipat espectral (SKY)**

Els LZME són una entitat histològicament ben diferenciada però que a nivell genètic presenten heterogeneïtat, sense una alteració exclusiva que els pugui diferenciar al 100% dels diferents LNH amb els que es pot solapar. La majoria de pacients (70-80%) presenten un cariotip complex (Troussard i col., 1998, Hernández i col., 2001, Sole i col., 2001, Aamot i col., 2005, Oscier i col., 2005, Salido i col., 2010) i precisament, degut a la complexitat dels cariotips, la descripció dels cromosomes implicats en reordenaments múltiples, les adicions, delecions, insercions etc..és particularment difícil. Per aquest motiu les tècniques de cariotipat multicolor són extremadament útils, ja que permeten redefinir les alteracions, sobretot estructurals, permetent una visió més precisa del conjunt d'anomalies.

Aquest treball és el primer que utilitza la tècnica del cariotipat espectral o SKY per a l'estudi d'una sèrie de LZME amb cariotip complex. Cal destacar que en un 74% dels casos el SKY va proporcionar informació adicional a la obtinguda per citogenètica convencional. Es tractava d'anomalies que romanien críptiques per al bandeig G i que en cap cas s'haurien pogut detectar tot i augmentar el nombre de metafases analitzades.

En aquesta sèrie, la freqüència de casos positius per a CD5 és relativament elevada (26%) respecte al que ha estat descrit prèviament (Matutes i col., 1994) però això pot explicar-se pel fet que es tracta de casos específicament seleccionats per la complexitat del seu cariotip. Giannouli i col.laboradors (2004) van publicar que els casos de LZME CD5 positius presenten un curs més agressiu però estudis posteriors al nostre treball demostren que no existeixen diferències ni de supervivència ni de paràmetres clinico-biològics entre els casos CD5+/CD5- (Salido i col., 2010).

Del nostres casos CD5 positius, dos d'ells presentaven alteracions citogenètiques que poden trobar-se en LLC. El pacient 21, que presentava un patró d'infiltració sinusoidal a la medul·la òssia (característic dels LZME), referia una del 13q14 per citogenètica convencional. Després d'aplicar la tècnica de l'SKY, es va veure que la regió 13q14 es trobava implicada en una translocació complexa  $der(7)t(7;9;13)$ .

L'altre cas, el pacient 23, presentava una  $t(2;7)(p11;q22)$  que també havia estat descrita a la LLC. Aquest reordenament però, també pot detectar-se en casos de LZME (Corcoran i col., 1999) i el nostre pacient presentava precisament un immunofenotip molt suggestiu d'aquesta entitat.

La  $t(14;19)(q32;q13)$  es va descriure en un principi àmpliament en LLC. Estudis posteriors però, van demostrar que els reordenaments de *BCL3* no éren una alteració exclusiva d'aquesta patologia i que es podien detectar en un grup molt heterogeni de limfomes de cèl·lula B (Martín-Subero i col., 2007). Nosaltres, en aquesta sèrie hem descrit dos casos de LZME amb la  $t(14;19)(q32;q13)$  associada a una deleció de 7q.

La deleció de 7q, que es creu es troba associada a un pitjor pronòstic (Mateo i col., 1999), és precisament l'anomalia citogenètica considerada com un marcador específic dels LZME i és l'alteració més freqüent en els casos d'aquest estudi. La pèrdua recurrent de material d'aquesta regió fa pensar que existeixen gens de rellevància en la patogènesi dels LZME en aquesta regió (Gruszka-Westwood i col., 2003). Tanmateix, tot i que les delecions de 7q són l'alteració més detectada en els LZME, només un estudi previ demostra un mecanisme oncogènic de patogènesi degut a translocacions de 7q (Corcoran i col., 1999).

En el nostre treball hem detectat mitjançant SKY una  $t(2;7)(p12;q22)$  idèntica a la descrita per Corcoran i col·laboradors (1999). Aquest reordenament va definir-se per citogenètica convencional com a un  $t(2;8)$  però gràcies al cariotipat espectral vam poder identificar-la correctament com a una  $t(2;7)$ . Per FISH vam voler comprovar la implicació dels gens *IGK* i *CDK6*, per la qual cosa vam haver de dissenyar una sonda específica per a *CDK6* ja que no n'existia cap de comercial. Els resultats vam posar de manifest que efectivament *IGK* i *CDK6* es trobaven reordenats en un 68% i 63% de les cèl·lules respectivament. Aquest fet confirma la presència d'una translocació recíproca entre aquests dos gens, i ens va permetre corroborar la baixa però recurrent presència de translocacions implicant gens amb propietats oncogèniques disregulats per juxtaposició amb els promotors de les Ig.



En concordança amb dades d'estudis previs del grup (Solé i col., 1997) el cromosoma 3 ha estat el segon més freqüentment implicat en alteracions en el nostre treball, no només a nivell numèric (guany de tot el cromosoma) sinó també a nivell d'alteracions estructurals resultant d'aquestes un guany de 3q. Investigacions anteriors del nostre grup van establir que era poc habitual trobar en un mateix cariotip deleció de 7q i guanys de 3/3q (Solé i col., 2001). La nostra sèrie no pot corroborar aquesta afirmació ja que en cinc casos han estat detectades les dues anomalies juntes.

En relació amb les translocacions que afecten a la regió 3q, els cromosomes que hem trobat implicats són el 6, 8, 13 i 18. Pel que fa a la incidència de la trisomia 3 en el nostre treball ha estat d'un 34%, un percentatge similar a l'observat per HGC en LZME (Hernández i col., 2001). La presència de guanys 3/3q ha estat significativament associada en estudis previs a un pitjor pronòstic (Hernández i col., 2001, Aamot i col., 2005, Dierlamm i col., 2000c). Els autors suggerien que el material adicional té efecte de dosi gènica, de manera que els gens sobreexpressats per guany en aquesta regió contribueixen a la transformació neoplàsica o bé a la progressió de la malaltia (Dierlamm i col., 2000c).

El gen *BCL6* es troba localitzat a la regió 3q27 i és un repressor transcripcional alhora que una diana freqüent en múltiples translocacions cromosòmiques que afecten als LNH (Barrans i col., 2002, Ohno, 2006). Els nivells d'expressió d'aquest gen són útils per a determinar el curs clínic de la malaltia en contraposició al desconegut significat pronòstic de les translocacions en aquest *locus*. L'aplicació de la tècnica de FISH mitjançant la sonda de *BCL6* és una bona estratègia per a detectar guanys de 3/3q en LZME. A part de la trisomia 3, en el nostre treball hem detectat una elevada incidència de trisomies 7 i 18, en la mateixa proporció que havien estat prèviament descrites (Hernández i col., 2001, Aamot i col., 2005, Callet-Bauchu i col., 2005).

En el nostre estudi, quatre pacients (17%) van presentar una translocació implicat el cromosoma 8. Tres d'ells presentaven un guany de la regió 8q com a cromosoma derivatiu i per FISH vam poder detectar que implicava el gen *MYC*. L'altre pacient mostrava senyal d'aquest gen a la regió 3p, però no es trobava reordenat.

La relació entre *MYC* i els LZME cal que sigui estudiada millor en una sèrie de casos més gran per tal de veure si realment la regió 8q24 pot estar implicada en anomalies però no reordenada.

La trisomia 12 o la duplicació de 12q ha estat observada freqüentment com a alteració secundària en els desordres de línia limfoide (Hernández i col., 2001) tot i que estudis previs suggereixen una baixa implicació de la trisomia 12 per citogenètica convencional en els LZME (Oscier i col., 1993, Solé i col., 2001). En aquest treball, hem estat capaços de detectar mitjançant la tècnica de l'SKY, una alteració numèrica i sis estructurals implicant el cromosoma 12. Podem argumentar que aquestes alteracions són difícils de veure per citogenètica convencional però en canvi fàcilment detectables per cariotipat espectral, explicant d'aquesta manera la baixa incidència d'alteracions implicant el cromosoma 12 detectada en els estudis anteriors (Oscier i col., 1993, Solé i col., 1997, Solé i col., 2001).

Les translocacions implicant el *locus* 14q32 són habituals en un elevat nombre de LNH i el resultat d'aquestes translocacions comporta una sobreexpressió dels gens juxtaposats al promotor de les *IGH*. Un tipus d'aquests reordenaments ha estat descrit en els LZME en forma de t(6;14)(p21;q32) (Solé i col., 2000). En el nostre treball, i en contraposició al que ha estat descrit prèviament, trobem una elevada freqüència de translocacions implicant 14q32 després de la aplicació de la tècnica de cariotipat espectral. Hem estat capaços de detectar la t(9;14)(p13;q32), que sembla ser important en els LZME amb patró d'infiltració esplènica de tipus difús (treball 1). La t(14;19)(q32;q13) i un reordenament t(1;14)(q21;q32) també s'han observat després de l'aplicació de la tècnica de l'SKY. En referència a la t(14;19)(q32;q13), un estudi multicèntric de Martín-Subero i col·laboradors (2007), posa de manifest que els reordenaments del gen *BCL3* amb els diferents *loci* de les Ig no es troben restringits a la LLC, sinó que més aviat són detectables en un grup molt heterogeni de neoplàsies de cèl·lula B. Pel que fa a la t(1;14)(q21;q32), ha estat descrita en diferents LNH però no en LZME (<http://cgap.nci.nih.gov/Chromosomes/Mitelman>).

Els estudis previs realitzats per citogenètica convencional sobre mostres de pacients diagnosticats de LZME posen de manifest una elevada incidència de delecions a 7q i trisomia 3/3q, però poques sèries han inclòs informació pel que fa a les translocacions cromosòmiques i altres reordenaments estructurals en aquesta entitat. Mitjançant la tècnica de l'SKY, s'han posat de manifest en aquest treball nous reordenaments i translocacions implicant els *loci* de les Ig en LZME.

Altres tècniques que s'han anat introduïnt en l'estudi de les neoplàsies limfoides, com els *arrays* d'HGC o els *microarrays* d'expressió, tenen un nivell de resolució major, però no són capaces d'identificar translocacions recíproques. Degut al fet que aquests reordenaments són molt importants en la patogènesi dels limfomes de cèl·lula B creiem que l'SKY és una eina molt útil per a revelar-los, i també per a redefinir de manera més precisa els resultats obtinguts per citogenètica convencional. Evidenment que es tracta d'una tècnica que també té les seves limitacions, si les metafases no són de bona qualitat, si la clona tumoral és petita o la presència d'alteracions de tamany més petit al seu límit de resolució. Tot i així, aquest estudi posa de manifest que els avantatges són més grans que les limitacions i pot tractar-se d'una eina molt poderosa en l'estudi dels LZME.

Actualment, i tot i que constantment van apareixent noves tècniques cada cop més precises (la seqüenciació massiva per exemple), l'SKY continua essent molt útil en l'anàlisi de cariotips complexes, ja que ajuda a dilucidar els gens implicants en els reordenaments o bé posa de manifest alteracions no detectades per altres tècniques (Sato i col., 2015, Sawyer i col., 2015, Taniwaki, 2015). També hi ha treballs on de la mateixa manera que nosaltres amb els LZME, el cariotipat espectral s'ha utilitzat per a descriure patologies genèticament heterogènies que encara no tenen marcadors cromosòmics específics establerts (Udayakumar i col., 2015).

### **3. El gen *FOXP1* en LZME: estudi de la t(3;14)(p14;q32) per FISH i de l'expressió de la proteïna FOXP1 per IHQ**

A la literatura s'ha descrit que el gen *FOXP1* es troba disregulat degut a guanys totals o bé parcials del cromosoma 3. Aquesta alteració d'altra banda es troba associada a una forta expressió de la proteïna FOXP1 suggerint una relació entre la presència de còpies extra d'aquest gen i l'expressió aberrant de la seva proteïna (Haralambieva i col., 2005). Els mecanismes de disregulació en els LNH són diversos i no sempre han d'estar associats a reordenaments cromosòmics. Si bé és cert, que en molts casos degut al petit tamany de les regions implicades o per la presència de cariotips complexes hi ha translocacions que poden quedar emmascarades i és en aquests casos on les diferents tècniques de FISH són de gran utilitat per a confirmar o detectar alteracions (Gozzetti i col., 2002, Gazzo i col., 2005).

Malgrat que la trisomia 3 és una de les alteracions cromosòmiques més freqüents en els LZME (Dierlamm i col., 2000c, Hernández i col., 2001, Solé i col., 2001, Aamot i col., 2005) la t(3;14)(p14;q32) no ha estat detectada en aquesta entitat (Streubel i col., 2005). Per aquest motiu ens vam proposar fer un estudi sobre mostres de pacients diagnosticats de LZME utilitzant una sonda de FISH específica per a *FOXP1* i intentar correlacionar els resultats obtinguts amb l'expressió de llur proteïna.

Tot i que no vam detectar reordenament del gen en cap cas, si que vam poder observar tres còpies de FOXP1 degudes a guanys del cromosoma 3 sencer o guanys parcials de 3p.

Desafortunadament, no va ser possible establir una correlació entre els casos que presentaven trisomia 3/3p per FISH i els estudis d'expressió per IHQ, degut a la indisponibilitat de teixit esplènic per valorar. Només es van poder realitzar els dos anàlisis sobre la melsa d'un pacient, el qual presentava una lleugera expressió de FOXP1 i posava de manifest trisomia 3 per FISH. Posteriorment al nostre treball, s'ha publicat un estudi que determina l'existència de diferents isoformes de la proteïna FOXP1 en LDCG que l'anticòs monoclonal JC12 és incapaç de distingir (Brown i col., 2008). Aquest fet podria explicar les discordàncies entre FISH i IHQ del nostre cas.

La deleció de 7q es considerada l'alteració més característica dels LZME (Oscier i col., 1993, Solé i col., 1993, Troussard i col., 1998, Solé i col., 2001, Salido i col., 2010). En aquest estudi vam detectar tres casos amb deleció de 7q i infiltració abundant de la polpa vermella. Curiosament, aquests pacients presentaven una forta (dos casos) i moderada (un cas) expressió de la proteïna FOXP1. Malauradament, el nombre de pacients que presentaven aquestes característiques és molt baix i no podem establir cap mena de relació entre elles. Aquest resultat, molt preliminar, hauria de ser estudiat en un número major de pacients.

La present memòria representa l'estudi més ampli realitzat sobre la implicació del gen *FOXP1* en LZME. A fi de poder determinar una relació entre els guanys de 3/3p i l'expressió de la proteïna FOXP1 és necessari un estudi amb més pacients dels quals es disposi de mostra de teixit esplènic.

Així mateix, aquells estudis amb pacients que presentin una infiltració prominent de la polpa vermella i deleció de 7q haurien de confirmar o descartar l'associació entre aquesta alteració citogenètica i una forta expressió de la proteïna FOXP1.

El nostre estudi pot concloure finalment, que tot i que el gen *FOXP1* realitza un paper important en la regulació transcripcional de les cèl·lules B i probablement es troba afectat en altres LNH, podem descartar la implicació de la t(3;14)(p14;q32) en LZME.

Treballs posteriors al nostre han posat de manifest que és l'expressió de la proteïna FOXP1, i no les alteracions numèriques i/o estructurals d'aquest gen, el que té significat pronòstic. Cal tenir en compte doncs que l'expressió de la proteïna és bastant independent de l'estat del gen (Hoeller i col., 2010). Ha estat confirmat a més a més, que en LDCG extranodals la sobreexpressió de FOXP1 té un efecte advers en la supervivència, a diferència del que passa en els LDCG nodals, on la tumorigènesi implica també al gen *BCL2* (Yu i col., 2011). Finalment, ha estat descrit un micro-RNA, el miR-34a que es troba relacionat amb la disregulació de *FOXP1* (Craig i col., 2011).



## **VI CONCLUSIONS**





Dels resultats presentats en aquesta memòria podem concloure que:

**1. En relació a la t(9;14)(p13;q32) en els LZME:**

1.1. La t(9;14)(p13;q32) no és exclusiva d'un subtipus específic de LNH. Probablement es tracta d'una alteració que queda emmascarada en aquells casos que presenten cariotip complex i això en dificulta la seva detecció.

1.2. La t(9;14)(p13;q32) en LZME, es troba associada a un patró difús d'infiltració esplènica (conclusions molt preliminars).

**2. En relació a l'aplicació de la tècnica de l'SKY en pacients diagnosticats de LZME:**

2.1. La tècnica del SKY permet completar i definir de forma més precisa els resultats obtinguts en l'anàlisi per citogenètica convencional dels casos amb cariotip complex. Mitjançant l'SKY i la posterior aplicació de la tècnica de FISH podem detectar noves translocacions associades als LZME, en aquests moments pendents de tipificar, de manera que siguin útils tant a nivell de diagnòstic com de pronòstic.

2.2. L'aplicació de l'SKY en casos de LZME ens ha permès confirmar l'elevada incidència de delecions de 7q i guanys de 3/3q així com revelar una elevada proporció de translocacions implicant els gens de les Ig i noves translocacions dels cromosomes 3, 6, 8, 9 i 12.

2.3. Les translocacions implicant els gens de les Ig són més habituals en els LZME del que han estat descrites fins ara en aquesta entitat.

2.4. L'aplicació de la tècnica de l'SKY i la posteriorment la de FISH ens han permès detectar en LZME guanys sense reordenament del gen *MYC* (conclusions molt preliminars subjectes a un estudi més àmpli de pacients).

**3. En relació a la implicació del gen *FOXP1* en els LZME:**

- 3.1 La translocació t(3;14)(p14;q32) o el reordenament FOXP1/IGH no s'ha detectat en cap pacient afecte de LZME.
- 3.2 En pacients amb guany del braç curt del cromosoma 3 o trisomia 3, ha estat confirmat un augment en el nombre de còpies del gen *FOXP1*.
- 3.3 En pacients amb deleció de 7q com a única alteració i afectació prominent de la polpa vermella de la melsa, els estudis d'immunohistoquímica han demostrat un augment en l'expressió de la proteïna FOXP1 (resultat molt preliminar).

## **VII BIBLIOGRAFIA**



Aamot HV, Micci F, Holte H, Delabie J, Heim S. G-banding and molecular cytogenetic analyses of marginal zone lymphoma. *Br J Haematol* 2005; 130: 890-901.

Abbas AK, Lichtman AH, Pober JS. *Inmunología celular y molecular*. Tercera edición, 1999. Ed. McGraw-Hill/Interamericana de España SAU.

Adam P, Steinlein C, Schmid M, Haralambieva E, Stöcklein H, Leich E, Rosenwald A, Müller-Hermelink HK, Ott G. Characterization of chromosomal aberrations in diffuse large B-cell lymphoma (DLBL) by G-banding and spectral karyotyping (SKY). *Cytogenet Genome Res* 2006; 114: 274-278.

Algara P, Mateo MS, Sánchez-Beato M, Mollejo M, Navas IC, Romero L, Solé F, Salido M, Florensa L, Martínez P, Campo E, Piris MA. Analysis of the IgV(H) somatic mutations in splenic marginal zone lymphoma defines a group of unmutated cases with frequent 7q deletion and adverse clinical course. *Blood* 2002; 99: 1299-1304.

Andersen CL, Gruszka-Westwood A, Atkinson S, Matutes E, Catovsky D, Pedersen RK, Pedersen BB, Pulczynski S, Hokland P, Jacobsen E, Koch J. Recurrent genomic imbalances in B-cell splenic marginal-zone lymphoma revealed by comparative genomic hybridization. *Cancer Genet Cytogenet* 2005; 156: 122-128.

Arber DA, Rappaport H, Weiss LM. Non-Hodgkin's lymphoproliferative disorders involving the spleen. *Mod Pathol* 1997; 10: 18-32.

Arcaini L, Paulli M, Boveri M, Magrini U, Lazzarino M. Marginal zone-related neoplasms of splenic and nodal origin. *Haematologica* 2003; 88: 80-93.

Bahler DW, Pindzola JA, Swerdlow SH. Splenic marginal zone lymphomas appear to originate from different B cell types. *Am J Pathol* 2002; 161: 81-88.

Banham AH, Beasley N, Campo E, Fernandez PL, Fidler C, Gatter K, Jones M, Mason DY, Prime JE, Trougouboff P, Wood K, Cordell JL. The FOXP1 winged helix transcription factor is a novel candidate tumor suppressor gene on chromosome 3p. *Cancer Research* 2001; 61: 8820-8829.

Banham AH, Connors JM, Brown PJ, Cordell JL, Ott G, Sreenivasan G, Farinha P, Horsman DE, Gascoyne RD. Expression of the FOXP1 transcription factor is strongly associated with inferior survival in patients with diffuse large B-cell lymphoma. *Clinical Cancer Research* 2005; 11: 1065-1072.

Barrans SL, O'Connor SJ, Evans PA, Davies FE, Owen RG, Haynes AP, Morgan GJ, Jack AS. Rearrangement of the *BCL6* locus at 3q27 is an independent poor prognostic factor in nodal diffuse large B-cell lymphoma. *Br J Haematol* 2002; 117: 322-332.

Barrans SL, Fenton JA, Banham A, Owen RG, Jack AS. Strong expression of FOXP1 identifies a distinct subset of diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL) patients with poor outcome. *Blood* 2004; 104: 2933-2935.

Baseggio L, Traverse-Glehen A, Petinataud F, Callet-Bauchu E, Berger F, Ffrench M, Couris CM, Thieblemont C, Morel D, Coiffier B, Salles G, Felman P. CD5 expression identifies a subset of splenic marginal zone lymphomas with higher lymphocytosis: a clinico-pathological, cytogenetic and molecular study of 24 cases. *Haematologica* 2010; 95: 604-612.

Batanian JR, Dunphy CH, Richard JM, Petruska PJ, Perkins SL. Simultaneous presence of t(2;8)(p12;q24) and t(14;18)(q32;q21) in a B-cell lymphoproliferative disorder with features suggestive of an aggressive variant of splenic marginal zone lymphoma. *Cancer Genet Cytogenet* 2000; 120: 136-140.

Bell RJ. *Introductory Fourier transform spectroscopy*. Academic Press. London 1972.

Berek C, Berger A, Apel M. Maturation of the immune response in germinal centres. *Cell* 1991; 67: 1121-1129.

Berger F, Felman P, Thieblemont C, Pradier T, Baseggio L, Bryon PA, Salles G, Callet-Bauchu E, Coiffier B. Non MALT marginal zone B-cell lymphomas: a description of clinical presentation and outcome in 124 patients. *Blood* 2000; 95: 1950-1956.

Boveri T. *Zur frage der Entstehung maligner tumoren*. Gustav Fisher Verlag, Jena, 1914.

Bowen AL, Matutes E, Catovsky D. Splenic lymphoma with villous lymphocytes. *Haematologica* 1999; 84 (suppl. 10): 90-92.

Brown PJ, Ashe SL, Leich E, Burek C, Barrans S, Fenton JA, Jack AS, Pulford K, Rosenwald A, Banham AH. Potentially oncogenic B-cell activation-induced smaller isoforms of FOXP1 are highly expressed in the activated B cell-like subtype of DLBCL. *Blood* 2008; 112: 2816-2824.

Calasanz MJ. Revisión de técnicas de citogenética convencional y molecular y su implicación en el diagnóstico y pronóstico del cáncer. *Anales del sistema sanitario de Navarra* 2001; 24 (1): 17-30.

Callet-Bauchu E, Baseggio L, Felman P, Traverse-Glehen A, Berger F, Morel D, Gazzo S, Poncet C, Thieblemont C, Coiffier B, Magaud JP, Salles G. Cytogenetic analysis delineates a spectrum of chromosomal changes that can distinguish non-MALT marginal zone B-cell lymphomas among mature B-cell entities: a description of 103 cases. *Leukemia* 2005; 19: 1818-1823.

Camacho FI, Mollejo M, Mateo MS, Algara P, Navas C, Hernández JM, Santoja C, Solé F, Sánchez-Beato M, Piris MA. Progression to large B-cell lymphoma in splenic marginal zone lymphoma: a description of a series of 12 cases. *Am J Surg Pathol* 2001; 25: 1268-1276.

Caspersson T, Zech I, Johansson C. Differential binding of alkylatingfluorochromes in human chromosomes. *Exp Cell Res* 1970; 60: 315-319.

Catovsky D, Matutes E. Splenic lymphoma with circulating villous lymphocytes/splenic marginal zone lymphoma. *Semin Hematol* 1999; 36: 148-154.

Chacón JI, Mollejo M, Muñoz E, Algara P, Mateo M, Lopez L, Andrade J, Carbonero IG, Martínez B, Piris MA, Cruz MA. Splenic marginal zone lymphoma: clinical characteristics and prognostic factors in a series of 60 patients. *Blood* 2002; 100: 1648-1654.

Coad JE, Matutes E, Catovsky D. Splenectomy in lymphoproliferative disorders: a report on 70 cases and review of the literature. *Leuk Lymphoma* 1993; 10: 245-264.

Cook JR, Aguilera NI, Reshmi-Skarja S, Huang X, Yu Z, Gollin SM, Abbondanzo SL, Swerdlow SH. Lack of PAX-5 rearrangements in lymphoplasmacytic lymphomas: reassessing the reported association with t(9;14). *Human Pathology* 2004; 35: 447-454.

Corcoran MM, Mould SJ, Orchard JA, Ibbotson RE, Chapman RM, Boright AP, Platt C, Tsui LC, Scherer SW, Oscier DG. Dysregulation of cyclin dependent kinase 6 expression in splenic marginal zone lymphoma through chromosome 7q translocations. *Oncogene* 1999; 46: 6271-6277.

Craig VJ, Cogliatti SB, Imig J, Renner C, Neuenschwander S, Rehrauer H, Schlapbach R, Dirnhofer S, Tzankov A, Müller A. Myc-mediated repression of microRNA-34a promotes high-grade transformation of B-cell lymphoma by dysregulation of FOXP1. *Blood* 2011; 9 : 6227-6236.

Croce CM. Oncogenes and cancer. *N Engl J Med* 2008; 358: 502-511.

Cualing H, Steele P, Zellner D. Blastic transformation of splenic marginal zone B-cell lymphoma. *Arch Pathol Lab Med* 2000; 124: 748-752.

Cuneo A, Bigoni R, Roberti MG, Milani R, Agostini P, Cavazzini F, Minotto C, De Angeli C, Bardi A, Tammiso E, Negrini M, Cavazzini P, Castoldi G. Molecular cytogenetic characterization of marginal zone B-cell lymphoma: correlation with clinicopathologic findings in 14 cases. *Haematologica* 2001; 86: 64-70.

Dierlamm J, Michaux L, Wlodarska I, Pittaluga S, Zeller W, Stul M, Criel A, Thomas J, Boogaerts M, Delaere P, Cassiman JJ, Wolf-Peeters C, Mecucci C, Van den Berghe H. Trisomy 3 in marginal zone lymphoma: a study based on cytogenetic analysis and fluorescence *in situ* hybridization. *Br J Haematol* 1996; 242-249.

Dierlamm J, Rosenberg C, Stul M, Pittaluga S, Wlodarska I, Michaux L, Dehaen M, Verhoef G, Thomas J, de Kelder W, Bakker-Schut T, Cassiman JJ, Raap AK, de Wolf-Peeters C, Van den Berghe H, Hagemeijer A. Characteristic pattern of chromosomal gains and losses in marginal zone B cell lymphoma detected by comparative genomic hybridization. *Leukemia* 1997; 11: 747-758.

Dierlamm J, Baens M, Stefanova-Ouzounova M, Hinz K, Wlodarska I, Maes B, Steyls A, Driessen A, Verhoef G, Gaulard P, Hagemeijer A, Hossfeld DK, De Wolf-Peeters C, Marynen P. Detection of t(11;18)(q21;q21) by interphase *in situ* hybridization using API2 and MLT specific probes. *Blood* 2000a; 96: 2215-2218.

Dierlamm J, Stefanova M, Wlodarska I, Hinz K, Maes B, Michaux L, Stul M, Verhoef G, Thomas J, De Wolf-Peeters C, Van Den Berghe H, Hossfeld DK, Hagemeijer A. Analysis of the P53, RB/D13S25, and P16 tumor suppressor genes in marginal zone B-cell lymphoma: an interphase fluorescence *in situ* hybridization study. *Cancer Genet Cytogenet* 2000b; 120: 1-5.

Dierlamm J, Wlodarska I, Michaux L, Stefanova M, Hinz K, Van den Berghe H, Hagemeijer A, Hossfeld DK. Genetic abnormalities in marginal zone B-cell lymphoma. *Hematol Oncol* 2000c; 18: 1-13.

Dogan A, Isaacson PG. Splenic marginal zone lymphoma. *Semin Diagn Pathol* 2003; 20: 121-127.

Dungarwalla M, Appiah-Cubi S, Kulkarni S, Saso R, Wotherspoon A, Osuji N, Swansbury J, Cunningham DC, Catovsky D, Dearden CE, Matutes E. High-grade transformation in splenic marginal zone lymphoma with circulating villous lymphocytes: the site of transformation influences response to therapy and prognosis. *Br J Haematol* 2008; 143: 71-74.

Dunn-Walters DK, Boursier L, Spencer J, Isaacson PG. Analysis of immunoglobulin genes in splenic marginal zone lymphoma suggests on-going mutation. *Hum Pathol* 1998; 29: 585-593.

Falk S. Malignant lymphomas in spleen-morphology and microenvironment. *Vers Dtsch Ges Pathol* 1992; 76: 51-59.

Fenton JA, Schuurin E, Barrans SL, Banham AH, Rollinson SJ, Morgan GJ, Jack AS, van Krieken JH, Kluin PM. T(3;14)(p14;q32) results in aberrant expression of *FOXP1* in a case of diffuse large B-cell lymphoma. *Genes Chromosome Cancer* 2006; 45: 164-168.

Franco V, Florena AM, Campesi G. Intrasinusoidal bone marrow infiltration : a possible hallmark of splenic lymphoma. *Histopathology* 1996; 29: 571-575.



Franco V, Florena AM, Stella M, Rizzo A, Iannitto E, Quintini G, Campesi G. Splenectomy influences bone marrow infiltration in patients with splenic marginal zone cell lymphoma with or without villous lymphocytes. *Cancer* 2001; 91: 294-301.

Franco V, Florena AM, Iannitto E. Splenic marginal zone lymphoma. *Blood* 2003; 101: 2464-2472.

Gachard N, Parrens M, Soubeyran I, Petit B, Marfak A, Rizzo D, Devesa M, Delage-Corre M, Coste V, Laforet MP, de Mascarel A, Merlio JP, Bouabdalla K, Milpied N, Soubeyran P, Schmitt A, Bordessoule D, Cogné M, Feulliard J. IGHV gene features and MYD88 L265P mutation separate the three marginal zone lymphoma entities and Waldenström macroglobulinemia/lymphoplasmacytic lymphomas. *Leukemia* 2013; 27: 183-189.

Gazzo S, Baseggio L, Coignet L, Poncet C, Morel D, Coiffier B, Felman P, Berger F, Salles G, Callet-Bauchu E. Cytogenetic and molecular delineation of a region of chromosome 3q commonly gained in marginal zone B-cell lymphoma. *Haematologica* 2003; 88: 31-38.

Gazzo F, Felman P, Berger F, Salles G, Magaud JP, Callet-Bauchu E. Atypical cytogenetic presentation of t(11;14) in mantle cell lymphoma. *Haematologica* 2005; 90: 1708-1709.

Gherard DS, Kawasaki ES, Bancroft FC, Szabo P. Localization of a unique gene by direct hybridization *in situ*. *Proc Natl Acad Sci USA* 1981; 78: 3755-3759.

Giannouli S, Paterakis G, Ziakas PD, Anagnostou D, Voulgarelis M. Splenic marginal zone lymphomas with peripheral CD5 expression. *Haematologica* 2004; 89: 113-114.

Goldman JM. Initial treatment for patients with CML. *Hematology* 2009; 453-460.

Gozzetti A, Davis EM, Espinosa R, Fernald AA, Anastasi J, Le Beau MM. Identification of novel cryptic translocations involving IGH in B-cell non-Hodgkin's lymphomas. *Cancer Res* 2002; 62: 5523-5527.

Greenberg P, Cox C, Le Beau MM, Fenaux P, Morel P, Sanz G, Sanz M, Vallespi T, Hamblin T, Oscier D, Ohyashiki K, Toyama K, Aul C, Mufti G, Bennett J. International scoring system for evaluating prognosis in myelodysplastic syndromes. *Blood* 1997; 89: 2079-2088.

Gruszka-Westwood A, Matutes E, Coignet LJA, Wotherspoon A, Catovsky D. The incidence of trisomy 3 in splenic lymphoma with villous lymphocytes: a study by FISH. *Br J Haematol* 1999; 104: 600-604.

Gruszka-Westwood AM, Hamoudi R, Osborne L, Matutes E, Catovsky D. Deletion mapping on the long arm of chromosome 7 in splenic marginal lymphoma with villous lymphocytes. *Genes Chromosomes Cancer* 2003; 36: 57-69.

Haase D. Cytogenetic features in myelodysplastic syndromes. *Ann Hematol* 2008; 87: 515-526.

Hammer RD, Glick AD, Greer JP, Collins RD, Cousar JB. Splenic marginal zone lymphoma. A distinct B-cell neoplasm. *Am J Surg Pathol* 1996; 20: 613-626.

Haralambieva E, Adam P, Ventura R, Katzenberger T, Kalla J, Höller S, Hartmann M, Rosenwald A, Grenier A. Genetic rearrangement of FOXP1 is predominantly detected in a subset of diffuse large B-cell lymphomas with extranodal presentation. *Leukemia* 2005; 20: 1300-1303.

Harper ME, Sauders G. Localization of a single copy DNA sequences on G-banded human chromosomes by *in situ* hybridization. *Chromosoma* 1981; 83: 431-439.

Harris NL, Jaffe ES, Stein H, Banks PM, Chan JK, Cleary ML, Delsol G, De Wolf-Peeters C, Falini B, Gatter KC. A revised European-American classification of lymphoid neoplasms: a proposal from the International Lymphoma Study Group. *Blood* 1994; 84: 1361-1392.

Harris NL, Jaffe ES, Diebold J, Flandrin G, Müller-Hermelink HK, Vardiman J, Lister TA, Bloomfield CD. The World Health Organization classification of neoplastic diseases of the hematopoietic and lymphoid tissues. Report of the Clinical Advisory Committee meeting, Airlie House, Virginia, November 1997. *Ann Oncol* 1999; 10: 1419-1432.

Hayette S, Tigaud I, Callet-Bauchu E, French M, Gazzo S, Wahbi K, Callanan M, Felman P, Dumontet C, Magaud JP, Rimokh R. In B-cell chronic lymphocytic leukemias, 7q21 translocations lead to overexpression of the CDK6 gene. *Blood* 2003; 102: 1549-1550.

Heim S, Mandahl N, Mitelman F. Genetic convergence and divergence in tumor progression. *Cancer Res* 1988; 48: 5911-5916.

Heim S, Mitelman F. *Cancer cytogenetics*. 3rd ed. 2009. Wiley-Blackwell, Inc. Cap. 10, pp. 297-374.

Hermine O, Lefrère F, Bronowicki JP, Mariette X, Jondeau K, Eclache-Saudreau V, Delmas B, Valensi F, Cacoub P, Brechot C, Varet B, Troussard X. Regression of splenic lymphoma with villous lymphocytes after treatment of hepatitis C virus infection. *N Engl J Med* 2002; 347: 89-94.

Hernández JM, Garcia JL, Gutierrez NC, Mollejo M, Martínez-Climent JA, Flores T, Gonzalez MB, Piris MA, San Miguel JF. Novel genomic imbalances in B cell splenic marginal zone lymphomas revealed by comparative genomic hybridization and cytogenetics. *Am J Pathol* 2001; 158: 1843-1850.

Hockley SL, Else M, Morilla A, Wotherspoon A, Dearden C, Catovsky D, Gonzalez D, Matutes E. The prognostic impact of clinical and molecular features in hairy cell leukaemia variant and splenic marginal zone lymphoma. *Br J Haematol* 2012; 158: 347-354.

Hoeller S, Schneider A, Haralambieva E, Dirnhofer S, Tzankov A. FOXP1 protein overexpression is associated with inferior outcome in nodal diffuse large B-cell lymphomas with non-germinal centre phenotype, independent of gains and structural aberrations at 3p14.1. *Histopathology* 2010; 57: 73-80.

Hu H, Wang B, Borde M, Nardone J, Maika S, Allred L, Tucker PW, Rao A. FOXP1 is an essential transcriptional regulator of B cell development. *Nature Immunology* 2006; 7: 819-826.

Iannitto E, Ambrosetti A, Ammatuna E, Colosio M, Florena AM, Tripodo C, Minardi V, Calvaruso G, Enza Mitra M, Pizzolo G, Menestrina F, Franco V. Splenic marginal zone lymphoma with or without lymphocytes. Hematologic findings and outcomes in a series of 57 patients. *Cancer* 2004; 101: 2050-2057.

Isaacson PG, Matutes E, Burke M, Catovsky D. The histopathology of splenic lymphoma with villous lymphocytes. *Blood* 1994; 84: 3828-3834.

Isaacson PG. Splenic marginal zone lymphoma. *Blood* 1996; 88: 751.

Jacob J, Kelsoe G, Rajewsky K, Weiss U. Intraclonal generation of antibody mutants in germinal centres. *Nature* 1991; 354: 389-392.

Jaffe ES, Harris NL, Stein H, Vardiman JW (Eds.): World health Organization Classification of Tumours. Pathology and Genetics of Tumours of Hematopoietic and Lymphoid Tissues. IARC Press: Lyon 2001.

Jones KW. The chromosomal and nuclear location of mouse satellite DNA in individual cells. *Nature* 1970; 225: 912-915.

Kalpadakis C, Pangalis GA, Dimopoulou MN, Vassilakopoulos TP, Kyrtsolis MC, Korkolopoulou P, Kontopidou FN, Siakantaris MP, Dimitriadou EM, Kokoris SI, Tsaftaridis P, Plata E, Angelopoulou MK. Rituximab monotherapy is highly effective in splenic marginal zone lymphoma. *Hematol Oncol* 2007; 25: 127-131.

Kalpadakis C, Pangalis GA, Dimitriadou E, Angelopoulou MK, Siakantaris MP, Kyrtsolis MC, Ximeris M, Tzenou T, Sahanas S, Yiakoumis X, Papadaki EA, Panayiotidis P, Vassilakopoulos T. Mutation analysis of IgVH genes in splenic marginal zone lymphomas: correlation with clinical characteristics and outcome. *Anticancer Research* 2009; 29: 1811-1816.

Kearney L, Horsley SW. Molecular cytogenetics in haematological malignancy: current technology and future prospects. *Chromosoma* 2005; 114: 286-294.

Kelaidi C, Rollot F, Park S, Tulliez M, Christoforov B, Calmus Y, Podevin P, Bouscary D, Sogni P, Blanche P, Dreyfus F. Response to antiviral treatment in hepatitis C virus-associated marginal zone lymphomas. *Leukemia* 2004; 18: 1711-1716.

Keller CE, Nandula S, Vakiani E, Alobeid B, Murty VV, Bhagat G. Intrachromosomal rearrangement of chromosome 3q27: an under recognized mechanism of BCL6 translocation in B-cell non-Hodgkin lymphoma. *Hum Pathol* 2006; 37: 1093-1099.

Kelly RJ, O'connor SJ, Barrans SL, Johnson RJ, Owen RG. The t(9;14)(p13;q32) is a recurrent but rare abnormality in splenic marginal zone lymphoma. *Leukemia Lymphoma* 2007; 48: 1636-1637.

Klein U, Dalla-Favera R. Germinal Centres: role in B-cell physiology and malignancy. *Nat rev* 2008; 8: 22-33.

Kolialexi A, Tsangaris GT, Kitsiou S, Kanavakis E, Mavrou A. Impact of cytogenetic and molecular cytogenetic studies on hematologic malignancies. *Anticancer Res* 2005; 4: 2979-2983.

Küppers R, Klein U, Hansmann ML, Rajewsky K. Cellular origin of human B-cell lymphomas. *N Engl J Med* 1999; 341: 1520-1529.

Küppers R, Dalla-Favera R. Mechanisms of chromosomal translocations in B cell lymphomas. *Oncogene* 2001; 20: 5580-5594.

Küppers R. Mechanisms of B-cell lymphoma pathogenesis. *Nat rev* 2005; 5: 251-262.

Labouyrie E, Marit G, Vial JP, Lacombe F, Fialon P, Bernard P, de Mascarel A, Merlio JP. Intrasinusoidal bone marrow involvement by splenic lymphoma with villous lymphocytes: a helpful immunohistologic feature. *Mod Pathol* 1997; 10: 1015-1020.

Lee C, Gisselsson D, Jin C, Nordgren A, Ferguson DO, Blennow E, Fletcher JA, Morton CC. Limitations of chromosome classification by multicolor karyotyping. *Am J Hum Genet* 2001; 68: 1043-1047.

MacLennan IC, Gray D. Antigen-driven selection of virgin and memory B-cells. *Immunol Rev* 1986; 91: 61-85.

Martín-Subero JI, Ibbotson R, Klapper W, Michaux L, Callet-Bauchu E, Berge F, Calasanz MJ, De Wolf-Peeters C, Dyer MJ, Felman P, Gardiner A, Gascoyne RD, Gesk S, Harder L, Horsman DE, Kneba M, Küppers R, Majid A, Parry-Jones N, Ritgen M, Solé F, Thiel G, Wacker H-H, Oscier D, Wlodarska I, Siebert R. A comprehensive genetic and histopathologic analysis identifies two subgroups of B-cell malignancies carrying a t(14;19)(q32;q13) or variant *BCL3*-translocation. *Leukemia* 2007; 21: 1532-1544.

Martinez-Lopez A, Curiel-Olmo S, Mollejo M, Cereceda L, Martinez N, Montes-Moreno S, Almaraz C, Revert JB, Piris MA. MYD88 (L265P) somatic mutation in marginal zone B-cell lymphoma. *Am J Surg Pathol* 2015; 39: 644-651.

Martínez-Ramírez A, Urioste M, Alvarez S, Vizmanos JL, Calasanz MJ, Cigudosa JC, Benítez J. Cytogenetic profile of myelodysplastic syndromes with complex karyotypes: an analysis using spectral karyotyping. *Cancer Genet Cytogenet* 2004; 153: 39-47.

Mateo M, Mollejo M, Villuendas R, Algara P, Sanchez-Beato M, Martínez P, Piris MA. 7q31-32 allelic loss is a frequent finding in splenic marginal zone lymphoma. *Am J Pathol* 1999; 154: 1583-1589.

Mateo MS, Mollejo M, Villuendas R, Algara P, Sánchez-Beato M, Martínez P, Piris MA. Molecular heterogeneity of splenic marginal zone lymphomas: analysis of mutations in the 5' non-coding region of the *BCL6* gene. *Leukemia* 2001; 15: 628-634.

Matutes E, Morilla R, Owusu-Ankomah K, Houlihan A, Catovsky D. The immunophenotype of splenic lymphoma with villous lymphocytes and its relevance to the differential diagnosis with other B-cell disorders. *Blood* 1994; 83: 1558-1562.

Matutes E, Oscier D, Montalban C, Berger F, Callet-Bauchu E, Dogan A, Felman P, Franco V, Iannitto E, Mollejo M, Papadaki T, Remstein ED, Salar A, Solé F, Stamatopoulos K, Thieblemont C, Traverse-Glehen A, Wotherspoon A, Coiffier B, Piris MA. Splenic marginal zone lymphoma proposals for a revision of diagnostic, staging and therapeutic criteria. *Leukemia* 2008; 3: 487-495.

Melo JV, Hegde U, Parreira A, Thompson I, Lampert IA, Catovsky D. Splenic B cell lymphoma with circulating villous lymphocytes: differential diagnosis of B cell leukemias with large spleens. *J Clin Pathol* 1987; 40: 642-651.

Miranda RN, Cousar JB, Hammer RD, Collins RD, Vnencak-Jones CL. Somatic mutation analysis of IgH variable regions reveals that tumor cells of most parafollicular (monocytoid) B-cell lymphoma, splenic marginal zone B-cell lymphoma, and some hairy cell leukemia are composed of memory B lymphocytes. *Hum Pathol* 1999; 30: 306-312.

Mitelman F, Johansson B, Mertens F. The impact of translocations and gene fusions on cancer causation. *Nat rev* 2007; 4: 233-245.

Mollejo M, Menarguez J, Lloret E, Sánchez A, Campo E, Algara P, Cristobal E, Sánchez E, Piris MA. Splenic marginal zone lymphoma: a distinctive type of low-grade B-cell lymphoma. *Am J Surg Pathol* 1995; 19: 1146-1157.

Mollejo M, Algara P, Mateo MS, Sánchez-Beato M, Lloret E, Medina MT, Piris MA. Splenic small B-cell lymphoma with predominant red pulp involvement: a diffuse variant of splenic marginal zone lymphoma?. *Histopathology* 2002; 40: 22-30.

Mollejo M, Camacho FI, Algara P, Ruiz-Ballesteros E, García JF, Piris MA. Nodal and splenic marginal zone lymphomas. *Hematol Oncol* 2005; 23: 108-118.

Mollejo M, Rodríguez-Pinilla MS, Montes-Moreno S, Remstein ED, Algara P, Dogan A, Cigudosa JC, Juárez R, Flores T, Forteza J, Arribas A, Piris MA. Splenic follicular lymphoma. Clinicopathologic characteristics of a series of 32 cases. *Am J Surg Pathol* 2009; 33: 730-738.

Morrison AM, Jager U, Chott A, Schebesta M, Haas OA, Buslinger M. Deregulated PAX-5 transcription from a translocated IgH promoter in marginal zone lymphoma. *Blood* 1998; 92: 3865-3878.

Mulligan SP, Matutes E, Dearden C, Catovsky D. Splenic lymphoma with villous lymphocytes: natural history and response to therapy in 50 cases. *Br J Haematol* 1991; 78: 206-209.

Munari E, Rinaldi M, Ambrosetti A, Bonifacio M, Bonalumi A, Chilosi M, Zamò A. Absence of TCL1A expression is a useful diagnostic feature in splenic marginal zone lymphoma. *Virchows Arch* 2012; 461: 677-685.

Muñetón CM, Ramírez JL. Citogenética de tumores sólidos. *Iatreia* 2002; 2: 86-95.

Natkunam Y. The Biology of the germinal center. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2007; 210-215 (review).

Neimann RS, Sullivan AL, Jaffe R. Malignant lymphoma simulating leukemic reticuloendotheliosis: a clinicopathologic study of ten cases. *Cancer* 1979; 43: 329-342.

Nowell P, Hungerford D. A minute chromosome in chronic granulocytic leukemia. *Science* 1960; 132 :1497.

Nowell P. The clonal evolution of tumor cell populations. *Science* 1976; 194: 23-28.

Nowell P. Tumor progression: a brief historical perspective. *Semin Cancer Biol* 2002; 12: 261-266.

O'Connor C. Human chromosome translocations and cancer. *Nature Education* 2008; 1 (1).

Offit K, Parsa NZ, Filippa D, Jhanwar SC, Chaganti RSK. T(9;14)(p13;q32) denotes a subset of low grade Non-Hodgkin's lymphoma with plasmacytoid differentiation. *Blood* 1992; 80: 2594-2599.

Ohno H, Ueda C, Akasaka T. The t(9;14)(p13;q32) translocation in B-cell non-Hodgkin's lymphoma. *Leuk Lymphoma* 2000; 36: 435-445.

Ohno H. Pathogenetic and clinical implications of non-immunoglobulin; *BCL6* translocations in B-cell non-Hodgkin's lymphoma. *J Clin Exp Hematopathol* 2006; 46: 43-53.

Ohno H, Nishikori M, Haga H, Isoda K. Epstein-Barr virus-positive diffuse large B-cell lymphoma carrying a t(9;14)(p13;q32) translocation. *Int J Hematol* 2009; 89: 704-708.

Oscier D, Matutes E, Gardiner A, Glide S, Mould S, Brito-Babapulle V, Catowvsky JE and D. Cytogenetic studies in splenic lymphoma with villous lymphocytes. *Br J Haemtol* 1993; 85: 487-491.

Oscier D, Owen R, Johnson S. Splenic Marginal Zone Lymphoma. *Blood* 2005; 19: 39-51.

Papadaki T, Stamatopoulos K, Belessi K, Pouliou E, Parasi A, Douka V, Laoutaris N, Fassas A, Anagnostopoulos A, Anagnostou D. Splenic marginal-zone lymphoma: one or more entities? A histologic, immunohistochemical and molecular study of 42 cases. *Am J Surg Pathol* 2007; 31: 438-446.

Pardue ML, Gall JC. Molecular hybridization of radioactive DNA to the DNA of cytological preparations. *Proc Natl Acad Sci USA* 1969; 64: 600-604.

Parry M, Rose-Zerilli MJ, Ljungström V, Gibson J, Wang J, Walewska R, Parker H, Parker AE, Davis Z, Gardiner A, McIver-Brown N, Kalpadakis C, Xochelli A, Anagnostopoulos A, Fazi C, Gonzalez de Castro D, Dearden C, Pratt G, Ashton-Key M, Rosenquist R, Forconi F, Collins A, Ghia P, Matutes E, Pangalis G, Stamatopoulos K, Oscier D, Strefford J. Genetics and Prognostication in Splenic Marginal Zone Lymphoma: Revelations from Deep Sequencing. *Clin Cancer Res* 2015, in press.

Poppe B, De Paepe P, Michaux L, Dastugue N, Bastard C, Herens C, Moreau E, Cavazzini F, Yigit N, van Limbergen H, De Paepe A, Praet M, De Wolf-Peeters C, Wlodarska I, Speleman F. PAX5/IGH rearrangement is a recurrent finding in a subset of aggressive B-NHL with complex chromosomal rearrangements. *Genes Chromosome Cancer* 2005; 44: 218-223.

Rabbitts TH. Chromosomal translocations in human cancer. *Nature* 1994; 372: 143-149.

Remstein ED, Law M, Mollejo M, Piris MA, Kurtin PJ, Dogan A. The prevalence of IG translocations and 7q32 deletions in splenic marginal zone lymphoma. *Leukemia* 2008; 22: 1268-1272.

Rothmann C, Bar-Am I, Malik Z. Spectral imaging for quantitative histology and cytogenetics. *Histol Histopathol* 1998; 13: 921-926.

Roulston D, Le Beau M. Cytogenetic analysis of hematologic malignant diseases. *The AGT Cytogenetics Laboratory Manual*. Philadelphia: Lippincott-Raven (3<sup>a</sup>ed), 1997; 325-350.

Ruiz-Ballesteros E, Mollejo M, Rodriguez A, Camacho FI, Algara P, Martinez M, Pollán M, Sánchez-Alguilera A, Menarguez J, Campo E, Martinez P, Piris MA. Splenic marginal zone lymphoma: proposal of new diagnostic and prognostic markers identified after tissue and cDNA microarray analysis. *Blood* 2005; 106: 1831-1838.

Ruiz-Ballesteros E, Mollejo M, Algara P, Martínez P, Piris MA. MicroRNA losses in the frequently deleted region of 7q in SMZL. *Leukemia* 2007; 21: 2547-2549.

Saadoun D, Suarez F, Lefrere F, Valensi F, Mariette X, Aouba A, Besson C, Varet B, Troussard X, Cacoub P, Hermine O. Splenic lymphoma with villous lymphocytes associated with type II cryoglobulinemia and HCV infection: a new entity?. *Blood* 2005; 105: 74-76.

Salido M, Baró C, Oscier D, Stamatopoulos K, Dierlamm J, Matutes E, Traverse-Glehen A, Berger F, Felman P, Thieblemont C, Gesk S, Athanasiadou A, Davis Z, Gardiner A, Milla F, Ferrer A, Mollejo M, Calasanz MJ, Florensa L, Espinet B, Luño E, Wlodarska I, Verhoef G, García-Granero M, Salar A, Papadaki T, Serrano S, Piris MA, Solé F. Cytogenetic aberrations and their prognostic value in a series of 330 splenic marginal zone B-cell lymphomas: a multicenter study of the Splenic B-Cell Lymphoma Group. *Blood* 2010; 116: 1479-1488.

Salido M, Martínez-Avilés L, Ademà V, Ferrer A, Espinet B, Garcia M, Salar A, Besses C, Florensa L, Serrano S, Bellosillo B, Solé F. Absence of mutations of the histone methyltransferase gene EZH2 in splenic b-cell marginal zone lymphoma. *Leuk Res* 2011; 35: 23-24.

Sans-Sabrafen J, Besses Raebel C, Vives Corrons JL. *Hematología Clínica*. Cuarta edición. 2001. Ediciones Harcourt, SA. Cap. 24, pp. 428-473.

Sato K, Sakai H, Kato M, Nishio Y, Tsuruoka Y, Uemura Y, Yokoi S, Saito T, Matsunawa M, Suzuki Y, Isobe Y, Inoue Y, Takahashi M, Miura I. PAX5-positive plasma cell myeloma with t(9;14;11)(p13;q32;q13), a novel complex variant translocation of t(11;14)(q13;q32) and t(9;14)(p13;q32). *Int J Hematol* 2015;10: 608-611.



Sawyer JR, Tian E, Heuck CJ, Johann DJ, Epstein J, Swanson CM, Lukacs JL, Binz RL, Johnson M, Sammartino G, Zangari M, Davies FE, van Rhee F, Morgan GJ, Barlogie B. Evidence of an epigenetic origin for high-risk 1q21 copy number aberrations in multiple myeloma. *Blood* 2015; 11: 3756-3759.

Schimid C, Kirkham N, Diss T, Isaacson PG. Splenic marginal zone cell lymphoma. *Am J Surg Pathol* 1992; 16: 455-466.

Schröck E, du Manoir S, Veldman T, Schoell B, Wienberg J, Ferguson-Smith MA, Ning Y, Ledbetter DH, Bar-Am I, Soenksen D, Garini Y, Ried T. Multicolor spectral karyotyping of human chromosomes. *Science* 1996; 273: 494-497.

Schröck E, Padilla-Nash H. Spectral karyotyping and multicolor fluorescence *in situ* hybridization reveal new tumor-specific chromosomal aberrations. *Seminars in Hematology* 2000; 37: 334-347.

Shaffer AL, Rosenwald A, Staudt LM. Lymphoid malignancies: the dark side of B-cell differentiation. *Nat rev* 2002; 2: 920-930.

Shaffer LG and Tommerup N. An international system for human cytogenetic nomenclature. S. Karger, Basel 2005.

Shaffer LG, McGowan-Jordan J, Schmid M. ISCN 2013: An international system for human cytogenetic nomenclature. S. Karger, Basel 2013.

Shen Y, Iqbal J, Xiao L, Lynch RC, Rosenwald A, Staudt LM, Sherman S, Dybkaer K, Zhou G, Eudy JD, Delabie J, McKeithan TW, Chan WC. Distinct gene expression profiles in different B-cell compartments in human peripheral lymphoid organs. *BMC immunol* 2004; 15: 20.

Shteper PJ, Ben-Yehuda D. Molecular evolution of chronic myeloid leukemia. *Semin Cancer Biol* 2001; 11: 313-323.

Solé F, Woessner S, Florensa L, Montero S, Asensio A, Besses C, Sans-Sabrafen J. A new chromosomal anomaly associated with mature B-cell chroniclymphoproliferative disorders: del(7)(q32). *Cancer Genet Cytogenet* 1993; 65: 170-172.

Solé F, Woessner S, Florensa L, Espinet B, Mollejo M, Martín P, Piris MA. Frequent involvement of chromosomes 1, 3, 7 and 8 in splenic marginal B-cell lymphoma. *Br J Haematol* 1997; 98: 446-449.

Solé F, Espinet B, Salido M, Lloveras E, Fernández C, Cigudosa JC, Asensio A, Woessner S, Florensa L. Translocation t(6;14)(p12;q32): a novel cytogenetic abnormality in splenic lymphoma with villous lymphocytes. *Br J Haematol* 2000; 110: 241-243.

Solé F, Salido M, Espinet, García JL, Martínez-Climent JA, Granada I, Hernández JM, Benet I, Piris MA, Mollejo M, Martínez P, Vallespí T, Domingo A, Serrano S, Woessner S, Florensa L. Splenic marginal zone B-cell lymphomas: two cytogenetic subtypes, one with gain of 3q and the other with loss of 7q. *Haematologica* 2001; 86: 71-77.

Sonoki T, Harder L, Horsman DE, Karran L, Taniguchi I, Willis TG, Gesk S, Steinemann D, Zucca E, Schlegelberger B, Solé F, Mungall AJ, Gascoyne RD, Siebert R, Dyer MJ. Cyclin D3 is a target gene of t(6;14)(p21.1;q32.3) of mature B-cell malignancies. *Blood* 2001; 98: 2837-2844.

Spriano P, Barosi G, Invernizzi R, Ippoliti G, Fortunato A, Rosso R, Magrini U. Splenomegalic immunocytoma with circulating hairy cells. Report of eight cases and revision of the literature. *Haematologica* 1986; 71: 25-33.

Stamatopoulos K, Belessi C, Papadaki T, Kalagiakou E, Stavroyianni N, Douka V, Afendaki S, Saloum R, Parasi A, Anagnostou D, Laoutaris N, Fassas A, Anagnostopoulos A. Immunoglobulin heavy and light chain repertoire in splenic marginal zone lymphoma. *Mol Med* 2004; 10: 89-95.

Stevenson F, Sahota S, Zhu D, Ottensmeier C, Chapman C, Oscier D, Hamblin T. Insight in to the origin of B-cell tumors as revealed by analysis of immunoglobulin variable region genes. *Immunol Rev* 1998; 162: 247-259.

Streubel B, Vinatzer U, Lamprecht A, Raeder M, Chott A. T(3;14)(p14;q32) involving *IGH* and *FOXP1* is a novel recurrent chromosomal aberration in MALT lymphoma. *Leukemia* 2005; 1-7.

Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, Jaffe ES, Pileri SA, Stein H, Thiele J, Vardiman JW (Eds.): WHO Classification of Tumours of Hematopoietic and Lymphoid Tissues. IARC: Lyon 2008.

Takashima T, Itoh M, Ueda Y, Nishida K, Tamaki T, Misawa S, Abe T, Seto M, Machii T, Taniwaki M. Detection of 14q32.33 translocation and t(11;14) in interphase nuclei of chronic B-cell leukemia/lymphomas by *in situ* hybridization. *Int J Cancer* 1997; 72: 31-38.

Taki T, Taniwaki M. Chromosomal translocations in cancer and their relevance for therapy. *Curr Opin Oncol* 2006; 18: 62-68.

Taniwaki M. Recent advancements in molecular cytogenetics for hematological malignancies: identification of novel PVT1 fusion genes. *Rinsho Ketsueki*. 2015; 56: 2056-65.

Tchinda J, Neumann TE, Volpert S, Berdel WE, Büchner T, Horst J. Characterization of chromosomal rearrangements in hematological diseases using spectral karyotyping. *Diagn Mol Pathol* 2004; 13: 190-195.

Thieblemont C, Felman P, Berger F, Dumontet C, Arnaud P, Hequet O, Arcache J, Callet-Bauchu E, Salles G, Coiffier B. Treatment of splenic marginal zone B-cell lymphoma: an analysis of 81 patients. *Clin lymphoma* 2002; 3: 41-47.

Thieblemont C. Non-MALT marginal zone Lymphomas. *Ann Oncol* 2008; 19. Review.

Tjio JH, Levan A. The chromosome number of man. *Hereditas* 1956; 42: 1-6.

Tracey L, Aggarwal M, García-Cosío M, Villuendas R, Algara P, Sánchez-Beato M, Sánchez-Aguilera A, García JF, Rodríguez A, Camacho FI, Martínez N, Ruiz-Ballesteros E, Mollejo M, Piris MA. Somatic hypermutation signature in B-cell low-grade lymphomas. *Haematologica* 2008; 93: 1186-1195.

Tracy IG, Wrede JE, Bangs CD, Cherry AM, Warnke RA, Arber DA. Low-grade B-cell lymphomas with plasmacytic differentiation lack PAX-5 gene rearrangements. *J Mol Diag* 2005; 7: 346-351.

Traverse-Glehen A, Baseggio L, Callet-Bauchu E, Morel D, Gazzo S, French M, Verney A, Rolland D, Thieblemont C, Magaud JP, Salles G, Coiffier B, Berger F, Felman P. Splenic red pulp lymphoma with numerous basophilic villous lymphocytes: a distinct clinicopathological and molecular entity? *Blood* 2008; 111: 2253-2260.

Troen G, Nygaard V, Jessen TK, Ikonomou IM, Tierens A, Matutes E, Gruszka-Westwood A, Catovsky D, Myklebost O, Lauritzsen G, Hovig E, Delabie J. Constitutive expression of the AP-1 transcription factors c-jun, junD, junB and c-fos and the marginal zone B-cell transcription factor Notch2 in splenic marginal zone lymphoma. *J Mol Diagn* 2004; 6: 297-307.

Troussard X, Valensi F, Duchayne E, Garand R, Felman P, Tulliez M, Henry-Amar M, Bryon PA, Flandrin G. Splenic lymphoma with villous lymphocytes: clinical presentation, biology and prognostic factors in a series of 100 patients. *Br J Haematol* 1996; 93: 731-736.

Troussard X, Mauvieux L, Radford-Weiss I, Rack K, Valensi F, Garand, Vekemans M, Flandrin G, Macintyre EA. Genetic analysis of splenic lymphoma with villous lymphocytes: a Groupe Français d'Hématologie Cellulaire (GFHC) study. *Br J Haematol* 1998; 101: 712-721.

Tsimberidou AM, Catovsky D, Schlette E, O'Brien S, Wierda WG, Kantarjian H, Garcia-Manero G, Wen S, Do KA, Lerner S, Keating MJ. Outcomes in patients with splenic marginal zone lymphoma and marginal zone lymphoma treated with rituximab with or without chemotherapy or chemotherapy alone. *Cancer* 2006; 117: 125-135.

Udayakumar AM, Al-Bahri M, Burney IA, Al-Haddabi I. Follicular Dendritic Cell Sarcoma: Cytogenetics and pathological findings. *Sultan Qaboos Univ Med J*. 2015; 15: 411-414.

Vega F, Cho-Vega FH, Lennon PA, Luthra MG, Bailey J, Breeden M, Jones D, Medeiros LJ, Luthra R. Splenic marginal zone lymphomas are characterized by loss of interstitial regions of chromosome 7q, 7q31.32 and 7q36.2 that include the protection of telomere 1 (*POT1*) and sonic hedgehog (*SHH*) genes. *Br J Hematol* 2008; 142: 216-226.

Watkins AJ, Hamoudi RA, Zeng N, Yan Q, Huang Y, Liu H, Zhang J, Braggio E, Fonseca R, de Leval L, Isaacson PG, Wotherspoon A, McPhail ED, Dogan A, Du MQ. An integrated genomic and expression analysis of 7q deletion in splenic marginal zone lymphoma. *PLOS ONE* 2012; e44997.

Wheater PR, Burkitt HG, Daniels VG. *Histologia funcional*. Segunda edición 1987. Editorial JIMS. Cap.11, pp. 173-177.

Wlodarska I, Veyt E, De Paepe P, Vandenberghe P, Nooijen P, Theate I, Michaux L, Sagaert X, Marynen P, Hagemeijer A, De Wolf-Peeters C. FOXP1, a gene highly expressed in a subset of diffuse large B-cell lymphoma, is recurrently targeted by genomic aberrations. *Leukemia* 2005; 19: 1299-1305.

Woessner S, Florensa L. *La citología óptica en el diagnóstico hematológico*. FEHH: Madrid 2006; cap. 11.

Wolff DJ, Bagg A, Cooley LD, Dewald GW, Hirsch BA, Jacky PB, Rao KW, Rao PN. Guidance for fluorescence in situ hybridization testing in hematologic disorders. *J Mol Diag* 2007; 9: 134-143.

Yu B, Zhou X, Li B, Xiao X, Yan S, Shi D. FOXP1 expression and its clinicopathologic significance in nodal and extranodal diffuse large B-cell lymphoma. *Ann Hematol* 2011; 90: 701-708.

Zech L, Haglund U, Nilsson K, Klein G. Characteristic chromosomal abnormalities in biopsies and lymphoid-cells lines from patients with Burkitt and non-Burkitt lymphomas. *Int J Cancer* 1976; 17: 47-56.

Zhu D, Oscier DG, Stevenson FK. Splenic lymphoma with villous lymphocytes involves B-cells with extensively mutated Ig heavy chain variable region genes. *Blood* 1995; 85: 1603-1607.

## **V III ANNEX**



## **1.Solucions per a les tècniques de citogenètica convencional i hibridació *in situ* fluorescent (FISH)**

### Alíquota de TPA

Alíquota de medi de cultiu

DMSO (Sigma<sup>®</sup>)

TPA (Sigma<sup>®</sup>)

La seva preparació consisteix en dissoldre el vial de TPA de la casa comercial (1 mg) en 1 mL de DMSO (proporció 1:1). Es conserva en alíquotes de 10 µL a -20°C i protegides de la llum ja que el TPA és fotosensible. En el moment en que sigui necessari es complementen amb un 1 mL de medi de cultiu complet. Aquesta nova alíquota es conserva a 4°C també protegida de la llum.

### Fixador Carnoy

3 parts de metanol per anàlisi (BDH Prolabo<sup>®</sup>)

1 part d'àcid acètic glacial per anàlisi (Merck<sup>®</sup>).

\*Es prepara nou cada dia i es manté a TA.

### Hipotònica (KCl 0'075 M)

2'79 gr clorur de potassi (Merck<sup>®</sup>)

500 mL aigua destil·lada

\*Es conserva a 4°C 15 dies.

### Colorant de Wright

1'25 gr *Wright Stain, Certified* (Sigma<sup>®</sup>)

500 mL de metanol (BDH Prolabo<sup>®</sup>)

Es tapa la solució amb paper d'alumini i es deixa en agitació durant dues hores. Posteriorment es filtra mitjançant un embut amb paper de filtre a una ampolla també protegida de la llum. Es col·loca a l'estufa de 37°C durant 72 hores i passat aquest temps ja es pot utilitzar. Es conserva a TA i caduca als quinze dies.

Tampó de Sörensen

2'269 gr de potassi dihidrogenfosfat (Merck®)

2'969 gr de di-sodi hidrogenfosfat di-hidrat (Merck®)

500 mL d'aigua destil·lada

\*Es conserva a 4°C i caduca als seixanta dies.

Acetat sòdic (NaAc) 3M

408'1 gr d'acetat de sodi (Merck®)

1L d'aigua destil·lada

\*Es conserva a TA.

Solució de formamida al 50%

15 mL 20xSSC

60 mL aigua destil·lada

75 mL de formamida (Merck®)

- s'ajusta el Ph a 6'2 – 6'3

\*Es conserva a 4°C i es pot utilitzar durant quinze dies.

Solució de formamida al 70%

35 mL formamida (Merck®)

10 mL aigua destil·lada

5 mL 20xSSC

- s'ajusta el Ph a 6'2 – 6'3 (són 3 gotes d'HCl 1M)

\*Es conserva a 4°C i es pot utilitzar durant quinze dies.

2XSSC

100 mL 20xSSC

900 mL d'aigua destil·lada

\*Es conserva a 4°C.



2XSSC al 0'1% de NP-40

100 mL 20xSSC

1 mL NP-40 (Sigma®)

Enrasar fins a 1L amb aigua destil·lada

\*Es conserva a 4°C.

EDTA

5 mL EDTA 100X (Biological Industries®)

500 mL d'aigua destil·lada

\*Es conserva a 4°C.

PBS 1X

100 mL PBS 10X (Roche®)

900 mL d'aigua destil·lada

\*Es conserva a 4°C.

MgCl<sub>2</sub>

20'33 mg MgCl<sub>2</sub> (Merck®)

100 mL aigua destil·lada

\*Es conserva a TA.

20XSSC

88'23 gr/L TriNaCitrat (Merck®)

175'32 gr/L NaCl (Merck®)

1 L d'aigua destil·lada

\*Es conserva a TA.

Solució de HCl

0'5 mL HCl 1M + 49'5 mL d'aigua destil·lada

\*Es prepara i s'utilitza al moment.

Estoc de pepsina cristal·lina al 10% (100 mg/mL)

20 mg de pepsina

0'2 mL d'aigua destil·lada

\*Se'n fan alíquotes de 10  $\mu$ L, i es conserven a -20°C.

PBS 1X/MgCl<sub>2</sub>

47'5 mL de PBS 1X + 2'5 mL de solució de MgCl<sub>2</sub>

Solució de rentat II (1xSSC)

12'5 mL 20xSSC

237'5 mL d'aigua destil·lada

\*Es prepara i s'utilitza al moment.

Solució de rentat III (4xSSC/0,1% NP-40)

100 mL 20xSSC

400 mL d'aigua destil·lada

0'5 mL NP-40

\*Es prepara i s'utilitza al moment.

## 2.Publicacions relacionades amb la Tesi Doctoral

Les publicacions a les que ha donat lloc la present memòria es detallen a continuació:

### 1.1 Primer treball

**Autors** (per ordre de signatura): Baró C, Salido M, Domingo A, Granada I, Colomo L, Serrano S, Solé F.

**Títol:** Translocation t(9;14)(p13;q32) in cases of splenic marginal zone lymphoma.

**Revista:** Haematologica 2006; 91: 1289-1291.

### 1.2 Segon Treball

**Autors** (per ordre de signatura): Baró C, Salido M, Espinet B, Astier L, Domingo A, Granada I, Millà F, Carrió A, Costa D, Luño E, Hernández JM, Campo E, Florensa L, Ferrer A, Salar A, Bellosillo B, Besses C, Serrano S, Solé F.

**Títol:** New chromosomal alterations in a series of 23 splenic marginal zone lymphoma patients revealed by Spectral Karyotyping (SKY).

**Revista:** Leuk Res 2008; 32: 727-736.

### 1.3 Tercer treball

**Autors** (per ordre de signatura): Baró C, Espinet B, Salido M, Colomo L, Luño E, Florensa L, Ferrer A, Salar A, Campo E, Serrano S, Solé F.

**Títol:** FOXP1 status in splenic marginal zone lymphoma: a fluorescence *in situ* hybridization and immunohistochemistry approach.

**Revista:** Histol Histopathol 2009; 24: 1399-1404.



### Translocation t(9;14)(p13;q32) in cases of splenic marginal zone lymphoma

**Translocation t(9;14)(p13;q32) involving PAX5 and IGH genes was first described in lymphoplasmacytic lymphoma. New data suggest that this translocation is not restricted to a specific morphologic subtype but occurs in other B-cell lymphomas. We present three cases with a diagnosis of splenic marginal zone lymphoma and t(9;14) confirmed by fluorescent *in situ* hybridization.**

Haematologica 2006; 91:1289-1291

(<http://www.haematologica.org/journal/2006/09/1289.html>)

Translocation t(9;14)(p13;q32) involving *PAX5* and *IGH* genes was first described in lymphoplasmacytic lymphoma.<sup>1</sup> However, Tracy *et al.*<sup>2</sup> recently studied a series of 37 low-grade B-cell lymphomas: 13 lymphoplasmacytic lymphomas, 18 marginal zone lymphomas (8 with the splenic form) and 6 small lymphocytic lymphomas by fluorescence *in situ* hybridization (FISH) with a *PAX5* probe and did not detect any evidence of *PAX5* rearrangement, suggesting that t(9;14)(p13;q32) is not frequent in lymphoplasmacytic lymphomas and in other low-grade B-cell lymphomas. Poppe *et al.*<sup>3</sup> reported *PAX5/IGH* rearrangement in 10 B-cell lymphomas using FISH. This aberration was detected in four cases of histiocyte-rich, T-cell-rich B-cell lymphomas and in two cases of post-transplantation diffuse large B-cell lymphomas. They concluded that t(9;14)(p13;q32) was not restricted to a specific morphologic subtype and occurred in different clinical settings with advanced disease and adverse prognosis.

Given the heterogeneity of lymphomas associated with t(9;14)(p13;q32) illustrated by the previous reports,<sup>1-4</sup> our aim was to describe the involvement of this translocation in splenic marginal zone lymphoma (SMZL). The subjects were patients referred from different hospitals affiliated to the Spanish Cytogenetic Working Group (GCECGH, AEHH) and from *Red de Grupos de Linfomas* (G03/179)

between 2000 and 2005. Among our series of 160 SMZL (*unpublished data*), the t(9;14)(p13;q32) was detected by spectral karyotyping (SKY) in three cases with a complex karyotype (Figure 1A). The patients were diagnosed according to the criteria of Mollejo *et al.*<sup>5</sup> The diagnosis of case #1 was suggested by clinical, morphological, cytological, immunophenotypic, and cytogenetic studies from peripheral blood. Clinical, histological and cytogenetic data are summarized in Table 1.

FISH studies were performed with the aim of confirming the involvement of the *PAX5* and *IGH* genes. We used split probes with 5' sequences labeled in red and 3' sequences in green according to the Dako (*PAX5*, Dako, Denmark) and Vysis (*IGH*, Vysis, Downers Grove, IL, USA) data sheets. A minimum of 200 interphase nuclei and five metaphase cells were scored (Figure 1BC). To evaluate the cut-off of these locus-specific probes we analyzed five healthy donors.

In case #2, conventional cytogenetics revealed metaphases with t(14;19) as a sole translocation and SKY also revealed a t(9;14) in a low proportion of cells. One year after the diagnosis, G-banding was able to detect the two translocations in a large proportion of cells. According to FISH studies of paraffin-embedded spleen samples, this patient showed double translocation of the *IGH* gene in a low proportion of cells. A large population of cells presented only one rearrangement, suggesting that the t(9;14) was a secondary aberration. We performed FISH with a *BCL3* split probe (DAKO, Denmark) to check the involvement of this gene in t(14;19) (Figure 1D). The FISH results are summarised in Table 2.

Only a few series of SMZL patients have reported chromosomal data and these revealed a high incidence of deletions of 7q, gains of 3q and a few cases with translocations involving 14q32.<sup>6-7</sup> To our knowledge, only one case of SMZL with a complex translocation t(2;9;14)(p12;p13;q32) involving the *PAX5* gene has been previously reported.<sup>8</sup> Reviewing all reported cases with t(9;14), it is interesting to note that all of them had complex karyotypes and in some patients t(9;14) was detected after the use of multicolor FISH techniques.

Among additional anomalies in cases with t(9;14), involvement of chromosome 1 (usually duplications in 1q) and trisomy 3 have been found most frequently. Our three

**Table 1.** Clinical data in three patients with splenic marginal zone lymphoma (SMZL) and t(9;14)(p13;q32).

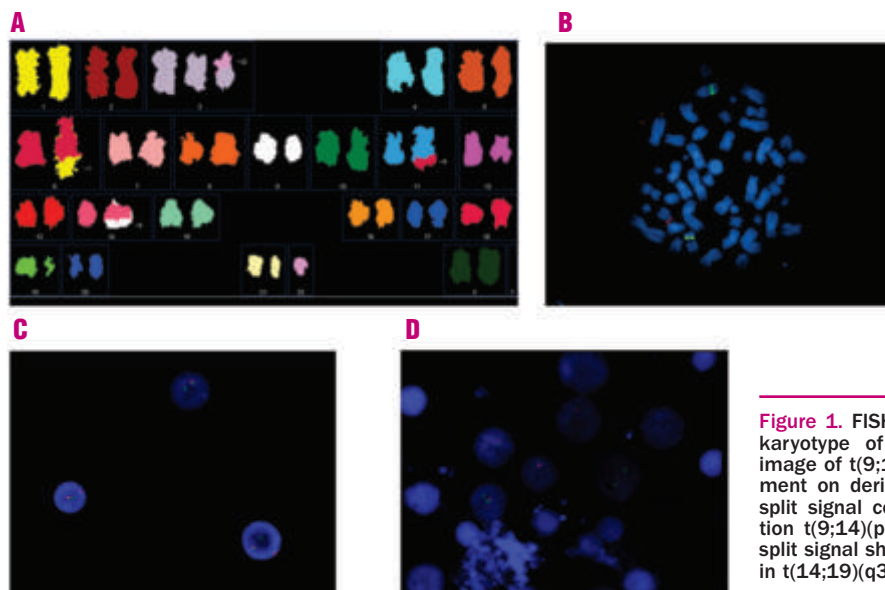
Case	Age/Sex	Splenomegaly	Bone marrow involvement	Immunophenotype (tissue)	Histology	Karyotype/SKY (tissue)
1 <sup>†</sup>	69/F	Yes	No	CD10-, CD20+, CD79b-, CD5-, CD23+, CyclinD1- (PB)	Not done	46-49,XX,+3, der(3)t(3;22)(p11;q11), der(6)t(1;6)(q10;q27), del(7)(q32), der(11)t(6;11)(?;q23), t(9;14)(p13;q32), -22, +mar(2), +mar(9), +mar(11) [cp5] (PB)
2	73/F	Yes 500 g	Yes	CD10-, CD20+, CD79b+, IgD+, CD5-, P53-, Cyclin D1- (BM)	SMZL diffuse pattern	47-49,X,-X,+3, der(3)t(3;8)(8pter?8p11::3p11?3qter), +7, der(8)t(3;8)(3?q::8p11?8q22::3?q), t(9;14)(p13;q32), t(14;19)(q32;q13), -21, +mar(11), +r(1)[cp4] (BM)
3	73/F	Yes 2279 g	Yes	CD10-, CD20+, CD79a+, CD43-, IgD+, IgM+, CD5-, CD23-, P53-, Cyclin D1- (PB)	SMZL diffuse pattern	46-49,XX, dup(1)(q22q32), +4, del(4)(p11), del(4)(p11), +7, del(9)(p21), der(9)t(9;14)(9pter?9p13::14q32?14q11::9p13?9qter), t(2;16)(?;q22), +mar (?4)[cp3] (PB)

†: died; PB: peripheral blood; BM: bone marrow.

**Table 2.** FISH studies of the three cases of SMZL and *PAX5/IGH* rearrangement.

Case	Aberration	Tissue Sample	Probe	Conclusions and comments
1	t(9;14)(p13;q32)	PB	<i>PAX5</i> split <i>IGH</i> split	reciprocal translocation <i>PAX5/IGH</i>
2	t(9;14)(p13;q32)	BM	<i>PAX5</i> split <i>IGH</i> split	reciprocal translocation <i>PAX5/IGH</i>
	t(14;19)(q32;q13)	BM Spleen	<i>BCL3</i> split <i>IGH</i> split <i>PAX5</i> split <i>IGH</i> split	reciprocal translocation <i>BCL3/IGH</i>  double split signal reciprocal translocations <i>PAX5/IGH</i> <i>BCL3/IGH</i>
3	t(9;14)(p13;q32)	PB	<i>PAX5</i> split <i>IGH</i> split	reciprocal translocation <i>PAX5/IGH</i>
		Spleen	<i>PAX5</i> split <i>IGH</i> split	

PB: peripheral blood; BM: bone marrow.



**Figure 1.** FISH results. **A.** SKY of the complex karyotype of case #1 as a representative image of t(9;14)(p13;q32); **B.** *PAX5* rearrangement on derivative 14 (case #2); **C.** The *IGH* split signal confirms the reciprocal translocation t(9;14)(p13;q32) (case #3); **D.** The *BCL3* split signal shows the involvement of this gene in t(14;19)(q32;q13) (case #2).

patients with SMZL also had complex karyotypes with partial gains of 1q (3/3 cases) and trisomies 3 and 7 (2/3 cases). In two of them, t(9;14) was detected by SKY. Poppe *et al.* reported that t(9;14) was associated with an adverse prognosis but it could be argued that the poor prognosis of t(9;14) is due to the complexity of the karyotypes rather than to the t(9;14). In our series, one patient died 4 years after being diagnosed and the follow-up of the other two cases is too short to determine the prognostic significance of this aberration in SMZL.

A histological evaluation of the spleen was available for two of our three patients. Interestingly, both these cases had a diffuse splenic pattern uncommon in this type of lymphoma. In one of them, the infiltration was just detected after the molecular study of *IGH* rearrangement (Genescan). Mollejo *et al.*<sup>8</sup> considered cases with a diffuse pattern of infiltration a putative variant of SMZL, with some distinctive features, such as lack of micronodules, marginal morphology with abundant cytoplasm, p53 inactivation and cutaneous involvement. Our two patients did

not, however, have these features.

To conclude, our findings confirm the low incidence of t(9;14)(p13;q32) in SMZL and that the histology of the spleen of this entity could be atypical. In the light of both the complexity of the karyotypes and the results obtained by G-banding and FISH analysis in case #2, we hypothesize that t(9;14) could be a secondary event. Further cases and follow-up of patients with this anomaly are necessary for a better understanding of the role of *PAX5* in SMZL.

Cristina Baró,\* Marta Salido,\* Alicia Domingo,° Isabel Granada,\* Lluís Colomo,® Sergi Serrano,\* Francesc Solé\*\*

\*Laboratori de Citogenètica i Biologia Molecular, Servei de Patologia, Hospital del Mar, IMAS, IMIM, URNHE-PRBB, URTTS-PRBB, Barcelona, Spain; °Escola de Citologia Hematològica Soledad Woessner-IMAS; °Servei d'Hematologia, ICO, Ciutat Sanitària i Universitària de Bellvitge, Hospital Prínceps d'Espanya, L'Hospitalet de Llobregat, Spain; \*Servei d'Hematologia, Hospital Germans Trias i Pujol, Badalona, Spain; ®Servei d'Hematopatologia, Hospital Clínic i Provincial, Barcelona, Spain

*Acknowledgments: this work was partially supported by grants from ISCIII, Ministerio de Sanidad y Consumo (G03/179, PI030394 and PI051072) and Fundació La Marató de TV3 (Càncer). We would like to thank Blanca Espinet, Anna Carrió, Vicens Romagosa, Fuensanta Millà, Paula Blanco and Elias Campo for helpful discussion and support.*

*Funding: this work has been partially supported by grants from ISCII, Ministerio de Sanidad y Consumo (G03/179, PI030394 and PI051072) and Fundació La Marató de TV3 (Càncer). We would like to thank Blanca Espinet, Anna Carrió, Vicens Romagosa, Fuensanta Millà, Paula Blanco and Elias Campo for helpful discussion and support.*

*Key words: PAX5, IGH, SKY, SMZL.*

*Correspondence: Cristina Baró Llàcer, Laboratori de Citogenètica i Biologia Molecular, Servei de Patologia, Hospital del Mar, Passeig Marítim, 25-29, 08003 Barcelona, Spain. Phone: international +34.9.32483521. Fax: international +34.9.32483131. E-mail: cbaro@imim.es*

## References

1. Offit K, Parsa NZ, Filippa D, Jhanwar SC, Chaganti RSK. t(9;14)(p13;q32) denotes a subset of low-grade non-Hodgkin's lymphoma with plasmacytoid differentiation. *Blood* 1992; 80: 2594-9.
2. Tracy IG, Wrede JE, Bangs CD, Cherry AM, Warnke RA, Arber DA. Low-grade B-cell lymphomas with plasmacytic differentiation lack PAX-5 gene rearrangements. *J Mol Diag* 2005;7:346-51.
3. Poppe B, De Paepe P, Michaux L, Dastugue N, Bastard C, Herens C, et al. PAX-5/IgH rearrangement is a recurrent finding in a subset of aggressive B-NHL with complex chromosomal rearrangements. *Genes Chromosomes Cancer* 2005;44:218-23.
4. Morrison AM, Jager U, Chott A, Schebesta M, Haas OA, Busslinger M. Deregulated PAX-5 transcription from a translocated IgH promoter in marginal zone lymphoma. *Blood* 1998; 92: 3865-78.
5. Mollejo M, Menarguez L, Lloret E, Sanchez A, Campos E, Algara P, et al. Splenic marginal zone lymphoma: a distinctive type of low-grade B-cell lymphoma. *Am J Surg Pathol* 1995;19:1146-57.
6. Solé F, Salido M, Espinet B, Garcia JL, Martínez Climent JA, et al. Splenic marginal zone B-cell lymphomas: two cytogenetic subtypes, one with gain of 3q and the other with loss of 7q. *Haematologica* 2001;86:71-7.
7. Sonoki T, Harder L, Horsman DE, Karran L, Taniguchi I, Willis TG, et al. Cyclin D3 is a target gene of t(6;14)(p21.1;q32.3) of mature B-cell malignancies. *Blood* 2001;98:2837-44.
8. Mollejo M, Algara P, Mateo MS, Sánchez-Beato M, Lloret E, Medina MT, et al. Splenic small B-cell lymphoma with predominant red pulp involvement: a diffuse variant of splenic marginal zone lymphoma? *Histopathology* 2002;40:22-30.

## New chromosomal alterations in a series of 23 splenic marginal zone lymphoma patients revealed by Spectral Karyotyping (SKY)

Cristina Baró<sup>a,b,\*</sup>, Marta Salido<sup>a,b,1</sup>, Blanca Espinet<sup>b,1</sup>, Laura Astier<sup>b</sup>, Alicia Domingo<sup>d</sup>, Isabel Granada<sup>e</sup>, Fuensanta Millà<sup>e</sup>, Ana Carrió<sup>f</sup>, Dolors Costa<sup>f</sup>, Elisa Luño<sup>g</sup>, Jesús M<sup>a</sup> Hernández<sup>h</sup>, Elias Campo<sup>f</sup>, Lourdes Florensa<sup>b,1</sup>, Ana Ferrer<sup>b</sup>, Antonio Salar<sup>c</sup>, Beatriz Bellosillo<sup>b</sup>, Carles Besses<sup>c</sup>, Sergi Serrano<sup>b</sup>, Francesc Solé<sup>b,1</sup>

<sup>a</sup> Dept. Biologia Animal, Vegetal i Ecologia, Unitat d'Antropologia Biològica, Facultat de Biociències, Universitat Autònoma de Barcelona, Bellaterra, Spain

<sup>b</sup> Laboratori de Citogenètica i Biologia Molecular, Laboratori de Citologia Hematològica, Servei de Patologia, Hospital del Mar, Passeig Marítim, URNHE-IMAS/IMIM, URTTS-IMAS/IMIM 25-29, 08003 Barcelona, Spain

<sup>c</sup> Servei d'Hematologia Clínica, Hospital del Mar, URNHE-IMAS/IMIM, Barcelona, Spain

<sup>d</sup> Servei d'Hematologia, Ciutat Sanitària i Universitària de Bellvitge, L'Hospitalet de Llobregat, Spain

<sup>e</sup> Servei d'Hematologia, Hospital Germans Trias i Pujol, Badalona, Spain

<sup>f</sup> Unitat d'Hematopatologia, Hospital Clínic i Provincial, Barcelona, Spain

<sup>g</sup> Servicio de Hematología, Hospital Universitario Central de Asturias, Oviedo, Spain

<sup>h</sup> Servicio de Hematología, Hospital Clínico Universitario, Centro de Investigación del Cáncer, Universidad de Salamanca-CIC, Salamanca, Spain

Received 5 July 2007; received in revised form 8 August 2007; accepted 18 September 2007

Available online 19 November 2007

---

### Abstract

Splenic marginal zone lymphoma (SMZL) is a B-cell lymphoproliferative disorder with characteristic clinical, immunophenotypic, cytological and histological features. Some karyotypic abnormalities have been related to this disorder and most of them are usually complex and difficult to define. The aim of present study was to characterize new chromosomal aberrations involved in this disease. We performed conventional banding cytogenetics and Spectral Karyotyping (SKY) technique in 23 patients diagnosed with SMZL having a complex karyotype among a series of 160 SMZL cases. Del(7)(q22–q32) and trisomy 3/3q were the most common chromosomal aberrations. In addition, new translocations involving chromosomes 3, 6, 8, 9, 12 and 14q32 region were detected.

© 2007 Elsevier Ltd. All rights reserved.

**Keywords:** Cytogenetics; SKY; FISH; Splenic marginal zone lymphoma

---

### 1. Introduction

Splenic marginal zone lymphoma (SMZL) is a recognized entity in which the clinical, morphological, immunophenotypic and histological characteristics are well established

[1–3]. Bone marrow involvement in the absence of significant lymphadenopathy is commonly seen at presentation. Splenomegaly and a moderate lymphocytosis are usually present. Nevertheless, splenomegaly is a common feature observed in other B-cell malignancies that have distinct clinical, immunophenotypic and histological features from SMZL, but may also show similarities [4]. SMZL may manifest circulating monocytoid B-cells, with or without the presence of thin and polar cytoplasmic microvilli. Tumour cells express surface IgM and IgD, and are CD20+, CD79a+, CD5–, CD10–, CD23–, CD43+/- and cyclin D1–. A

---

\* Corresponding author at: Laboratori de Citogenètica i Biologia Molecular, Servei de Patologia, Hospital del Mar, Passeig Marítim, 25-29, 08003 Barcelona, Spain. Tel.: +34 93 248 35 21; fax: +34 93 248 31 31.

E-mail address: [cbaro@imim.es](mailto:cbaro@imim.es) (C. Baró).

<sup>1</sup> Escola de Citologia Hematològica Soledad Woessner-IMAS, Spain.



minority of cases (<20%) present aberrant CD5 expression, a marker associated to early dissemination and aggressive disease [5,6].

The associated cytogenetic abnormalities are expected to be helpful in differential diagnosis. However, chromosome studies with a large number of patients have been previously reported only in a few series [7–12]. In our previous experience [10], we found a high incidence of 7q deletions, gains of 3q and several aberrations involving chromosomes 1, 3, 7 and 8. Translocations affecting heavy chain immunoglobulin locus at 14q32 region are frequent in B-cell lymphomas although they have not been described in many cases of SMZL [13].

In situ hybridization studies have permitted to refine cytogenetic data and to detect new chromosomal aberrations that could help to identify the mechanisms involved in SMZL [14].

Spectral Karyotyping (SKY) is a modification to traditional karyotyping that permits more precise identification of chromosomal aberrations. This fluorescence in situ hybridization (FISH) based technique introduced by Schröck et al. [15] uses chromosome painting probes to recognize each pair of chromosomes with unique and different spectral characteristics. Since homologous pairs are painted with the same colour, aberrations and cross-overs are easily identified. In cases with a complex karyotype, G-banding is often compromised by several obstacles and it is not sufficient to entirely interpret the chromosomal aberrations, because multiple translocations may be difficult to be defined. The use of SKY in these cases allows to recognize all the aberrations in a single hybridization.

The aim of the present study was to identify by SKY novel chromosomal aberrations in SMZL patients with a complex karyotype.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Patients

In this study, we applied SKY technique in 23 cases diagnosed with SMZL from 2003 to 2006 and referred from different hospitals belonging to the Spanish Cytogenetic Working Group and from *Red de Grupos de Linfomas* (G03/179). Diagnosis of SMZL was established according to the WHO criteria and was confirmed by morphologic and immunophenotypic studies. Cases were selected, among a series of 160 SMZL (unpublished data), on the basis of complex karyotype and a sufficient number of metaphases available. Sixteen peripheral blood, six bone marrow aspiration and one spleen samples were collected and analyzed. No sex predominance was observed (12 males and 11 females) and the mean age was of 72 (range: 46–89 years) (Table 1). When spleen specimen was not available (12 cases), diagnosis was made by means of morphologic and immunophenotypic studies from peripheral blood.

### 2.2. Cytogenetic studies

Cytogenetic studies were performed in all patients either at diagnosis prior to any treatment or at the time of the splenectomy. Chromosome analyzes were carried out following G-banding standard procedures on lymphoid cells from peripheral blood, bone marrow or spleen using TPA as mitogen. A minimum of 20 metaphases were analyzed and karyotypes were described according to the International System for Human Cytogenetic Nomenclature (ISCN) [16].

Conventional G-banding cytogenetic studies were performed at the reference hospitals. The results were centrally collected and reviewed by the main investigators (CB, MS, BE and FS).

### 2.3. Spectral Karyotyping (SKY)

SKY was performed with Spectral Karyotyping reagents (SKYPaint™, Applied Spectral Imaging Ltd., Israel) as previously reported [15]. Metaphase preparations obtained from stored suspensions and aged for one night at 65 °C were used for SKY. Hybridization was performed for 2 days at 37 °C. Biotinylated probes were detected using avidin conjugated to Cy5 (Amersham Life Sciences) and digoxigenylated with mouse anti-digoxigenin antibodies followed by Cy5.5 conjugated sheep anti-mouse antibodies. Finally, chromosomes were counterstained with 4,6-diamino-2-phenylindole (DAPI) (Abbott-Vysis, Madrid, Spain). Images were obtained with a SD200 Spectratube (Applied Spectral Imaging, Migdal Ha-Emck, Israel) mounted on a Nikon Eclipse E600 microscope (Nikon Corporation IZASA, S.A., Barcelona, Spain) using a custom designed optical filter (SKY-1) (Chroma Technology, Brattleboro, VT). A minimum of 15 metaphases per case were captured. A structural anomaly was only accepted when it appeared in at least two metaphases. The main investigators (CB, LA and FS) centrally reviewed SKY images.

### 2.4. Fluorescence in situ hybridization (FISH) analysis

In order to verify some aberrations, we performed FISH using commercial probes in specimens that presented translocations involving known genes: *BCL-6* at 3q27, *MYC* at 8q24, *RBI* at 13q14, *IGH* at 14q32, *P53* at 17p13 (Abbott-Vysis, Madrid, Spain), *BCL-3* at 19q13, *IGK* at 2p12 and *PAX-5* at 9p13 (Dako Diagnósticos S.A., Barcelona, Spain). Whole Chromosome painting (WCP) probe of chromosome 17 (MetaSystems, IZASA S.A., Barcelona, Spain) was used to confirm an isochromosome 17q. *CDK6* gene was studied using a non-commercial probe. It was performed as dual-color break-apart probe by means of Bacterial Artificial Chromosome (BAC) clones (centromeric: RP11-514K1; telomeric: CTD-2260H18).

Table 1  
Clinical and laboratory features of the 23 patients with SMZL at the time of cytogenetic analysis

Case	Age/sex	Splenomegaly/splenectomy	Immunophenotype	Bone marrow involvement	Tissue samples analyzed by SKY
1	89/M	Yes/no	CD20+,CD5-,CD10-,CD79b-	N.D.	PB
2	59/F	Yes/yes	CD20+,CD5-,CD10-,CD79b+	YES	Spleen
3	69/F	Yes/no	CD20+,CD5-,CD10-,CD79b-	YES	PB
4	74/F	Yes/yes	CD20+,CD5+,CD10-,CD79b+	YES	PB
5	74/F	Yes/yes	CD20+,CD5+,CD10-,CD79b+	N.D.	PB
6	77/F	No/no	CD20+,CD5+,CD10-,CD79b+	YES	PB
7	59/M	Yes/yes	CD20+,CD5-,CD10-,CD79b+	YES	BM
8	46/F	Yes/yes	CD19+,CD5-,CD10-,CD79b+	YES	BM
9	81/M	Yes/yes	CD20+,CD5-,CD10-,CD79b+	YES	PB
10	77/F	No/no	CD20+,CD5-,CD10-,CD79b+	YES	BM
11	73/F	Yes/yes	CD20+,CD5-,CD10-,CD79b+	YES	PB
12	58/F	Yes/yes	CD20+, CD5-, CD10-,	YES	PB
13	75/F	Yes/yes	CD20+,CD5-,CD10-,CD79b+	YES	BM
14	75/M	No/no	CD20+,CD5-,CD10-,CD79b+	YES	PB
15	55/M	Yes/yes	CD20+,CD5-,CD10-,CD79b+	YES	PB
16	81/F	Yes/no	CD20+,CD5-,CD10-,CD79b+	YES	BM
17	60/M	No/no	CD22+,CD5-,CD10±,CD79b+	YES	PB
18	80/M	No/no	CD20+,CD5-, CD10-,CD79b+	YES	PB
19	85/M	No/no	CD20+,CD5-,CD10-,CD79b+	N.D.	PB
20	79/M	No/no	CD20+,CD5-,CD10-,CD79b-	YES	PB
21	84/M	No/no	CD20+,CD5+,CD10-,CD79b+	YES	PB
22	66/M	Yes/yes	CD20+,CD5+,CD10-	YES	BM
23	84/M	Yes/no	CD20+,CD5+(56%),CD10-,CD79b+	N.D.	PB

Abbreviations: M: male; F: female; N.D.: not done; PB: peripheral blood; BM: bone marrow.

FISH was performed in Carnoy fixed cells (peripheral blood and bone marrow) and in paraffin embedded tissues (spleen). Briefly, slides samples and probes were denatured at 75 °C for 5 min and hybridized overnight at 37 °C. Washes were performed at 45 °C in a series of 50% formamide, 2xSSC and 2xSSC 0.1% NP-40 solutions for 10 min, respectively. Samples were counterstained with 4,6-diamino-2-phenylindole (DAPI) (Abbott-Vysis, Madrid, Spain). Results were analyzed in a fluorescent Olympus BX51 microscope (Olympus Optical España, S.A., Barcelona, Spain) using the Cytovision software. In this study a minimum of 200 nuclei and 5 metaphases per case were analyzed by at least two different observers (CB, MS or BE).

### 3. Results

Multiple complex structural aberrations (derivative chromosomes, additions, translocations, deletions, duplications, isochromosomes, insertions, inversions, rings and marker chromosome) were detected by conventional banding cytogenetics. All patients had a mixture of normal and abnormal cells that in some cases made difficult the definition of the abnormal clone by SKY. Only in 6 out of 23 cases analyzed, conventional banding cytogenetics remained unchanged. In the remaining 17 (74%), SKY essentially contributed to disclose the definitive karyotype. The karyotypes presented in Table 2 are based on information obtained from both

methodologies. In Table 3, we have listed only the chromosomal abnormalities detected by conventional banding cytogenetics, for which there was a change in interpretation after SKY analysis. Twenty-six out of 113 (26/113, 23%) aberrations detected by conventional banding cytogenetics were undefined (additions, markers, rings and derivative chromosomes) and 20 of them (20/26, 77%) could be identified when SKY analysis was performed. Sixty-six (66/113, 58%) out of 113 alterations detected by G-banding, were confirmed by SKY and 15 (15/113, 13%) were redefined.

Only 12 (12/113, 10%) aberrations remained not informative after SKY analysis.

#### 3.1. Numerical aberrations

The most frequent numerical abnormalities detected by SKY were trisomy 3 (8 cases, 34%), trisomy 18 (6 cases, 26%) and trisomy 7 (4 cases, 17%). With regard to monosomies, it was more difficult to establish due to the limitation to distinguish a clonal abnormality from an occasional chromosomal loss. In our series, two cases presented monosomy of chromosome 6 (patients 12 and 15).

#### 3.2. Structural aberrations

The structural aberration most frequently observed was del(7)(q22-q32) (9 cases, 39%). In five cases del(7q) was

Table 2  
Cytogenetic and SKY findings in 23 patients with SMZL

Case	Conventional karyotype	SKY
1	44–46, XY, del(2)(p12), del(6)(q15), del(6)(q15), add(12)(q24), –17, +mar[cp4]/46, XY [16]	40–43, XY, +1, der(1)del(1)(p22)del(1)(q31), t(2;12)(p12;q24), del(6)(q15), del(6)(q15), del(17)(p13)[cp2]
2	47, XX, del(2)(q23), add(17)(p13), +mar, +2, 4 dmin [6]	42–48, XX, del(2)(q23), der(17)t(5;17)(?;p13), +dmin(1), +dmin(3)[cp4]
3	46, XX, der(6)t(1;6)(q10;q27), del(7)(q32), t(9;11)(p11;q25), add(14)(q32), add(19)(p13), –22, +mar [10] 46, XX [6]	46, XX, +3, der(3)t(3;22)(p11;q11), der(6)t(1;6)(q10;q27), del(7)(q32), der(11)t(6;11)(?;q25), t(9;14)(p13;q32), –22, +mar(11)[cp5]
4	47, XX, +3, t(5;6?)(p15;?), del(7)(q31q36) [10]/46, XX [10]	44–89, XX, +3, der(3)t(3;8)(q27;q24), del(6)(q15), der(6)t(6;8)(q23;q24), del(7)(q31q36), der(17;18)(q10;q10), +18, i(18)(q10)[cp4]
5	47, XX, t(3;18)(q11;p11), +18, der(18)t(3;18)(q11;p11) [4]/46, XX [16]	47, XX, t(3;18)(q11;p11), +18, der(18)t(3;18)(q11;p11) [2]
6	50, XX, +X?, +3, del(6)(q23), +7, +18 [6]/polyploid [4]/46, XX [10]	47–49, X, –X, +3, del(6)(q23), +7, +9, der(9)t(X;9)(?;q34), +18[cp6]
7	50, XY, +X, +3, +8, +18 [16]/46, XY [4]	50, XY, +X, +3, +8, +18 [3]
8	46, XX, der(13)t(3;13)(q21;q14) [3]/46, XX, del(7)(q22), der(13)t(3;13)(q21;q14) [15]/46, XX [2]	46, XX, del(7)(q22), der(13)t(3;13)(q21;q14) [2]
9	46, XY, der(6)t(3;6)(q11;q11), der(19)t(11;19)(q11;q13) [9]/46, XY [2]	46–47, XY, der(6)t(3;6)(q11;q11), der(19)t(12;19)(q11;q13), +mar(12)[cp4]
10	47, XX, dup(3)(q11q27), +7, del(7)(q22q34), del(7)(q22q34) [13]/46, XX [7]	47–48, XX, dup(3)(q11q27), +7, del(7)(q22q34), del(7)(q22q34), +11[cp2]
11	48, XX, dup(1)(q22q32), +4, del(4)(p11), del(4)(p11), +7, add(9)(p?24), del(9)(p21), der(12) [3]/48, XX, dup(1)(q22q32), +4, del(4)(p11), del(4)(p11), add(9)(p?24), del(9)(p21), der(12), +19 [7]	47–49, XX, dup(1)(q22q32), +4, del(4)(p11), del(4)(p11), +7, del(9)(p21), der(9)ins(9;14)(p13;q32q11), dup(12)(q11q15), +16, der(16)t(2;16)(?;q22)[cp3]
12	51, XX, del(2)(q22), +3, +8, i(8)(q10), +11, add(11)(q23), der(14)t(1;14)(q21;q32), +18, +18[cp5]/46, XX [29]	46–52, XX, del(2)(q22), +3, –6, +8, +11, der(14)t(1;14)(q21;q32), +18, +18[cp4]
13	49, X, –X, +3, del(3)(p12), +7, del(7)(q32q35), t(14;19)(q32;q13), +mar, +r [17]/46, XX [3]	47–49, X, –X, +3, der(3)t(3;8)(3pter q11::8q24 → 8qter), +7, del(7)(q32q35) der(8)t(3;8)(3?;8p11 → 8q22::3?q), t(9;14)(p13;q32), t(14;19)(q32;q13), +mar(11), +r(1)(p36q44)[cp4]
14	46, XY, add(17)(p13) [2]/46, XY, der(6)t(3;6)(q13;p25), add(17)(p13) [5]/46, XY, add(17)(p13), add(19)(q13) [4]	46, XY, der(6)t(3;6)(q13;p25), add(17)(p13), add(19)(q13)[cp2]
15	49, XY, +3, del(3)(q27), add(6)(p14), +18, +mar [17]/46, XY [3]	48, XY, +3, del(3)(q27), –6, inv(12)(p13q21), +18, +mar(2)[cp2]
16	45, XX, dic(2;12)(q37;p13) [3]/46, XX [17]	45, XX, dic(2;12)(q37;p13) [3]
17	47, XY, dup(1)(q14q44), del(7)(q32), +12, add(12)(p13), t(14;19)(q32;q13) [17]/46, XY [3]	47, XY, dup(1)(q14q44), del(7)(q32), +12, der(12)t(8;12)(q24;p13), t(14;19)(q32;q13) [2]
18	45–46, XY, t(1;14)(p22;q32), t(3;9;19)(?;q34;q13), +8, add(8)(q22), add(15)(q26), i(17)(q10), +mar[cp20]/46, XY [1]	44–47, XY, t(1;6)(p34;p23), +2, del(2)(q21), der(2)t(2;21)(p12;q11), +8, dic(8;15)(q24;q26), del(11)(q11), i(17)(q10), +mar(2), +mar(Y)[cp9]
19	46, XY, del(7)(q22q32), add(16)(p13) [4]/46, XY, del(7)(q22q32), add(11)(p15), add(16)(p13) [2]/46, XY [2]	46, XY, t(1;11)(p12;p15), del(7)(q22q32), der(16)t(12;16)(p12;p13)[cp5]
20	46, XY, inv(3)(p13q26), del(7)(q22q32), del(10)(q24q26), del(11)(q21q23) [17]/46, XY [8]	46, XY, inv(3)(p13q26), del(7)(q22q32), del(10)(q24q26), del(11)(q21q23) [2]
21	47, XY, del(3)(p23), add(7)(q32), add(9)(q34), del(9)(q22), del(13)(q14), –15, del(17)(p13) [17]/46, XY [3]	45–47, XY, del(3)(p23), der(7)t(7;9;13)(7p22 → 7q32::9q22 → 9q34::13q14 → 13qter), del(9)(q22), der(9)t(9;15)(q34;q15), del(13)(q14), –15, der(17)t(5;17)(q22;p13), der(22)t(20;22)(q11;p11)[cp4]
22	47, XY, del(7)(q21), +11 [5]/43, XY, +3, del(7)(q21), –9, –13, –14, –18 [10]/46, XY [5]	43–44, XY, del(7)(q21), –9, t(10;15)(q22;q22), der(13;14)(q10;q10), der(13;18)(q10;q10), der(17)t(9;17)(?;p13)[cp4]
23	45, XY, t(2;8)(p12;p11), del(14)(q22), –21 [19]/46, XY [1]	44–45, XY, t(2;7)(p12;q22), der(8)t(8;21)(q22;q11), del(14)(q22)[cp2]

associated with gains of 3q. Additions of chromosome material detected by conventional banding cytogenetics represented in most cases (10 out of 13, 77%) translocations when we applied SKY technique. Chromosomes most frequently implicated in translocations were (in order of frequency): 3, 14, 6, 12, 9, and 8. Accord-

ing to cytogenetic and SKY results, breakpoint sites commonly involved in rearrangements were: 3q11–q27, 14q32, 6q11–q27, 12p/q, 9p13/q and 8p/q. All translocation bands identified by G-banding and SKY were compared with the aim to detect new rearrangement breakpoints. Fig. 1 showed complex karyotypes of cases 13 and

Table 3  
Reinterpretation of cytogenetic data after SKY analysis (breakpoints based on G-bands)

Case	Conventional banding cytogenetics	SKY
1	+mar del(2)(p12), add(12)(q24)	+der(1)del(1)(p22)del(1)(q31) t(2;12)(p12;q24)
2	add(17)(p13) +mar, +2–4 dmin	der(17)t(5;17)(?:p13) +dmin(1), +dmin(3)
3	Not observed t(9;11)(p11;q25), add(14)(q32) add(19)(p13) –22 +mar	+3 der(11)t(6;11)(?:q25), t(9;14)(p13;q32) Not observed der(3)t(3;22)(p11;q11) +mar(11)
4	Not observed Not observed t(5;6?)(p15;q15) Not observed Not observed Not observed	der(3)t(3;8)(q27;?) del(6)(q15) der(6)t(6;8)(q23;?) dic(17;18)(q10;q10) +18 i(18)(q10)
6	+X? Not observed	+9 –X, der(9)t(X;9)(?:q34)
9	der(19)t(11;19)(q11;q13) Not observed	der(19)t(12;19)(q11;q13) +mar(12)
10	Not observed	+11
11	add(9)(p?24) der(12) +19 Not observed	der(9)t(9;14)(9pter → 9p13::14q32 → 14q11::9p13 → 9qter) dup(12)(q11q15) +16 der(16)t(2;16)(?:q22)
12	i(8)(q10) add(11)(q23)	Not observed Not observed
13	del(3)(p12) Not observed Not observed +mar +r	der(3)t(3;8)(3pter → 3q11::8p11 → 8pter) der(8)t(3;8)(3?q::8p11 → 8q22::3?q) t(9;14)(p13;q32) +mar(11) +r(1)(p36q44)
14	add(17)(p13)	17 material
15	add(6)(p14) +mar	inv(12)(p13q21) +mar(2)
17	add(12)(p13)	der(12)t(8;12)(q24;p13)
18	Not observed Not observed t(1;14)(p22;q32) t(3;9;19)(?:q34;q13) add(8)(q22), add(15)(q26) Not observed Not observed +mar	+2, del(2)(q21) der(2)t(2;21)(p12;q11) t(1;6)(p34;p23) not observed dic(8;15)(q22;q26) del(11)(q11) +mar(2) +mar(Y)
19	add(11)(p15) add(16)(p13)	t(1;11)(p12;p15) der(16)t(12;16)(p12;p13)
21	add(7)(q32), del(9)(q22), del(13)(q14) add(9)(q34) del(17)(p13) Not observed	der(7)t(7;9;13)(7p22 → 7q32::9q22 → 9q34::13q14 → 13qter) der(9)t(9;15)(q34;q15) der(17)t(5;17)(q22;p13) der(22)t(20;22)(q11;p11)
22	Not observed –13, –14 –13, –18 Not observed	t(10;15)(q22;q22) der(13;14)(q10;q10) der(13;18)(q10;q10) der(17)t(9;17)(?:p13)
23	t(2;8)(p12;p11) –21	t(2;7)(p12;q22) der(8)t(8;21)(q22;q11)

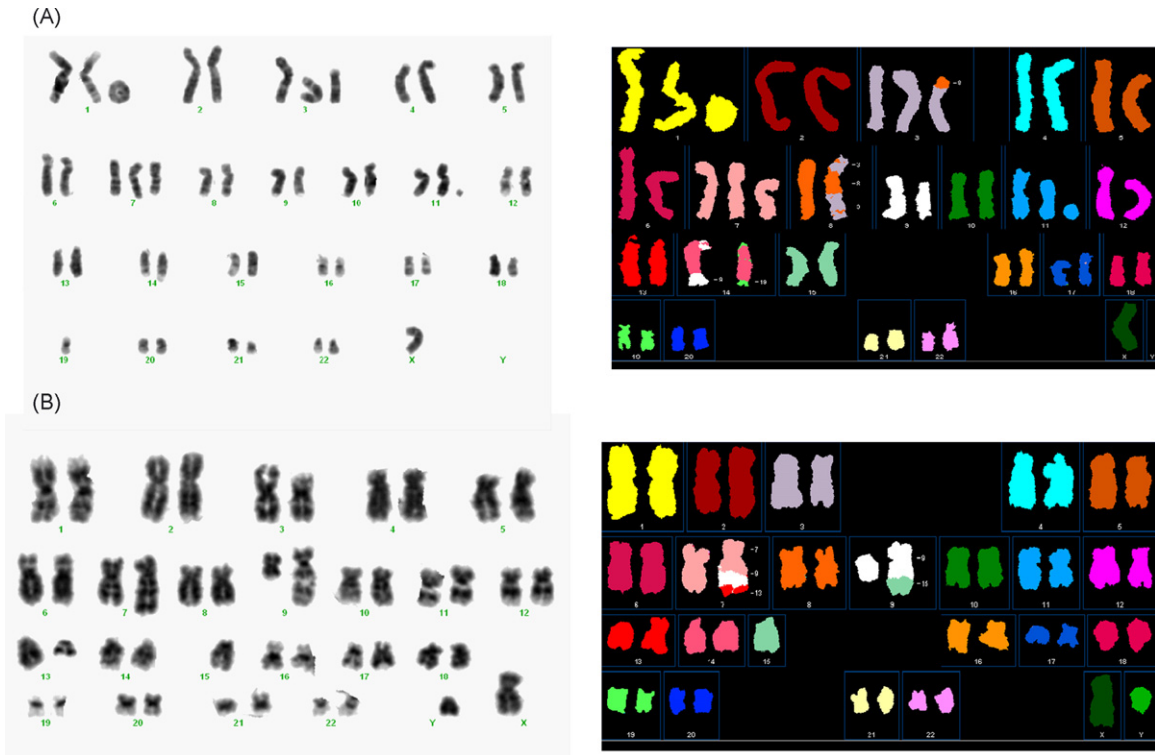


Fig. 1. Conventional banding cytogenetics of cases 13 and 21 (A and B, respectively) and its redefined karyotypes after application of SKY technique.

21 as an example to indicate the utility of SKY technique.

In cases of translocations affecting known genes, FISH with locus specific probes was performed in order to verify their involvement and to better characterize the break-points (Table 4). However, in some cases, G-banding, SKY and FISH analyzes could not be performed on the same tissue. In six out of seven patients (85%) with involvement of chromosome 17, *P53* deletion was confirmed by FISH studies (cases 1, 2, 14, 18, 21 and 22). Only in one patient (case 4), *P53* was not involved. Interestingly, case 14 presented an additional material in chromosome 17 that was initially interpreted as a translocation. However, SKY technique disclosed that all the additional material belonged to chromosome 17. We also applied FISH in this case using 17 whole chromosome painting probe and the presence of an isochromosome 17q was suggested.

*BCL-6* was studied in nine patients with 3q aberrations, including cases with breakpoints in 3q regions different than q27, with the aim to detect gains/losses of 3q and gains/losses of this gene due to juxtaposition on partner chromosomes. We found gains (three signals) in seven of them (77%), due to derivative chromosomes (cases 5, 8, 9, 13 and 14) and due to trisomy 3 (cases 4 and 15). The remaining patients (cases 10 and 20) presented two copies. No patient presented rearrangement of *BCL-6*. Patients with 13q14 locus involved in structural aberrations (cases 8, 21 and 22) were studied with *RBI*

probe and a loss was only found in one of them (case 21).

*MYC* could be implicated in structural alterations in four patients (cases 4, 13, 17 and 18). FISH studies revealed gain of this gene in cases 4, 17 and 18 due to non-reciprocal translocations implicating 8q. In patient 13, *MYC* was found translocated at 3p chromosome.

### 3.3. Translocations involving immunoglobulin genes

Among 23 patients studied by routine cytogenetics eight presented implication of 2p12 or 14q32 bands. Regarding the implication of 14q32, *PAX-5/IGH* rearrangement was confirmed by FISH in all three cases (cases 3, 11 and 13) with t(9;14)(p13;q32). In patients 13 and 17, the reciprocal translocation involving *BCL-3/IGH* genes was observed using split signal probes. Translocations of 2p12 chromosomal region were detected by SKY in three patients (cases 1, 18 and 23). Translocation t(1;14)(q21;q32) was observed in case 12. The involvement of *IGK* gene was confirmed in one of them (patient 23) in which it was rearranged with *CDK6* gene. Translocation t(2;12)(p12;q24) in case 1 and t(2;21)(p12;q11) in case 18 did not affect the light chain immunoglobulin locus. Case 18 presented moreover a complex karyotype by conventional banding cytogenetics, with a translocation t(1;14)(p22;q32). This alteration was excluded after the application of SKY. On the contrary, a t(1;6)(p34;p23) was detected. FISH technique could not be performed to check the involvement of *IGK* and *IGH* in cases



Table 4  
FISH analysis to study the aberrations defined by SKY

Case	Tissue sample	Anomaly	FISH probes	Results and comments
1	PB	t(2;12)(p12;q24)	<i>KAPPA</i>	Not rearranged
	PB	del(17)(p13)	<i>P53</i>	65% deletion
2	Spleen	der(17)t(5;17)(?:p13)	<i>P53</i>	78% deletion
3	PB	t(9;14)(p13;q32)	<i>PAX-5/IGH</i>	66.5% reciprocal translocation
4	PB	+3, der(3)t(3;8)(q27;q24)	<i>BCL-6</i>	46% three signals/no translocation
	PB	dic(17;18)(q10;q10)	<i>P53</i>	Normal
	PB	der(3)t(3;8)(q27;q24)	<i>MYC</i>	55% four signals/no translocation
5	PB	der(18)t(3;18)(q11;p11)	<i>BCL-6</i>	27% three signals
8	BM	der(13)t(3;13)(q21;q14)	<i>RBI</i>	Not rearranged
		der(13)t(3;13)(q21;q14)	<i>BCL-6</i>	32% three signals
9	PB	der(19)t(12;19)(q11;q13)	<i>BCL-3</i>	Not rearranged
		der(6)t(3;6)(q11;q11)	<i>BCL-6</i>	64% three signals/no translocation
10	BM	dup(3)(q11q27)	<i>BCL-6</i>	Normal
11	Spleen	t(9;14)(p13;q32)	<i>PAX-5/IGH</i>	61.5% reciprocal translocation
13	Spleen	t(9;14)(p13;q32)	<i>PAX-5/IGH</i>	18.6% reciprocal translocation
		t(14;19)(q32;q13)	<i>BCL-3/IGH</i>	38% reciprocal translocation
	PB	+3, der(8)t(3;8)	<i>BCL-6</i>	37% three signals/no translocation
	PB	der(3)t(3;8)	<i>MYC</i>	Signal on 3p chromosome
14	PB	add(17)(p13)	17 paint	i(17)(q10)
	PB	i(17)(p13)	<i>P53</i>	52% deletion
	PB	der(6)t(3;6)(q13;p25)	<i>BCL-6</i>	59% three signals/no translocation
15	PB	+3, del(3)(q27)	<i>BCL-6</i>	75% three signals/no deletion
17	PB	t(14;19)(q32;q13)	<i>BCL-3/IGH</i>	58% reciprocal translocation
		der(12)t(8;12)(q24;p13)	<i>MYC</i>	59% three signals/no translocation
18	PB	i(17)(q10)	<i>P53</i>	34% deletion
	PB	der(2)t(2;21)(p12;q11)	<i>KAPPA</i>	Not rearranged
	PB	dic(8;15)(q24;q26)	<i>MYC</i>	17% three copies/not rearranged
20	PB	inv(3)(p13q26)	<i>BCL-6</i>	Normal
21	PB	der(17)t(5;17)(q22;p13)	<i>P53</i>	65% deletion
		del(13)(q14), der(7)t(7;9;13)	<i>RBI</i>	34.5% deletion
22	BM	der(13)t(13;18)(q10;q10)	<i>RBI</i>	Not rearranged
		der(17)t(9;17)(?:p13)	<i>P53</i>	73% deletion
23	PB	t(2;7)(p12;q22)	<i>KAPPA</i>	68.5% translocation
			<i>CDK6</i>	63% translocation

Abbreviations: PB: peripheral blood; BM: bone marrow.

1 and 12, respectively, because no additional material was available. We were able to confirm immunoglobulin genes translocations in 5/23 (21%) patients.

#### 4. Discussion

SMZL is a histologically well-defined entity but rather heterogenous genetically. This entity partially overlaps with other B-cell Non Hodgkin Lymphoma (NHL) subtypes. Chromosomal abnormalities can be detected by conventional banding cytogenetics approximately in 70–80% of the patients with SMZL, most of them presenting a complex karyotype [4,11,14,17,18]. Description of derivative chromosomes resulting from multiple rearrangements, additions,

insertions and chromosome markers is particularly difficult with G-banding methods. In order to describe more precisely complex aberrations in this disease, we combined SKY and conventional banding cytogenetics.

To the best of our knowledge, this is the first study using SKY technique to characterize chromosomal rearrangements in a series of well-defined patients with SMZL and a complex karyotype. Of note, in more than 74% of our cases, SKY provided additional cytogenetic information. These anomalies could not be detected analysing by conventional banding cytogenetics more number of metaphases.

In the present series the frequency of cases CD5 positive is slightly higher (26%) than previously reported [5]. This percentage could be explained due to the selection of patients with a complex karyotype. Giannouli et al. pub-

lished that, CD5 positive SMZL cases run a more aggressive clinical course [6]. Among our CD5 positive cases, two presented cytogenetic aberrations that could be observed in chronic lymphocytic leukemia (CLL) patients. Patient 21 showed a sinusoidal infiltration pattern in bone marrow, typical of SMZL cases. In this case, with the application of SKY, deletion 13q14 was observed as a complex translocation: der(7)t(7;9;13). Case 23 presented a t(2;7)(p11;q22) that was previously reported in SMZL [19] and the immunophenotype was suggestive of SMZL. T(14;19)(q32;q13) is a recurrent chromosomal change in B-cell malignancies mostly described in CLL cases. A recent report [20] suggested that *BCL-3* translocations are not restricted to CLL and are present in a heterogeneous group of B-cell malignancies. In this series we have two cases with SMZL and t(14;19)(q32;q13) associated to 7q deletion.

The most frequent cytogenetic abnormality in the present study was deletion of 7q. This anomaly is considered a relatively specific genetic marker of SMZL and it has been associated with an aggressive clinical course [21]. The recurrent loss of chromosome 7 material provides strong evidence for the existence of genes of relevance for the pathogenesis of SMZL in this area [22]. The most common aberration involving 7q in SMZL are deletions [4,7,10,14,21,22] but only a previous report demonstrated an oncogenic mechanism of pathogenicity through 7q translocations [19]. A t(2;7)(p12;q22) translocation identical as those described by Corcoran et al. was found by SKY in the present series. FISH results of this case showed that 68% and 63% of cells presented a rearrangement of *IGK* and *CDK6*, respectively, confirming a reciprocal translocation between these genes. This finding corroborates the low but recurrent presence of translocations involving genes with oncogenic properties, which are dysregulated by immunoglobulin gene promoters juxtaposition, in SMZL. SKY can be a useful technique to detect 7q as partner chromosome involved in a hidden translocation in cases with complex karyotype. In our previous study we observed that del(7q) and +3/3q were rarely observed together in patients with SMZL [14]. In the present series we could not confirm these findings because in five cases we found both aberrations in the same karyotype.

In agreement with our previous data [10], chromosome 3 was the second most frequently involved in the present study, not only as a numerical but also as a structural aberration with the result of gain of 3q. The partner chromosomes involved in rearrangements of this region were 6, 8, 13, and 18. The incidence of trisomy 3 in our series was 34%, this percentage being similar to that observed by comparative genomic hybridization (CGH) in SMZL by Hernández et al. [17]. The presence of gains of chromosome 3/3q have been significantly associated in previous reports with a poor outcome [17,18,23]. The authors suggested that additional material may have a gene dosage effect, where genes in the overexpressed region somehow contribute to neoplastic transformation or disease progression [23]. *BCL-6* gene, located at 3q27, is a transcriptional repressor gene and target of multiple

chromosomal translocations in NHL [24,25]. Expression levels of *BCL-6* have been useful to predict the clinical outcome, in contrast with the unclear prognostic significance of translocations in this locus. Regarding to trisomies, we found a high incidence of trisomies 3, 7 and 18 as previously reported [17,18,26]. FISH using *BCL-6* probe is a good strategy to detect gains of 3/3q in SMZL patients.

In the present series, four patients (17%) had translocations involving chromosome 8. Three of them showed gain of 8q region as a derivative chromosome comprising the *MYC* gene detected by FISH. One out of four patients, presented *MYC* signal on 3p region but is not rearranged (Table 4). The present study, therefore, strongly suggests that *MYC* is not rearranged in patients with 8q24 involvement. Consequently, the possible relationship of *MYC* gene and SMZL needs to be better clarified in a large series of cases.

Trisomy 12 or 12q duplication have been frequently observed as secondary genomic changes in lymphoid disorders [17]. Previous reports suggested a low incidence of trisomy 12 by conventional banding cytogenetics in cases with SMZL [7,14]. One numerical and six structural abnormalities of chromosome 12 have been detected in the present study by SKY. We could argue that these alterations could be difficult to be detected by conventional banding cytogenetics and could be easily identified after application of SKY technique. This fact explains the low incidence of chromosome 12/12q gains previously reported by G-banding [7,10,14].

Although previous studies reported a high incidence of 7q deletions and gains of 3/3q, only few series have included data about translocations and other structural chromosomal aberrations [14,17,18,23,26–28]. In our series, resolution of all chromosomal alterations by SKY revealed several new recurrent breakpoints. In this regard, translocations involving chromosomes 6 and 9 are particularly frequent.

Translocations of the 14q32 locus are detected in a high number of NHL and the result of these translocations is an overexpression of genes juxtaposed to *IGH* gene [1,3]. This aberration has been also reported in SMZL, such as t(6;14)(p21;q32) [13]. In our series, contrary to what has been previously published, translocations involving 14q32 were found in a high frequency after performing SKY technique. Among them, we found t(9;14)(p13;q32); this anomaly could be an important event in the pathogenesis of these lymphomas with a histological diffuse pattern [28]. One of our cases presented a coexistence of t(9;14)(p13;q32) and t(14;19)(q32;q13) not previously reported. Recently, Subero et al. [20] presented a collaborative report with a large series of cases presenting this anomaly. They report the results of a comprehensive cytogenetic, FISH, molecular and histopathological survey of a large series of B-cell malignancies with t(14;19) or variant translocations. A total of 56 B-cell malignancies with a FISH-proven *BCL3* involvement were identified with the translocation partners being *IGH* ( $n=51$ ), *IGL* ( $n=2$ ), *IGK* ( $n=2$ ) and a non-IG locus ( $n=1$ ). Their study indicates that *BCL3* translocations are

not restricted to B-CLL but present in a heterogeneous group of B-cell malignancies.

Furthermore, we found a case with translocation t(1;14)(q21;q32) that was reported in some NHL but not in SMZL [29].

Recently, array CGH technique has been introduced to reveal gains and losses of chromosomal regions at a high resolution level [30]. This technique permits to detect small aberrations at the level of 80 kb [31], but is not useful to identify reciprocal translocations. Because reciprocal translocations are an important event in the pathogenesis of B-cell lymphoproliferative disorders, we consider SKY very useful to reveal new translocations and to establish the precise karyotype in addition to conventional banding cytogenetics. Despite this substantial contributions, the use of SKY has some limitations due to poor chromosomal quality, small aberration size, few number of altered metaphases and presence of multiple clones. SKY advantages, however, are more than the limitations, and the findings of this study support that cytogenetic investigations by SKY remain a powerful tool for the study of chromosomal anomalies in SMZL.

In conclusion, in our series the application of SKY in SMZL patients confirmed the high incidence of deletions of 7q and gains of 3q and revealed a high incidence of translocations involving immunoglobulin genes and new translocations of chromosomes 3, 6, 8, 9 and 12. Molecular cloning of new and recurrent translocations detected by SKY may define new DNA sequences of oncogenic potential at such locus. Further studies are needed to understand the significance of the new cytogenetic aberrations detected by SKY in SMZL, to reach a better evaluation of histological and clinical correlations.

## Acknowledgements

This work has been partially supported by grants from Instituto de Salud Carlos III, Ministerio de Sanidad y Consumo (RTICCC, C03/07, C03/10, G03/179, PI030394 and PI 051072) and Fundació La Marató de TV3 2004 (Càncer). We want to thank Juan Cruz Cigudosa for his help in the tone-up of SKY technique and Carme Melero for her expert technical assistance.

## References

- [1] Harris NL, Jaffe ES, Stein H, Banks PM, Chan JK, Cleary ML, et al. A revised European-American classification of lymphoid neoplasms: a proposal from the International Lymphoma Study Group. *Blood* 1994;84:1361–92.
- [2] Mollejo M, Menarguez L, Lloret E, Sanchez A, Campos E, Algara P, et al. Splenic marginal zone lymphoma: a distinctive type of low-grade B-cell lymphoma. A clinicopathological study of 13 cases. *Am J Surg Pathol* 1995;19:1146–57.
- [3] Harris NL, Jaffe ES, Diebold J, Flandrin G, Müller-Hermelink HK, Vardiman J, et al. World Health Organization classification of neoplastic diseases of the hematopoietic and lymphoid tissues: report of the clinical advisory committee meeting-Airlie House, Virginia. *Histopathology* 1997;36:69–86.
- [4] Oscier D, Owen R, Johnson S. Splenic marginal zone lymphoma. *Blood* 2005;19:39–51.
- [5] Matutes E, Morilla R, Owusu-Ankomah K, Houlihan A, Catovsky D. The immunophenotype of splenic lymphoma with villous lymphocytes and its relevance to the differential diagnosis with other B-cell disorders. *Blood* 1994;83:1558–62.
- [6] Giannouli S, Paterakis G, Ziakas P, Anagnostou D, Voulgarelis M. Splenic marginal zone lymphomas with peripheral CD5 expression. *Haematologica* 2004;89:113–4.
- [7] Oscier D, Matutes E, Gardiner A, Glide S, Mould S, Brito-Babapulle V, et al. Cytogenetic studies in splenic lymphoma with villous lymphocytes. *Br J Haematol* 1993;85:486–91.
- [8] Dierlamm J, Michaux L, Wlodarska I, Pittaluga S, Zeller W, Stul M, et al. Trisomy 3 in marginal zone B-cell lymphoma: a study based on cytogenetic analysis and fluorescence in situ hybridization (FISH). *Br J Haematol* 1996;93:242–9.
- [9] Dierlamm J, Pittaluga S, Wlodarska I, Stul M, Thomas J, Boogaerts M, et al. Marginal zone B-cell lymphomas of different sites share similar cytogenetic and morphologic features. *Blood* 1996;87:299–307.
- [10] Solé F, Woessner S, Florensa L, Espinet B, Mollejo M, Martínez P, et al. Frequent involvement of chromosomes 1, 3, 7, and 8 in splenic marginal zone B-cell lymphoma. *Br J Haematol* 1997;98:446–9.
- [11] Troussard X, Mauvieux L, Radford-Weiss I, Rack K, Valensi F, Garand R, et al. Genetic analysis of splenic lymphoma with villous lymphocytes: a Groupe Français d'Hématologie Cellulaire (GFHC) study. *Br J Haematol* 1998;101:712–21.
- [12] Ott MM, Rosenwald A, Katzenberger T, Dreyling M, Krumdiek AK, Kalla J, et al. Marginal zone B-cell lymphomas (MZBL) arising at different sites represent different biological entities. *Genes Chrom Cancer* 2000;28:380–6.
- [13] Solé F, Espinet B, Salido M, Lloveras E, Fernández C, Cigudosa JC, et al. Translocation t(6;14)(p12;q32): a novel cytogenetic abnormality in splenic lymphoma with villous lymphocytes. *Br J Haematol* 2000;110:241–3.
- [14] Solé F, Salido M, Espinet B, Garcia JL, Martínez Climent JA, Granada I, et al. Splenic marginal zone B-cell lymphomas: two cytogenetic subtypes, one with gain of 3q and the other with loss of 7q. *Haematologica* 2001;86:71–7.
- [15] Schröck E, du Manoir S, Veldman T, Schoell B, Wienberg J, Ferguson-Smith MA, et al. Multicolor Spectral Karyotyping of human chromosomes. *Science* 1996;26:494–7.
- [16] ISCN. In: Shaffer LG, Tommerup N, editors. *An International System for Human Cytogenetic Nomenclature*. Basel: S. Karger; 2005.
- [17] Hernández JM, García JL, Gutiérrez NC, Mollejo M, Martínez-Climent JA, Flores T, et al. Novel genomic imbalances in B-cell splenic marginal zone lymphomas revealed by comparative genomic hybridization and cytogenetics. *Am J Pathol* 2001;158:1843–50.
- [18] Aamot HV, Micci F, Holte H, Delabie J, Heim S. G-banding and molecular cytogenetic analyses of marginal zone lymphoma. *Br J Haematol* 2005;130:890–901.
- [19] Corcoran MM, Mould SJ, Orchard JA, Ibbotson RE, Chapman RM, Boright AP, et al. Dysregulation of cyclin dependent kinase 6 in splenic marginal zone lymphoma through chromosome 7 translocations. *Oncogene* 1999;18:6271–7.
- [20] Martín-Subero JI, Ibbotson R, Klapper W, Michaux L, Callet-Bauchu E, Berge F, et al. A comprehensive genetic and histopathologic analysis identifies two subgroups of B-cell malignancies carrying a t(14;19)(q32;q13) or variant *BCL3*-translocation. *Leukemia* 2007;21:1532–44.
- [21] Mateo M, Mollejo M, Villuendas R, Algara P, Sanchez-Beato M, Martínez P, et al. 7q31–32 allelic loss is a frequent finding in splenic marginal zone lymphoma. *Am J Pathol* 1999;154:1583–9.
- [22] Gruszka-Westwood AM, Hamoudi R, Osborne L, Matutes E, Catovsky D. Deletion mapping on the long arm of chromosome 7 in splenic lymphoma.



- phoma with villous lymphocytes. *Genes Chrom Cancer* 2003;36:57–69.
- [23] Dierlamm J, Wlodarska I, Michaux L, Stefanova M, Hinz K, Van den Berghe H, et al. Genetic abnormalities in marginal zone B-cell lymphoma. *Hematol Oncol* 2000;18:1–13.
- [24] Barrans SL, O'Connor SJ, Evans PA, Davies FE, Owen RG, Haynes AP, et al. Rearrangement of the *BCL6* locus at 3q27 is an independent poor prognostic factor in nodal diffuse large B-cell lymphoma. *Br J Haematol* 2002;117:322–32.
- [25] Ohno H. Pathogenetic and clinical implications of non-immunoglobulin; *BCL6* translocations in B-cell non-Hodgkin's lymphoma. *J Clin Exp Hematopathol* 2006;46:43–53.
- [26] Callet-Bauchu E, Baseggio L, Felman P, Traverse-Glehen A, Berger F, Morel D, et al. Cytogenetic analysis delineates a spectrum of chromosomal changes that can distinguish non-MALT marginal zone B-cell lymphomas among mature B-cell entities: a description of 103 cases. *Leukemia* 2005;19:1818–23.
- [27] Andersen CL, Gruszka-Westwood A, Atkinson S, Matutes E, Catovsky D, Pedersen RK, et al. Recurrent genomic imbalances in B-cell splenic marginal-zone lymphoma revealed by comparative genomic hybridization. *Cancer Genet Cytogenet* 2005;156:122–8.
- [28] Baró C, Salido M, Domingo A, Granada I, Colomo L, Serrano S, et al. Translocation t(9;14)(p13;q32) in cases of splenic marginal zone lymphoma. *Haematologica* 2006;91:1289–91.
- [29] Mitelman F, Johansson B, Mertens F. Mitelman database of chromosome aberrations in cancer. Accessed August 2007. Available at: <http://cgap.nci.nih.gov/Chromosomes/Mitelman>.
- [30] de Ravel TJ, Devriendt K, Fryns JP, Vermeesch JR. What's new in karyotyping? The move towards array comparative genomic hybridization (CGH). *Eur J Pediatr* 2007, review.
- [31] Yilmaz S, Fontaine H, Brochet K, Grégoire MJ, Devignes MD, Schaff JL, et al. Screening of subtle copy number changes in Aircade syndrome patients with a high resolution X chromosome array CGH. *Eur J Med Genet*, in press.

# FOXP1 status in splenic marginal zone lymphoma: a fluorescence *in situ* hybridization and immunohistochemistry approach

Cristina Baró<sup>1,2</sup>, Blanca Espinet<sup>2,6</sup>, Marta Salido<sup>1,2,6</sup>, Lluís Colomo<sup>3</sup>, Elisa Luño<sup>4</sup>, Lourdes Florensa<sup>2,6</sup>, Ana Ferrer<sup>2,6</sup>, Antonio Salar<sup>5</sup>, Elias Campo<sup>3</sup>, Sergi Serrano<sup>2</sup> and Francesc Solé<sup>2,6</sup>

<sup>1</sup>Dept. Biologia Animal, Vegetal i Ecologia. Unitat d'Antropologia Biològica. Facultat de Biociències. Universitat Autònoma de Barcelona, Bellaterra, Barcelona, Spain, <sup>2</sup>Laboratori de Citogenètica Molecular. Laboratori de Citologia Hematològica. Servei de Patologia, IMAS. GRETNHE, IMIM-Hospital del Mar, Barcelona, Spain, <sup>3</sup>Unitat d'Hematopatologia. Hospital Clínic i Provincial. Barcelona, Spain, <sup>4</sup>Servicio de Hematología, Hospital Universitario Central de Asturias, Oviedo, Spain, <sup>5</sup>Servei d'Hematologia Clínica, IMAS. IMIM-Hospital del Mar, Barcelona, Spain and <sup>6</sup>Escola de Citologia Hematològica Soledad Woessner-IMAS

**Summary.** Splenic marginal zone lymphoma (SMZL) is a well-recognized entity in which chromosomal aberrations seem to be potential markers in diagnosis, prognosis and disease monitoring.

*FOXP1* is a transcriptional regulator of B lymphopoiesis that is deregulated in some types of NHL. Translocation t(3;14)(p14;q32) has been described in marginal zone lymphomas but few series have studied *FOXP1* involvement in SMZL. We performed cytogenetic, fluorescence *in situ* hybridization (FISH) and immunohistochemical (IHC) studies in a series of 36 patients in order to study the status of *FOXP1* in this entity.

According to our results, *FOXP1* is not rearranged in SMZL, although we were able to demonstrate gains of *FOXP1* gene due to trisomy 3/3p by FISH. *FOXP1* protein expression seemed to be not related to any aberration and IHC studies are not conclusive.

**Key words:** *FOXP1*, FISH, IHC, SMZL

## Introduction

The *Forkhead box protein P1 (FOXP1)* gene, localized at chromosome 3p14 region, exhibits loss of heterozygosity (LOH) in human cancer and therefore is considered a new candidate tumor suppressor gene that is down regulated in solid tumors. However, the role of

*FOXP1* in hematopoietic malignancies has not been extensively described (Banham et al., 2001). Overexpression of *FOXP1* has been observed in cases of diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL) and a high expression of *FOXP1* protein has been associated with non-germinal center DLBCL type with a poor outcome (Barrans et al., 2004; Banham et al., 2005). However, the potential mechanisms of deregulation of *FOXP1* in non-Hodgkin lymphomas (NHL) are unclear, but in some cases cytogenetic changes have been reported as the underlying mechanism (Haralambieva et al., 2005; Streubel et al., 2005; Wlodarska et al., 2005; Fenton et al., 2006).

Recently, translocation t(3;14)(p14;q32) involving *FOXP1* gene and heavy chain immunoglobulin gene (*IGH*) has been described in mucosa associated lymphoid tissue (MALT) and extranodal DLBCL lymphomas (Haralambieva et al., 2005; Streubel et al., 2005; Wlodarska et al., 2005; Fenton et al., 2006). Large series of MALT lymphomas have been investigated by a two-color fluorescence *in situ* hybridization (FISH) assay. The frequency of positive cases for the translocation (10%) was site dependent and lymphomas harboring this rearrangement showed additional chromosomal aberrations such as trisomy 3 (Streubel et al., 2005).

Some studies postulated that in DLBCL overexpression of *FOXP1* protein does not occur due to gene translocation (Wlodarska et al., 2005; Barrans et al., 2007).

On the other hand, little is known regarding the role of *FOXP1* gene in splenic marginal zone lymphoma (SMZL). SMZL is a well-recognized entity in which the

clinical, morphological, immunophenotypical and histological characteristics are well established (Mollejo et al., 1995; Jaffe et al., 2001; Matutes et al., 2007), and the associated cytogenetic abnormalities are expected to be helpful in the differential diagnosis with other types of lymphomas (Dierlamm et al., 2000; Hernández et al., 2001; Solé et al., 2001; Aamot et al., 2005; Baró et al., 2008).

Rearrangements involving *IGH* locus, a common feature in NHL, have been rarely described in SMZL (Solé et al., 2000; Baró et al., 2006; Martín-Subero et al., 2007; Remstein et al., 2007). Regarding t(3;14) (p14;q32), only eight cases of SMZL were previously studied and all of them were considered negative for translocation (Streubel et al., 2005).

The aim of this study was to investigate the status of *FOXP1* gene by FISH in a series of 36 well-defined SMZL cases and to correlate it with *FOXP1* immunohistochemical expression.

## Materials and methods

### Patients

Thirty-six patients diagnosed with SMZL according to WHO criteria for this entity (Jaffe et al., 2001) were included in the study. Seventeen of them (cases 1, 3, 8, 12, 13, 16, 17, 20, 21, 22, 23, 24, 26, 27, 28 and 29) have been previously studied to attempt to establish a comprehensive cytogenetic analysis in SMZL (Solé et al., 2001; Baró et al., 2008). Patients were referred from different hospitals belonging to the Spanish Cytogenetic Working Group (GCECGH, AEHH) and from the *Red de Grupos de Linfomas* (G03/179).

### Conventional banding cytogenetics and fluorescence in situ hybridization (FISH) studies

G-banding analyses were carried out according to standard procedures from Carnoy fixed cells (12 peripheral bloods, seven bone marrow and 17 spleens). Karyotypes were described according to the International System for Human Cytogenetic Nomenclature (ISCN) (Shaffer and Tommerup, 2005).

FISH was performed in fixed cells from peripheral blood (n=12), bone marrow (n=7) and in paraffin-embedded spleen samples (n=7) following standard procedures. In ten of 17 spleen sections, FISH results were not available due to the poor quality of the hybridization. In such cases (n=10), Carnoy fixed cells of these spleens were used (Table 1). A *FOXP1* (3p14) dual color break apart non-commercial translocation probe was designed to detect translocations in this gene. The probe consisted of two bacterial artificial chromosome (BAC) clones directly labeled using nick translation: BAC RP11-713J7 labeled in green and located at 5' of the gene and BAC RP11-79P21 labeled in red and located at 3' of the gene. All the previously described breakpoints of *FOXP1* are located at 90Kb

downstream of the gene, so that the dual color designed probe could detect all previously described translocations of *FOXP1*. In this regard, Wlodarska et al. also used these two BACs in their FISH DNA probes panel to analyze *FOXP1* rearrangements (Wlodarska et al., 2005). In all cases, a minimum of 100 nuclei were examined and metaphases were studied when it was possible.

Ten peripheral blood samples from healthy donors were used to assess the cut-off in cell suspensions. The cut-off value for this probe was calculated as the mean percentage of cells with a false-positive signal constellation plus three standard deviations. Two hundred nuclei were evaluated in each negative control and the cut-off values for the *FOXP1* rearrangement and for gains (three copies of *FOXP1* gene) were 1% and 3% respectively. Five tonsil samples from healthy donors were used as negative controls in paraffin-embedded tissues. In these cases, the cut-off values obtained were 2% for the *FOXP1* rearrangement and 10% for gains of *FOXP1*. One hundred nuclei were scored in each paraffin-embedded control case.

### *FOXP1* protein immunohistochemistry (IHC)

*FOXP1* protein IHC was carried out in 17 patients in whom sections of the spleen were available (Table 1). The *FOXP1* antibody, clone JC12 (Banham et al., 2001), was kindly provided by Dr. Alison Banham (Nuffield Department of Clinical Laboratory Sciences, University of Oxford, John Radcliffe Hospital, Oxford, United Kingdom). IHC was performed on formalin-fixed paraffin-embedded tissue sections. Briefly, paraffin sections on silane-coated slides were developed in a fully automated immunostainer (Bond Max, Vision Biosystems, Mount Waverley, Australia). High pH retrieval in Bond ER1 Buffer solution (Vision Biosystems, Mount Waverley, Australia) was performed for 20', followed by 30' incubation with the primary antibody (1:80) and 30' of Bond Refine Polymer (Vision Biosystems, Mount Waverley, Australia). 5'-3'-Diaminobenzidine (DAB) was used for 10' as a chromogen. The cases were considered positive when more than 30% of atypical cells were positive. Intensity of *FOXP1* was scored as weak, moderate or strong (Table 1).

## Results

No rearrangements of *FOXP1* were found in any case of SMZL. Three copies of the gene were detected in seven of 36 (19,5%) patients. Gains of *FOXP1* were due to the presence of extra copies of whole chromosome 3 (5 cases) or due to partial trisomy of 3p by unbalanced translocations (2 cases). In one patient (case 3), discordant G-banding and FISH results were found: although a trisomy 3 was detected by conventional banding cytogenetics (only in two out of 30 metaphases with poor morphology), FISH analysis could not confirm

## FOXP1 in SMZL

**Table 1.** Cytogenetic, FISH and IHC results in a series of 36 SMZL.

Case	TS	Conventional Karyotype	FISH Results FOXP1	IHC Results	Spleen Pattern
1	PB	44-89,XX,+3,der(3)t(3;8)(q27;q24),del(6)(q15),der(6)t(6;8)(q23;q24),del(7)(q31q36),der(17;18)(q10;q10),+18,i(18)(q10)[cp4]	28% three copies		
2	PB	46,XX,t(1;3)(q25;p13),del(2)(p23),add(13)(q34),add(14)(q32),-22[1]/46,XX,t(1;3)(q25;p13),add(19)(13)[1]/46,XXadd(2)(q37),[1]/46,XX,del(X)(q22)[1]/46,XX[14]	25% three copies		
3	BM	48-49,XX,+3,+5,der(9),-10,-12,add(13)(q34),+2mar[cp2]/46,XX[28]	Normal		
4	PB	47,XX,t(3;18)(q11;p11),+18,der(18)t(3;18)(q11;p11)[2]	Normal		
5	PB	47-49,X,-X,+3,del(6)(q23),+7,+9,der(9)t(X;9)(?:q34),+18[cp6]	33% three copies		
6	BM	45,XX,t(3;4;14)(p21;q34;q32),-8,t(8;12)(q11;p11)[3]/45,XX,t(3;4;14)(p21;q34;q32),-12,der(22)t(12;22)(q11;q13)[3]/46,XX,t(3;4;14)(p21;q34;q32),del(12)(q11)[2]	8% three copies		
7	BM	46,XX,del(7)(q22),der(13)t(3;13)(q21;q14)[2]	Normal		
8	spleen	46-47,XY,der(6)t(3;6)(q11;q11),del(7)(q22),der(19)t(12;19)(q11;q13),+mar(12)[cp4]	Normal	strong expression	prominent red pulp involvement
9	spleen	48,XX,+3,+12[20]	19% three copies	weak expression	micronodular
10	BM	47-48,XX,dup(3)(q11q27),+7,del(7)(q22q34),del(7)(q22q34),+11[cp2]	Normal		
11	BM	47-49,X,-X,+3,der(3)t(3;8)(3pter→3q11::8q24→8qter),+7,del(7)(q32q35)der(8)t(3;8)(3?::8p11→8q22::3?q),t(9;14)(p13;q32),t(14;19)(q32;q13),+mar(11),+r(1)(p36q44)[cp4]	39% three copies		
12	PB	46,XY,der(6)t(3;6)(q13;p25),add(17)(p13),add(19)(q13)[cp2]	Normal		
13	PB	48,XY,+3,del(3)(q27),-6,inv(12)(p13q21),+18,+mar(2)[cp2]	64.5% three copies		
14	PB	46,XY,inv(3)(p13q26),del(7)(q22q32),del(10)(q24q26),del(11)(q21q23)[2]	Normal		
15	PB	45-47,XY,del(3)(p23),der(7)t(7;9;13)(7p22→7q32::9q22→9q34::13q14→13qter),del(9)(q22),der(9)t(9;15)(q34;q15),del(13)(q14),-15,der(17)t(5;17)(q22;p13),der(22)t(20;22)(q11;p11)[cp4]	Normal		
16	PB	44-45,XY,t(2;7)(p12;q22),der(8)t(8;21)(q22;q11),del(14)(q22)[cp2]	Normal		
17	spleen	46,XY,del(7)(q32)[1]/46,XY[19]	Normal	no expression	slight lymphoid tissue increase
18	PB	46,XY,t(2;12)(p12;q24),del(6)(q21),del(6)(q23),del(17)(p13)[5]/46,XY[25]	Normal		
19	PB	46,XX,del(7)(q32),del(10)(p21q11)[20]	Normal		
20	spleen	46,XX,del(7)(q22)[17]/46,XX[3]	Normal	moderate expression	micronodular
21	ξspleen	46,XX[20]	Normal	weak expression	micronodular
22	spleen	46,XX,del(7)(q32)[6]/46,XX[9]	Normal	strong expression	prominent red pulp involvement
23	ξspleen	46,XX,del(7)(q22)[15]	Normal	no expression	slight lymphoid tissue increase
24	BM	47,XX,+12[4]/46,XX[16]	Normal		
25	ξspleen	46,XX[20]	Normal	strong expression	prominent red pulp involvement
26	PB	44-47,XY,t(1;6)(p34;p23),+2,del(2)(q21),der(2)t(2;21)(p12;q11),+8,dic(8;15)(q24;q26),del(11)(q11),i(17)(q10),+mar(2),+mar(Y)[cp9]	Normal		
27	ξspleen	46,XX[20]	Normal	moderate expression	micronodular
28	BM	43-44,XY,del(7)(q21),-9,t(10;15)(q22;q22),der(13;14)(q10;q10),der(13;18)(q10;q10),der(17)t(9;17)(?:p13)[cp4]	Normal		
29	spleen	42-48,XX,del(2)(q23),der(17)t(5;17)(?:p13),+dmin(1),+dmin(3)[cp4]	Normal	weak expression	micronodular
30	spleen	46,XY[20]	Normal	strong expression	micronodular
31	spleen	46,XY,del(7)(q32)[6]/46,XY[1]	Normal	strong expression	prominent red pulp involvement
32	spleen	46,XY[30]	Normal	no expression	micronodular
33	ξspleen	46,XX,del(7)(q32),add(19)(q13)[10]/46,XX[10]	Normal	weak expression	micronodular
34	ξspleen	46,XY[10]	Normal	moderate expression	micronodular
35	ξspleen	46,XX[20]	Normal	moderate expression	micronodular
36	spleen	46,XX,i(12)(q10)[5]/46,XX[15]	Normal	moderate expression	micronodular

TS: tissue sample; PB: peripheral blood; BM: bone marrow; spleen: suspension cells; ξspleen: Paraffin-embedded tissue.



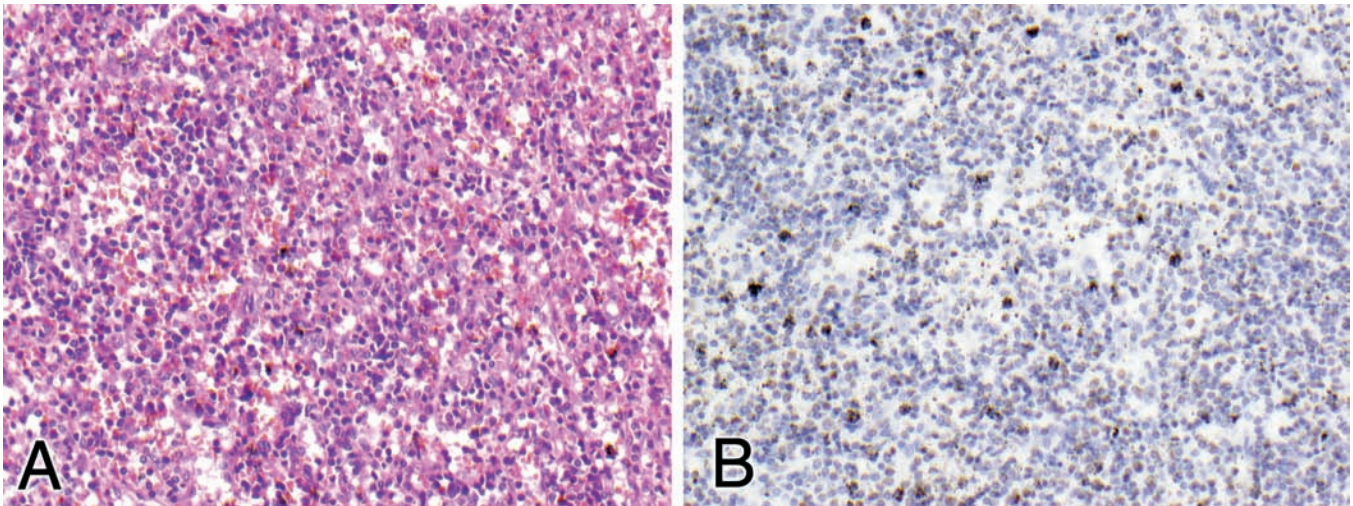


Fig. 1. Hematoxylin-eosin section (A) and FOXP1 IHC (B) of the same lymphoid follicle of patient 8 at 20. x 200

this abnormality (Table 1).

IHC studies were performed in 17 out of 36 patients, in which histological spleen sections were available. Fourteen out of the 17 cases expressed FOXP1 protein, having strong and uniform expression in five cases (patients 22, 8, 25, 30 and 31). It is remarkable that three of them (patients 22, 8, and 31) presented a deletion of 7q associated with a prominent involvement of the splenic red pulp (Fig. 1). Cases 17 and 23, also with 7q deletion, only had a light increase of splenic lymphoid tissue and in those conditions IHC analysis could not detect FOXP1 expression. On the other hand, a patient with three copies of *FOXP1* detected by FISH (case 9) presented weak expression of the protein.

Unfortunately, splenectomy specimens of the remaining patients with gains of FOXP1 were not available (cases 1, 2, 5, 6, 11 and 13) and it was not possible to establish a correlation between *FOXP1* gains by FISH and FOXP1 expression results in SMZL.

## Discussion

There is more than one mechanism of *FOXP1* deregulation in NHL, because a high expression of this gene is not necessarily due to the presence of rearrangement events. In the literature, deregulation of *FOXP1* has been referred to in cases with gains of chromosome 3, and this aberration was related to strong FOXP1 protein expression, suggesting an association between the occurrence of extra copies of *FOXP1* and aberrant expression of its protein (Haralambieva et al., 2005). Of note, trisomy 3 is one of the most common aberrations in SMZL (Dierlamm et al., 2000; Hernández et al., 2001; Solé et al., 2001; Aamot et al., 2005; Baró et al., 2008) although t(3;14)(p14;q32) has not been detected in this entity (Streubel et al., 2005). Some cases of NHL present translocations that could be masked due

to the complexity of the karyotypes or due to the small size of the involved regions (Gozzetti et al., 2002; Gazzo et al., 2005; Baró et al., 2006). In these cases, FISH analyses could be helpful to detect or confirm successful chromosomal aberrations. Although *FOXP1* was not rearranged in the present series, three copies of this gene due to gains of chromosome 3 or 3p were observed.

We could not analyze the relationship between gains of chromosome 3/3p and FOXP1 protein expression by IHC in all cases because spleen sections were not available. Only one patient had both analyses, but there was no correlation because FOXP1 protein was weakly expressed and FISH showed three copies of the gene. In reference to this point, recent studies have reported the existence of FOXP1 isoforms in DLBCL that anti-FOXP1 (JC12) monoclonal antibody cannot distinguish (Brown et al., 2008). This could explain the discordance between IHC and FISH results in our case.

Deletion of 7q is considered a characteristic aberration of SMZL (Dierlamm et al., 2000; Hernández et al., 2001; Solé et al., 2001; Aamot et al., 2005; Baró et al., 2008). In this study, we found three patients with chromosome 7q deletion and a prominent involvement of the splenic red pulp. Moreover, cases with these features showed strong expression of FOXP1 protein. However, as the number of cases showing these two characteristics was low, we could not suggest any relationship.

The present series is the largest reported until now that has studied the involvement of *FOXP1* in SMZL. Large series of this entity with histological spleen sections available are needed to determine the relationship between FOXP1 expression and gains of 3/3p detected by FISH. In addition, further studies with patients presenting a prominent involvement of splenic red pulp and 7q deletion are needed to demonstrate or discard their association with strong expression of

## FOXP1 protein.

Although *FOXP1* takes part in early B cell development transcriptional regulation (Fuxa and Skok, 2007) and is probably affected in some NHL, we could discard an involvement of this gene due to t(3;14)(p14;q32) in SMZL. However, other genes located in chromosome 3 have to be considered in the study of SMZL due to the high implication of this chromosome in this disease.

---

*Acknowledgements.* This work has been partially supported by grants from Fundació La Marató de TV3 (Càncer) and grants from Instituto de Salud Carlos III, Ministerio de Sanidad y Consumo (RD07/0020/2004). The authors want to thank Dr. Alison H. Banham from Nuffield Department of Expression Clinical and Laboratory Sciences, University of Oxford, UK, for providing FOXP1 antibody.

---

## References

- Aamot H.V., Micci F., Holte H., Delabie J. and Heim S. (2005). G-banding and molecular cytogenetic analyses of marginal zone lymphoma. *Br. J. Haematol.* 130, 890-901.
- Banham A.H., Beasley N., Campo E., Fernández P.L., Fidler C., Gatter K., Jones M., Mason D.Y., Prime J.E., Trougouboff P., Wood K. and Cordell J.L. (2001). The FOXP1 winged helix transcription factor is a novel candidate tumor suppressor gene on chromosome 3p. *Cancer Res.* 61, 8820-8829.
- Banham A.H., Connors J.M., Brown P.J., Cordell J.L., Ott G., Sreenivasan G., Farinha P., Horsman D.E. and Gascoyne R.D. (2005). Expression of the FOXP1 transcription factor is strongly associated with inferior survival in patients with diffuse large B-cell lymphoma. *Clin. Cancer Res.* 11, 1065-1072.
- Baró C., Salido M., Domingo A., Granada I., Colomo L., Serrano S. and Solé F. (2006). Translocation t(9;14)(p13;q32) in cases of splenic marginal zone lymphoma. *Haematologica* 91, 1289-1291.
- Baró C., Salido M., Espinet B., Astier L., Domingo A., Granada I., Millà F., Carrió A., Costa D., Luño E., Hernández J.M., Campo E., Florensa L., Ferrer A., Salar A., Bellosillo B., Besses C., Serrano S. and Solé F. (2008). New chromosomal alterations in a series of 23 splenic marginal zone lymphoma patients revealed by Spectral Karyotyping (SKY). *Leuk. Res.* 32, 727-736.
- Barrans S.L., Fenton J.A., Banham A., Owen R.G. and Jack A.S. (2004). Strong expression of FOXP1 identifies a distinct subset of diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL) in patients with poor outcome. *Blood* 104, 2933-2935.
- Barrans S.L., Fenton J.A., Ventura R., Smith A., Banham A.H. and Jack A.S. (2007). Deregulated over expression of FOXP1 protein in diffuse large B-cell lymphoma does not occur as a result of gene rearrangement. *Haematologica* 92, 863-864.
- Brown P.J., Ashe S.L., Leich E., Burek C., Barrans S., Fenton J.A., Jack A.S., Pulford K., Rosenwald A. and Banham A.H. (2008). Potentially oncogenic B-cell activation-induced smaller isoforms of FOXP1 are highly expressed in the activated B cell-like subtype of DLBCL. *Blood* 5, 2816-2824.
- Dierlamm J., Wlodarska I., Michaux L., Stefanova M., Hinz K., Van den Berghe H., Hagemeijer A. and Hossfeld D.K. (2000). Genetic abnormalities in marginal zone B-cell lymphoma. *Hematol. Oncol.* 18, 1-13.
- Fenton J.A., Schuurin E., Barrans S.L., Banham A.H., Rollinson S., Morgan G.J., Jack A.S., van Krieken H.J. and Kluijn P.M. (2006). T(3;14)(p14;q32) results in aberrant expression of FOXP1 in a case of diffuse large B-cell lymphoma. *Genes Chromosomes Cancer* 45, 164-168.
- Fuxa M. and Skok J.A. (2007). Transcriptional regulation in early B cell development. *Curr. Opin. Immunol.* 19, 129-136.
- Gazzo F., Felman P., Berger F., Salles G., Magaud J.P. and Callet-Bauchu E. (2005). Atypical cytogenetic presentation of t(11;14) in mantle cell lymphoma. *Haematologica* 90, 1708-1709.
- Gozzetti A., Davis E.M., Espinosa R. 3rd, Fernald A.A., Anastasi J. and Le Beau M.M. (2002). Identification of novel cryptic translocations involving IGH in B-cell non-Hodgkin's lymphomas. *Cancer Res.* 62, 5523-5527.
- Haralambieva E., Adam P., Ventura R., Katzenberger T., Kalla J., Höller S., Hartmann M., Rosenwald A., Greiner A., Müller-Hermelink H.K., Banham A.H. and Ott G. (2005). Genetic rearrangement of FOXP1 is predominantly detected in a subset of diffuse large B-cell lymphomas with extranodal presentation. *Leukemia* 20, 1300-1303.
- Hernández J.M., García J.L., Gutiérrez N.C., Mollejo M., Martínez-Climent J.A., Flores T., González M.B., Piris M.A. and San Miguel J.F. (2001). Novel genomic imbalances in B-Cell Splenic Marginal Zone Lymphomas revealed by comparative genomic hybridization and cytogenetics. *Am. J. Pathol.* 158, 1843-1850.
- Jaffe E.S., Harris N.L., Stein H., Vardiman J.W. and editors (2001). World Health Organization Classification of tumours. Pathology and Genetics of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. IARC Press. Lyon. pp 162-167.
- Martín-Subero J.I., Ibbotson R., Klapper W., Michaux L., Callet-Bauchu E., Berger F., Calasanz M.J., De Wolf-Peters C., Dyer M.J., Felman P., Gardiner A., Gascoyne R.D., Gesk S., Harder L., Horsman D.E., Kneba M., Küppers R., Majid A., Parry-Jones N., Ritgen M., Salido M., Solé F., Thiel G., Wacker H.H., Oscier D., Wlodarska I. and Siebert R. (2007). A comprehensive genetic and histopathologic analysis identifies two subgroups of B-cell malignancies carrying a t(14;19)(q32;q13) or variant BCL3-translocation. *Leukemia* 21, 1532-1544.
- Matutes E., Oscier D., Montalban C., Berger F., Callet-Bauchu E., Dogan A., Felman P., Franco V., Iannitto E., Mollejo M., Papadaki T., Remstein E.D., Salar A., Solé F., Stamatopoulos K., Thieblemont C., Traverse-Glehen A., Wotherspoon A., Coiffier B. and Piris M.A. (2007). Splenic marginal zone lymphoma proposals for a revision of diagnostic, staging and therapeutic criteria. *Leukemia* 20, 1-9.
- Mollejo M., Menarguez L., Lloret E., Sanchez A., Campos E., Algara P., Cristóbal E., Sánchez E. and Piris M.A. (1995). Splenic marginal zone lymphoma: a distinctive type of low-grade B-cell lymphoma. A clinicopathological study of 13 cases. *Am. J. Surg. Pathol.* 19, 1146-1157.
- Remstein E.D., Law M., Mollejo M., Piris M.A., Kurtin P.J. and Dogan A. (2007). The prevalence of IG translocations and 7q32 deletions in splenic marginal zone lymphoma. *Leukemia* 8, 1-5.
- Shaffer L.G. and Tommerup N. (2005). An international system for human cytogenetic nomenclature. S. Karger. Basel.
- Solé F., Espinet B., Salido M., Lloveras E., Fernández C., Cigudosa J.C., Asensio A., Woessner S. and Florensa L. (2000). Translocation t(6;14)(p12;q32): a novel cytogenetic abnormality in splenic lymphoma with villous lymphocytes. *Br. J. Haematol.* 110, 241-243.
- Solé F., Salido M., Espinet B., Garcia J.L., Martínez-Climent J.A., Granada I., Hernández J.M., Benet I., Piris M.A., Mollejo M.,

*FOXP1 in SMZL*

- Martinez P., Vallespi T., Domingo A., Serrano S., Woessner S. and Florensa L. (2001). Splenic marginal zone B-cell lymphomas: two cytogenetic subtypes, one with gain of 3q and the other with loss of 7q. *Haematologica* 86, 71-77.
- Streubel B., Vinatzer U., Lamprecht A., Raderer M. and Chott A. (2005). T(3;14)(p14.1;q32) involving IGH and FOXP1 is a novel recurrent chromosomal aberration in MALT lymphoma. *Leukemia* 19, 652-658.
- Wlodarska I., Veyt E., de Paepe P., Van den Berghe P., Nooijen P., Theate I., Michaux L., Sagaert X., Marynen P., Hagemeijer A. and de Wolf-Peeters (2005). FOXP1, a gene highly expressed in a subset of diffuse large B-cell lymphoma, is recurrently targeted by genomic aberrations. *Leukemia* 19, 1299-1305.

Accepted May 20, 2009